



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede amministrativa: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di
SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE**

**Scuola di Dottorato di Ricerca in
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE**

**Indirizzo in
SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE**

XXIII° CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Studio delle capacità differenziative e della potenzialità
terapeutica di cellule staminali mesenchimali umane isolate
da cordone ombelicale e sangue cordonale nelle malattie
epatiche acute.**

Direttore della Scuola : Prof. Pier Paolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Supervisore : Dott.ssa Patrizia Burra

Dottorando : Tatiana Chioato

INDICE

RIASSUNTO	1
SUMMARY	3
INTRODUZIONE	5
1. CELLULE STAMINALI	5
<i>1.1 DEFINIZIONE E CARATTERISTICHE GENERALI</i>	5
<i>1.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI</i>	6
<i>1.3 CELLULE STAMINALI ADULTE</i>	8
<i>1.4 CELLULE STAMINALI ADULTE E PLASTICITA'</i>	10
2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	11
<i>2.1 DEFINIZIONE E CARATTERISTICHE PRINCIPALI</i>	11
<i>2.2 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA</i>	14
<i>2.3 LUNGHEZZA DEI TELOMERI E ATTIVITA' TELOMERASICA</i>	15
<i>2.4 SANGUE CORDONALE (UCB) E CORDONE OMBELICALE (UC)</i>	
<i>UMANO COME FONTI DI MSC</i>	17
3. CELLULE STAMINALI E RIGENERAZIONE EPATICA	19
SCOPO DELLA RICERCA	25
MATERIALI E METODI	27
1. RACCOLTA DEI CAMPIONI DI UCB E UC UMANO	27
2. ISOLAMENTO E COLTURA DI MSC DA UCB	27
3. COLTURE DI CELLULE MSC CD105 POSITIVE DA UCB	27
<i>3.1 CONDIZIONAMENTO DI BIGLIE MAGNETICHE CON ANTICORPO</i>	28
<i>3.2 IMMUNOSEPARAZIONE</i>	28
4. ISOLAMENTO E COLTURA DI MSC DA UC	29

5. CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELLE MSC DA UCB MEDIANTE ANALISI CITOFUORIMETRICA	30
6. VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CELLULE FETALI NELLE MSC DA UCB E DA UC MEDIANTE RT-PCR	30
6.1 <i>ESTRAZIONE RNA TOTALE</i>	30
6.2 <i>RETROTRASCRIZIONE</i>	31
6.3 <i>REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE</i>	32
7. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO ED OSTEOGENICO IN VITRO DI MSC DA UCB E DA UC	33
7.1 <i>INDUZIONE DEI DIFFERENZIAMENTI</i>	33
7.2 <i>VALUTAZIONE DEI DIFFERENZIAMENTI</i>	34
7.2.1 <i>Analisi morfologica</i>	34
7.2.2 <i>Saggio Oil-Red-O per la presenza dei trigliceridi</i>	34
7.2.3 <i>Saggio Von Kossa per la deposizione dei Sali di calcio</i>	34
8. STUDIO DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI E DELL'ATTIVITA' TELOMERASICA NELLE MSC DA UC	35
8.1 <i>ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA CELLULE</i>	35
8.2 <i>DETERMINAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DELLA CONCENTRAZIONE DEL DNA GENOMICO ESTRATTO</i>	35
8.3 <i>ESTRAZIONE DI PROTEINE DA CELLULE</i>	35
8.4 <i>DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA</i>	36
8.5 <i>DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' TELOMERASICA MEDIANTE REAL TIME PCR-TRAP</i>	36
8.6 <i>DETERMINAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI (T/S) MEDIANTE REAL-TIME PCR</i>	37
8.7 <i>ANALISI DEI DATI DELLA REAL TIME PCR-TRAP</i>	37
9. OTTENIMENTO E ANALISI DELLA MATRICE ACELLULARE DI FEGATO	38
9.1 <i>OTTENIMENTO DELLA MATRICE ACELLULARE DI FEGATO</i>	38
9.2 <i>ANALISI ISTOCHEMICA</i>	38
9.2.1 <i>Inclusione in paraffina</i>	38

9.2.3 Colorazione con Ematossilina-Eosina	39
10. DIFFERENZIAMENTO EPATOCITARIO IN VITRO DI MSC DA UCB E UC	39
10.1 INDUZIONE DEI DIFFERENZIAMENTI	39
10.1.1 Differenziamento su supporto di Matrigel TM	40
10.1.2 Differenziamento su matrice acellulare omologa di fegato	40
10.1.3 Differenziamento su plastica (piastra Petri)	40
10.2 VALUTAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO	40
10.2.1 Analisi morfologica	40
10.2.2 Valutazione della vitalità cellulare con saggio MTS	41
10.2.3 Analisi immunocitochimica	41
10.2.4 Real-Time PCR per i marcatori di linea epatocitaria	42
10.2.5 Colorazione PAS (Acido Periodico di Schiff)	45
10.2.6 Valutazione della produzione di albumina umana	45
11. ANALISI STATISTICA	46
12. VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' RIGENERATIVA IN VIVO DELLE MSC DA UC	46
12.1 INDUZIONE DEL DANNO E SOMMINISTRAZIONE DELLE MSC	46
12.2 VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEGLI ORGANI	47
RISULTATI	49
1. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE MSC DA UCB	49
2. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO E OSTEOGENICO IN VITRO DI MSC DA UCB	51
2.1. INDUZIONE ADIPOGENICA	51
2.2. INDUZIONE OSTEOGENICA	51
3. DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO IN VITRO DI MSC DA UCB	52
3.1 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU PLASTICA NON TRATTATA	52
3.2 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRIGEL TM	54
3.3 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRICE ACELLULARE OMOLOGA	56

4. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE MSC DA UC	59
5. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO E OSTEOGENICO	
<i>IN VITRO</i> DI MSC DA UC	62
5.1 <i>INDUZIONE ADIPOGENICA</i>	62
5.2 <i>INDUZIONE OSTEOGENICA</i>	63
6. DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO <i>IN VITRO</i> DI MSC DA UC	63
6.1 <i>DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU PLASTICA NON TRATTATA</i>	63
6.2 <i>DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRIGELTM</i>	66
6.3 <i>DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRICE ACELLULARE</i>	
<i>DI FEGATO</i>	69
7. DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO DI MSC DA UC:	
CONFRONTO TRA I DIVERSI SUPPORTI	72
8. VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' RIGENERATIVA <i>IN VIVO</i>	
DELLE MSC DA UC	74
DISCUSSIONE	77
CONCLUSIONI	85
BIBLIOGRAFIA	87

RIASSUNTO

Il trapianto di fegato rappresenta l'unica opzione terapeutica per malattie croniche del fegato in fase terminale e in casi selezionati di insufficienza epatica acuta. Esiste ancora tuttavia un notevole divario fra le donazioni d'organo ed il numero di pazienti in lista d'attesa, divario che ha portato alla ricerca di terapie alternative.

In questo contesto le cellule staminali potenzialmente potrebbero svolgere un ruolo di primaria importanza nella terapia cellulare.

Tra i vari tipi di cellule staminali, le cellule mesenchimali risultano particolarmente interessanti, in quanto possono essere isolate non solo da vari tipi di tessuti adulti, ma anche da tessuti di derivazione fetale, quali cordone, sangue cordonale e placenta, e possono essere indotte a differenziarsi in numerosi tipi cellulari diversi. Tuttavia, soprattutto per quanto riguarda le cellule isolate da tessuti di derivazione fetale, non è ancora completamente chiarito il reale potenziale proliferativo e differenziativo.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di isolare una popolazione di cellule con caratteristiche mesenchimali da cordone ombelicale (UC) e sangue cordonale umano (UCB).

Una volta verificata *in vitro* la loro capacità di differenziare in cellule di origine mesodermica (adipociti e osteoblasti), è stata testata la loro capacità di differenziare verso la linea epatocitaria utilizzando un terreno contenente fattori di crescita epatogenici e come supporto per le colture due diverse matrici extracellulari o la plastica non trattata. Infine è stata valutata la capacità di engraftment *in vivo* delle MSC isolate da UC in un modello di danno acuto indotto da CCl₄.

Le cellule staminali mesenchimali isolate hanno mostrato la capacità di rispondere agli stimoli differenziativi epatogenici sovregolando l'espressione di marcatori epatici. In particolare le cellule isolate da UC hanno evidenziato la capacità di differenziare in cellule simil-epatocitarie funzionali come dimostra la positività alla colorazione PAS per l'accumulo di glicogeno e il saggio ELISA per la produzione di albumina. I risultati ottenuti dimostrano che il differenziamento non necessita dell'utilizzo di nessuna matrice extra-cellulare come supporto per la crescita delle cellule e il mantenimento della loro funzionalità nel tempo come invece avviene per gli epatociti maturi messi in coltura.

Inoltre le MSC da UC somministrate ad animali sottoposti a danno epatico acuto da CCl₄, hanno dimostrato di contribuire alla rigenerazione completa dell'organo, anche se il meccanismo d'azione resta ancora da indagare.

La dimostrazione *in vitro* della plasticità delle MSC da UC e UCB non solo verso la linea mesodermica ma anche verso la linea endodermica e la loro capacità *in vivo* di contribuire alla rigenerazione epatica, rappresenta un risultato utile sulla futura applicazione di tali cellule nella terapia delle malattie epatiche acute e croniche. Inoltre, essendo completamente accessibili, privi di qualsiasi implicazione etica e di rischio nella raccolta, il sangue cordonale e il cordone ombelicale potrebbero diventare due fonti di elezione per l'ottenimento di cellule staminali multipotenti.

SUMMARY

Liver transplantation remains the only therapeutic option for most of acute and chronic end-stage liver diseases, but its use is limited by a severe shortage of donor organs for transplantation.

In this context the use of stem cells in cell therapy can be considered a promising therapeutical approach instead of liver transplantation.

In particular, mesenchymal stem cells (MSCs) can be obtained from several adult tissues and from fetal-derived tissues, such as umbilical cord (UC), umbilical cord blood (UCB) and placenta, and they can be induced to differentiate into several cell types. Nevertheless, proliferative and differentiative potential of these cells has not yet been explained; particularly differentiative potential of fetal-derived tissue cells remains to be investigated.

In this study, umbilical cord blood (UCB) and umbilical cord (UC) have been evaluated as potential sources of MSCs.

For this purpose, the proliferative potential and plasticity of MSC isolated from UC and UCB to differentiate into adipogenic and osteogenic lineages *in vitro* were been investigated. After establishing of MSCs plasticity, the cells were differentiated *in vitro* towards hepatocyte-like cells, evaluating different biological supports for cell growth and differentiation. Finally, in view of clinical applications, the engraftment of these cells in a model of acute CCl₄-induced liver injury has been verified.

MSCs were capable of differentiating into hepatocyte-like cells as demonstrated by progressive up-regulation of mature hepatocyte markers. In particular the MSCs isolated from UC seem to acquire the features of mature hepatocyte as demonstrated by glycogen storage and albumin secretion. All finding suggested that these cells can grow and differentiate into functional hepatocyte-like cells without any biological support, whereas mature hepatocytes need a three-dimensional scaffold in order to maintain their viability and functional features.

Finally the MSCs from human UC seem to contribute to liver regeneration by enhancing the reparative activity of hepatocytes that spontaneously occurs after injury, even if the mechanism of their action is not known.

The establishment *in vitro* of the plasticity of UCB and UC not only towards mesodermal lineage cells but also towards endodermal lineage cells and the *in vivo*

Summary

contribution of these cells to regenerate liver tissue, support their future application for cell therapy in acute and chronic liver disease. Moreover, due to availability, safety in the collection and lack of ethical issues, UCB and UC may become elective sources of multipotent MSC.

INTRODUZIONE

1. CELLULE STAMINALI

1.1 DEFINIZIONE E CARATTERISTICHE GENERALI

L'embriogenesi è il processo durante il quale da un singolo ovocita fecondato derivano differenti tipi cellulari che, proliferando, danno origine ad organi e tessuti. Alla fine di tale processo quindi si avrà un organismo multicellulare le cui cellule e tessuti differenziati sono destinati a svolgere specifiche funzioni in diversi organi del corpo. Molti degli organi e dei tessuti che costituiscono un organismo adulto vanno incontro ad un processo conosciuto come omeostasi, durante il quale nuove cellule sostituiscono quelle che muoiono per morte naturale o in seguito ad un danno.

Questa capacità di rigenerare cellule e tessuti ha origini risalenti ad organismi primitivi come le spugne e gli idrozoi e si è mantenuta nel corso dell'evoluzione in forme e gradi diversi: ad esempio negli uccelli le cellule neuronali del cervello sono in grado di rigenerarsi mentre in alcuni anfibi questa capacità è addirittura estesa ad un intero arto o alla coda. Nei mammiferi invece possiamo ritrovare questa capacità solamente in alcuni organi come ad esempio nel fegato che può rigenerare in parte in seguito ad una lesione non troppo grave, o nell'epidermide che può riparare in seguito ad una ferita o ancora nei capelli che possono ricrescere dopo essere stati tagliati. Inoltre l'epidermide, i capelli, il piccolo intestino e il sistema ematopoietico sono tutti esempi di tessuti adulti con un alto turn-over cellulare: anche in assenza di un danno questi tessuti originano continuamente nuove cellule, capaci di dividersi, differenziarsi e poi morire.

La capacità di un embrione di dare origine a tutti i tessuti dell'organismo adulto e la capacità di alcuni tessuti adulti di rigenerare durante tutta la vita è dovuta alla presenza di una particolare popolazione cellulare: le cellule staminali.

Una cellula staminale viene definita come una cellula non specializzata che ha la capacità di moltiplicarsi indefinitamente mediante divisioni cellulari e che, se sottoposta ad appropriati stimoli, è in grado di differenziarsi in cellule mature con specifiche funzioni. Inoltre, ogni singola cellula staminale deve essere in grado di dividersi in maniera asimmetrica generando così oltre che una cellula che andrà incontro a differenziamento anche ad una linea cellulare geneticamente uguale a se stessa, chiamata clone.

Cellule staminali di origine diversa possiedono un diverso grado di potenzialità differenziativa.

L'unica cellula totipotente in grado cioè di dare origine a tutti i tessuti embrionali ed extraembrionali è lo zigote, originato dalla fusione del gamete maschile con il gamete femminile. Dopo diversi cicli di divisioni cellulari, le cellule che derivano dallo zigote, all'inizio tutte uguali, differenziano nel trofoblasto, da cui origineranno placenta e tessuti extraembrionali, e nella massa cellulare interna, che formerà l'embrione. Le cellule della massa cellulare interna sono definite come pluripotenti, cioè in grado di differenziare in cellule appartenenti a tutti i tessuti dell'organismo, quindi di derivazione mesodermica, endodermica e ectodermica, fatta eccezione per i tessuti extraembrionali. Vengono invece definite multipotenti perché capaci di dare origine ad un numero limitato di cellule differenziate, le cellule staminali presenti negli organi, quindi in tessuti adulti, che garantiscono all'organo un elevato potenziale rigenerativo anche in seguito ad un danno. In alcuni tessuti adulti sottoposti a continuo rinnovamento, quali ad esempio gli epitelii, sono presenti anche cellule staminali definite unipotenti, che possiedono cioè capacità di dare origine ad un solo tipo cellulare appartenente al tessuto di residenza [*Stocum DL, 2001; Report NHI, 2001*].

Le cellule staminali possono anche essere suddivise a seconda del tipo di tessuto di derivazione in due categorie: le cellule staminali embrionali che vengono isolate dalla massa cellulare interna della blastocisti prima dell'impianto in utero e le cellule staminali adulte ottenute da qualsiasi tessuto di un organismo dopo la nascita.

L'elevato potenziale differenziativo *in vitro*, necessario per l'ottenimento di un numero di cellule sufficienti per una eventuale terapia e soprattutto le prospettive sul differenziamento verso linee cellulari diverse, fanno delle cellule staminali un interessante candidato per il trattamento di un vasto spettro di patologie per cui gli approcci tradizionali sono inefficaci.

1.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC) derivano dalla massa cellulare interna (MCI) della blastocisti, allo stadio di sviluppo embrionale che precede l'impianto *in utero*. La blastocisti si presenta come una sfera suddivisibile in una parte chiamata trofoblasto, che costituisce lo strato esterno, una porzione interna cava e riempita di fluido, chiamata blastocele, e in una terza parte detta MCI le cui cellule sono in grado di proliferare indefinitamente senza andare incontro a processi di

differenziazione e mantenendo un cariotipo normale e diploide. Individualmente queste cellule sono in grado di dare origine a cellule germinali e a tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma), sia *in vivo* che *in vitro* mediante appropriate condizioni di coltura. Alcune colture di cellule embrionali di pesci, uccelli ed alcune varietà di mammiferi sono già di uso comune nella ricerca [Pain *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1998].

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

Le colture di ESC umane vengono ottenute da blastocisti originate in seguito a pratiche di fecondazione assistita, inutilizzate e congelate, oppure da cellule germinali primordiali provenienti da embrioni di 5-9 settimane [Thomson *et al.*, 1998; Shambloot *et al.*, 1998]. La metodologia di isolamento delle ESC è rimasta pressoché invariata dai primi anni in cui venivano condotti questi studi e consiste nella rimozione del trofoblasto esterno della blastocisti che lascia scoperta la massa cellulare interna poi piastrata su un feeder layer di cellule mitoticamente inattive.

Le ESC presentano un distintivo profilo antigenico caratterizzato da elevati livelli di espressione di antigeni embrionali, quali SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 [Henderson *et al.*, 2002] fosfatasi alcalina oltre che presentare elevati livelli di telomerasi, una ribonucleoproteina responsabile del mantenimento della lunghezza delle sequenze telomeriche durante le divisioni cellulari e quindi dell'elevata capacità proliferativa di queste cellule [Thomson *et al.*, 1998]. Infatti mentre le linee cellulari somatiche diploidi che non esprimono questo enzima a livelli abbastanza elevati entrano in senescenza replicativa dopo circa 50/80 population doublings, le ESC possono essere coltivate *in vitro* per lunghi periodi di tempo anche oltre 2 anni superando 300-450 population doublings.

La pluripotenza che contraddistingue questa popolazione cellulare è stata dimostrata *in vivo* iniettando le ESC in una blastocisti di ratto, dove hanno contribuito alla formazione di tutti i tessuti dando origine ad un embrione chimerico [Smith 2001]. Il mantenimento della pluripotenzialità richiede l'espressione di alcuni fattori di trascrizione: in particolare OCT-3, OCT-4 (Octamer-binding transcription factor) e Nanog sono considerati i principali responsabili della pluripotenzialità, anche se recenti studi hanno individuato set di numerosi geni (fino a 92) [Bhattacharya *B et al.*, 2004] espressi solo in linee cellulari umane embrionali indifferenziate.

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. Tuttavia poiché non è ancora chiaro il rischio di tumorigenicità indotto dal trapianto di tali cellule e soprattutto poiché il processo di estrazione di queste cellule necessita della distruzione dell'embrione, in Italia come in molti altri Paesi, motivi di ordine etico e legislativo (Legge del 19 febbraio 2004, n°40 Art. 13) impediscono la sperimentazione di embrioni umani. Per questo motivo è stato necessario ricercare una sorgente di cellule staminali alternativa, come sono le cellule staminali da tessuto adulto.

1.3 CELLULE STAMINALI ADULTE

Le cellule staminali adulte (Adult Stem Cell, ASC) a differenza delle staminali embrionali, sono poche, solitamente raggruppate e localizzate in "nicchie" e difficili da isolare in gran numero da un organo [*Spradling et al., 2001*]. Vengono isolate da tessuti ed organi specializzati e sono tradizionalmente classificate come cellule staminali multipotenti: sono cioè in grado di differenziare in un numero limitato di tipi cellulari adulti. Esse, infatti, danno principalmente origine a nuove cellule proprie del tessuto dove risiedono, mantenendo, così, il normale ricambio cellulare e l'omeostasi dell'organo. In caso di danno possono anche contribuire alla rigenerazione tissutale con cellule di nuova formazione. Ciascun tessuto pertanto sembra possedere una popolazione staminale residente che contribuisce al mantenimento del tessuto [*Fortier et al., 2005*].

Questo tipo cellulare è l'unico ad essere fino ad ora usato a scopo terapeutico. Il loro studio comincia dopo la II guerra mondiale, osservando gli effetti che l'irradiazione aveva provocato sui residenti di Hiroshima e Nagasaki. Quella parte di cittadini che non era deceduta immediatamente per l'esposizione all'irradiazione, moriva lentamente per l'insorgenza di infezioni e disturbi coagulativi provocati dall'insufficienza midollare. Nel 1956 il primo trapianto di midollo osseo nel topo irradiato ha dimostrato che nel midollo sono contenute cellule staminali [*Thomas, E. D et al., 1957*]. L'individuazione di tali cellule risale al 1961 [*Till, J. E. et al., 1961*] e fino ad oggi l'utilizzo di queste cellule con il trapianto midollare rappresenta l'unica cura definitiva di numerose malattie ematopoietiche.

Nel corso degli anni sono stati individuati diversi tipi di cellule staminali adulte nei numerosi tessuti. Oggi si considera che queste cellule si possono trovare nel midollo osseo, sangue periferico, cervello, fegato, milza, cute, muscolo scheletrico, tratto gastrointestinale, pancreas, occhio, polpa dentale, tessuto adiposo, placenta, cordone ombelicale e sangue cordonale [Markov *et al.*, 2007] e, secondo quanto recentemente scoperto, anche nel liquido amniotico [De Coppi *et al.*, 2007].

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 (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che hanno la capacità di ricostruire l'intero sistema ematopoietico in quanto da esse derivano tutti gli elementi corpuscolari del sangue: eritrociti, piastrine, granulociti, monociti e linfociti (B; T; NK). Le HSC sono state riconosciute come cellule staminali più di 50 anni fa [Till *et al.*, 1961] e sono utilizzate ormai da anni nel trattamento di numerosi disordini ematologici. Possono venire isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal sangue del cordone ombelicale.

Di origine mesodermica sono anche le cellule staminali del muscolo scheletrico, dette cellule satellite. 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. Tali cellule normalmente non si dividono ma fungono da popolazione cellulare di riserva che in seguito a danno muscolare, è in grado di proliferare e ricapitolare il programma di differenziazione muscolare fino a differenziarsi in miofibre [Hansen-Smith *et al.*, 1979; Jones *et al.*, 1982].

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

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

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

Nel fegato le cellule staminali residenti sono le cellule ovali (o Liver Progenitor Cells, LPC) che si trovano localizzate nell'epitelio dei canali di Hering. Tali cellule sono bipotenti in quanto possono differenziarsi in epatociti e colangiociti, cellule epiteliali del dotto biliare. Esse risultano positive per OC-2 (Oval Cell 2), OV-6 (rat oval cell marker 6) e per marker caratteristici degli epatoblasti come l' α -fetoproteina, la γ -glutamyltranspeptidasi [Thorgeirsson SS, 1996].

1.4 CELLULE STAMINALI ADULTE E PLASTICITA'

Di recente introduzione per le cellule staminali adulte è il concetto di plasticità che indica la capacità delle cellule staminali adulte di differenziare in tipi cellulari diversi non solo da quelli del tessuto nel quale risiedono ma anche di diversa derivazione embrionale.

E' stato infatti dimostrato che, se messe nelle giuste condizioni, le staminali adulte possono oltrepassare i limiti differenziativi del tessuto in cui hanno sede, e differenziare in tipi cellulari appartenenti ad altri organi. Ad esempio le cellule staminali neuronali (NSC) possono intraprendere vari iter differenziativi: se trapiantate in topi irradiati possono ricostituire l'intero sistema ematopoietico [Bjorson *et al.*, 1999], possono generare cellule muscolari scheletriche *in vivo*, dopo trapianto nel muscolo scheletrico, o *in vitro*, se messe in co-cultura con mioblasti [Galli *et al.*, 2000]. Inoltre, se iniettate nella blastocisti murina o in embrioni di pollo, possono contribuire alla formazione di più tessuti derivanti da diversi foglietti germinativi [Clarke *et al.*, 2000].

Evidenze di plasticità sono state ottenute anche per le cellule staminali muscolari, che sono in grado di dare colonie di cellule ematopoietiche [Jackson *et al.*, 1999; Asakura *et al.*, 2002], e per le cellule staminali della cute. Queste ultime, se iniettate nella blastocisti di topo, sono in grado di differenziare in cellule di origine mesenchimale, ectodermica e delle creste neurali [Liang *et al.*, 2002].

La popolazione di cellule staminali adulte sulle quali si sono prodotti più studi per approfondire il fenomeno della plasticità, sono le cellule staminali che derivano dal midollo osseo (Bone Marrow-Derived Stem Cells o BMDSC). Le BMDSC sono un

gruppo di cellule staminali eterogeneo composto da cellule staminali ematopoietiche e cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells o MSC). Il midollo osseo, però, rappresenta anche una fonte di cellule staminali endoteliali (Endothelial Progenitor Cells o EPC) e di una nuova popolazione di cellule staminali chiamate MAPC (Multipotent Adt Progenitor Cells), che sembra sia in grado di differenziare in cellule provenienti da mesoderma, ectoderma ed endoderma [Jiang et al., 2002]. E' stato dimostrato che le BMDSC sono in grado di differenziare in molti tipi cellulari diversi: possono dare origine a cellule muscolari scheletriche [Ferrari et al., 1998], a precursori degli osteoblasti [Olmest-Davis et al., 2003], a cellule endoteliali [Gulati et al., 2003], e secondo alcuni autori, anche a cardiomiociti [Orlic et al., 2001]. Ma le potenzialità differenziali delle BMDSC vanno oltre le linee cellulari di derivazione mesodermica: queste cellule staminali possono infatti dare origine a cellule neuronali [Mezey et al., 2003], a cellule epiteliali [Krause et al., 2001] e a cellule epatiche [Alison MR et al., 2000; Schwartz et al., 2002].

La plasticità delle cellule staminali derivanti da tessuti dell'adulto che potrebbe rivelarsi utilissima per la ricostruzione di tessuti specifici, la loro capacità rigenerativa ed il fatto che, essendo cellule autologhe, non evocerebbero la risposta immunitaria in caso di trapianto ha reso questo tipo di cellule preferibili alle cellule staminali embrionali.

Inoltre data la loro origine non sollevano questioni di natura etica.

2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

2.1 DEFINIZIONE E CARATTERISTICHE PRINCIPALI

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) sono una popolazione di cellule staminali adulte non ematopoietiche, self-renewal, con caratteristiche di multipotenzialità, presenti in maggior percentuale nello stroma del midollo osseo e differenziabili in vari tipi di cellule di origine mesodermica quali condrociti, osteoblasti, adipociti e mioblasti [Dominici et al., 2006]. Le MSC poste in coltura sono facilmente identificabili in quanto formano colonie di cellule aderenti caratterizzate dalla tipica morfologia fibroblastoide.

In laboratorio possono essere isolate, espanse (in quanto possiedono elevato potenziale proliferativo) e indotte a differenziare mediante l'utilizzo di terreni specifici [Ippokratis et al., 2005] non solo in cellule di origine mesodermica ma anche in cellule neuronali [Kim et al., 2006] ed epatociti [Lee et al., 2004] *in vitro* e *in vivo*.

Le MSC hanno quindi attirato l'attenzione per sviluppare future terapie cellulari e geniche per diversi motivi: 1) sono facilmente ottenibili da tessuti adulti e quindi il loro utilizzo non presenta problematiche di carattere etico, a differenza delle 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) [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]. Inoltre la plasticità mostrata da tali cellule può essere sfruttata nell'ambito della medicina rigenerativa per lo sviluppo di protocolli clinici applicativi di terapia cellulare e in particolare per la completa rigenerazione di tessuti danneggiati.

Negli anni sono stati indagati quattro diversi metodi di utilizzo delle MSC per una potenziale applicazione clinica delle stesse cellule: l'impianto delle MSC direttamente in sede di danno, la somministrazione sistemica, la combinazione della terapia cellulare con la terapia genica e l'utilizzo delle MSC in protocolli di ingegneria tissutale.

Alcuni studi effettuati sugli animali hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo delle MSC nel trattamento di difetti dell'osso [Bruder *et al.*, 1994; Ohgushi *et al.*, 1989]. Questi risultati sono stati confermati anche nell'uomo in trial clinici dove sono state iniettate con successo in sede di danno MSC autologhe espanse *ex vivo* in pazienti affetti da patologie ossee [Quarto *et al.*, 2001].

Il potenziale terapeutico delle MSC somministrate per via sistemica è stato dimostrato in pazienti affetti da sindrome di Hurler [Koc *et al.*, 2002] e in bambini affetti da *osteogenesis imperfecta* [Horwitz *et al.*, 1999; 2001; 2002]. Questi studi hanno evidenziato non solo la capacità di engraftment delle MSC a livello delle ossa ma anche la loro capacità di differenziare in osteoblasti attivi. Inoltre nei bambini trattati è stato constatato un aumento dell'altezza e della densità minerale totale delle ossa. Purtroppo però il numero delle cellule che è riuscito a colonizzare il tessuto osseo è stato molto e i pazienti hanno quindi dovuto ricevere anche delle altre terapie che hanno così reso difficile la determinazione del reale contributo delle MSC al positivo esito clinico.

Le MSC sono state anche somministrate in combinazione con le HSC per aumentare la capacità di homing di queste ultime nel midollo osseo [Koc *et al.*, 2000].

La combinazione della terapia genica con la terapia cellulare utilizzando le MSC costituisce un'attraente alternativa all'utilizzo delle cellule somatiche in quanto le MSC hanno un maggiore potenziale replicativo e una sopravvivenza superiore. Le MSC

possono quindi essere utilizzate come trasportatori di geni o proteine all'interno di organi e tessuti che necessitano di una particolare terapia genica. MSC esprimenti BMP-2 (Bone Morphogenic Protein 2) sono state utilizzate con successo per la rigenerazione ossea e della cartilagine articolare in diversi modelli animali [Gelse et al., 2003; Park et al., 2003]. Infine l'ingegneria tissutale potrebbe rappresentare un ulteriore campo di applicazione delle MSC per ottenere tessuti ed organi utili per il trapianto data la scarsa disponibilità di organi e i limiti dovuti alle reazioni di rigetto. Con le tecniche di ingegneria tissutale infatti le cellule stesse del paziente, una volta prelevate, potrebbero essere seminate su uno scaffold biodegradabile per formare un particolare tessuto [Stock et al., 2001].

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

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

Anche se il midollo osseo è stato considerato la fonte più accessibile e ricca di cellule staminali mesenchimali [Tuli et al., 2003], queste sono state isolate a partire da numerosi tessuti quali cartilagine, periostio, liquido sinoviale, muscolo e tendine. E' stata inoltre riportata la presenza di popolazioni cellulari con caratteristiche sovrapponibili a quelle mesenchimali nei tessuti fetali, placenta, sangue cordonale e tessuto adiposo [In't Anker et al., 2003; Hu et al., 2003; In't Anker et al., 2004; Dicker et al., 2005].

Sin dal lavoro di Castro-Malaspina e colleghi del 1980 [Castro-Malaspina H et al., 1980] molti ricercatori hanno impiegato diversi metodi per isolare MSC e hanno sviluppato nuovi approcci per la loro purificazione. La capacità di aderire alla plastica delle piastre formando colonie di cellule di morfologia fibroblastoide (CFU-F) [Caplan AI, 1991] è ancora oggi considerato un sistema per isolare MSC da diversi tessuti adulti. Tuttavia manca una definizione unica di MSC e le diverse metodologie usate per coltivare e caratterizzare tipi cellulari riconducibili alle MSC hanno portato alla conoscenza di diversi marcatori di superficie che caratterizzano le MSC.

2.2 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

In seguito ai molti lavori di caratterizzazione che prevedevano lo studio di diversi antigeni di superficie si è riusciti a determinare quali marcatori non vengono espressi dalle MSC. Non è stato invece raggiunto un consenso generale per quanto riguarda la determinazione di un marcatore positivo che possa essere impiegato per identificarle in maniera inequivocabile.

E' generalmente accettato che nell' uomo adulto tali cellule non esprimono i marcatori ematopoietici come: CD11 (granulociti), CD14 (macrofagi); CD34 (marcatore precoce di staminali ematopoietiche), CD45 (cellule ematiche); non esprimono i marcatori endoteliali come il CD31 ed esprimono invece alcuni marcatori stromali quali: CD29, CD44, CD71 (recettore per la Transferrina), CD73 (SH3/4, 5' nucleotidasi), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2, endoglina), CD106 (VCAM-1, molecola di adesione per cellule vascolari) e CD166 (ALCAM, molecola di adesione per leucociti) [Chamberlain *et al.*, 2007]. Avere una precisa caratterizzazione delle MSC è complicato anche dal fatto che questo stesso tipo cellulare proveniente da specie diverse può esprimere antigeni diversi come ad esempio l'espressione del CD34 nelle MSC da topo [Peister *et al.*, 2004]. Inoltre molti marcatori presentano una grande variabilità di espressione a seconda del tessuto e dal metodo di isolamento delle MSC: è stato riportato che Stro-1 è positivo nelle MSC stromali, mentre non risulta essere espresso nelle MSC del sangue periferico [Kuznetsov *et al.*, 2001]. Nel tentativo di identificare un marcatore positivo definitivo, tale lista è destinata ad accrescersi comprendendo nuovi marcatori che mano a mano si scoprono essere espressi dalle MSC.

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

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

Tabella 1: ^aAntigeni scelti se testati in almeno 4 popolazioni di MSC; ^bnumero di popolazioni di MSC (isolate da vari tessuti umani o di topo) positive (+), per lo più positive (+/-), o negative (-); ^cMSC isolate principalmente da midollo osseo ma anche da tessuto adiposo, pelle, timo, reni, muscolo, fegato, polmoni e placenta.

2.3 LUNGHEZZA DEI TELOMERI E ATTIVITA' TELOMERASICA

In tutti gli stadi dello sviluppo del corpo umano le cellule staminali giocano un importante ruolo dovuto all'alta attività mitotica che permette loro di generare un gran numero di cellule figlie. Data questa notevole capacità proliferativa, le cellule staminali vanno incontro ad un elevato numero di replicazioni che potrebbero portare all'insorgenza di problemi legati alla replicazione come l'accorciamento dei telomeri. I telomeri sono strutture specializzate composte da particolari sequenze di DNA (ripetizioni tandem di TTAGG) e da specifiche proteine telomeriche localizzate alle estremità di tutti i cromosomi. Ad ogni ciclo cellulare queste estremità vengono progressivamente accorciate in quanto la macchina replicativa della cellula non riesce a replicare la parte distale dei cromosomi con la conseguente perdita di 100-150 paia di basi di DNA ad ogni replicazione [Hastie *et al.*, 1990]. In alcuni tipi cellulari la perdita

dei telomeri è controbilanciata dall'attività dell'enzima telomerasi che provvede al contrario all'allungamento dei telomeri stessi [Blackburn *et al.*, 1989; Greider *et al.*, 1987].

Il più importante tipo cellulare che mostra un'alta attività telomerasica è costituito dalle cellule germinali [Cross *et al.*, 1989; Allsopp *et al.*, 1992]. Dopo i primi stadi dell'embriogenesi, però, l'espressione dell'enzima viene down-regolata in molte delle cellule che costituiranno il corpo umano e conseguentemente i telomeri si accorceranno progressivamente durante la vita dell'individuo [Frenck Jr *et al.*, 1998; Rufer *et al.*, 1999]. Soltanto in alcuni particolari tipi cellulari, come la mucosa intestinale, le cellule della pelle e i linfociti [Dhaene *et al.*, 2000; Smogorzewska *et al.*, 2004], può essere riscontrata una modesta attività telomerasica che invece è caratteristica delle cellule del cancro che in questo modo acquisiscono una indefinita capacità proliferativa [Counter *et al.*, 1994; De Lange *et al.*, 1994].

Considerando il fatto che le cellule staminali adulte hanno un'alta capacità proliferativa, si potrebbe pensare che esse possano esprimere anche un'alta attività telomerasica. Nella tabella 2 sono riassunti i risultati di diversi gruppi che hanno condotto studi sull'espressione della telomerasi e del mantenimento della lunghezza dei telomeri nelle cellule staminali. Se c'è un generale accordo nei risultati riguardanti l'alta espressione della telomerasi nelle cellule staminali embrionali, il quadro è meno chiaro per le cellule staminali adulte. Tuttavia il basso livello di espressione della telomerasi e il relativo accorciamento dei telomeri di queste ultime potrebbe suggerire che questa condizione sia sufficiente per una proliferazione cellulare "normale", ma che in seguito a situazioni di malattia o danno, la cellula staminale adulta sia in grado di attivare l'espressione della telomerasi e la possibilità di numerose replicazioni senza la perdita di materiale genetico. Probabilmente la scarsa lunghezza dei telomeri nelle cellule staminali adulte può essere interpretata come una difesa dall'insorgenza e lo sviluppo di eventuali tumori. Questa potrebbe essere la ragione dell'esistenza di uno stretto bilanciamento tra domanda replicativa ed espressione della telomerasi nelle cellule staminali adulte.

Stem cells	Telomerase activity	Differentiation
Embryonic	High	All cells/tissues
Germ line	High	Sperm and eggs, and ultimately contribution to every cell type
Hematopoietic	Low/absent	All the blood cell types: red blood cells, B lymphocytes, T lymphocytes, natural killer cells, neutrophils, basophils, eosinophils, monocytes, macrophages, platelets
Mesenchymal	Low/absent	Bone, cartilage, adipose, muscle, neuronal like cells, endothelial cells
Neuronal	Low/absent	Astrocyte, oligodendrocyte
Epidermal	Low	Keratinocytes
Epithelial (intestinal crypts)	Low/absent	Absorptive cells, goblet cells
Follicular	Low	Hair follicle, epidermis
Adrenal cortex	Low/absent	Specialised adrenal, cortical cells
Kidney	Low/absent	Nephrons
Pancreatic	Low	Ductal epithelial cells

Tab. 2 : Attività telomerasica nelle cellule staminali adulte [Serakinci N. et al., 2008].

2.4 SANGUE CORDONALE (UCB) E CORDONE OMBELICALE (UC) UMANO COME FONTI DI MSC

Da quando nel 1988 è stato utilizzato per la prima volta con successo per curare un paziente affetto da anemia di Fanconi [Gluckman E et al., 1989], è ormai diventato evidente che il sangue cordonale rappresenta una buona fonte di HSC [Mayani H et al., 1998]. Inoltre a differenza del midollo osseo, che tutt'oggi rappresenta la fonte principali di cellule staminali, l'UCB presenta diversi vantaggi nel suo utilizzo: a parità di volume è più ricco di cellule ematopoietiche; è più tollerato per quanto riguarda i mismatches di HLA, quindi presenta minor rischio di rigetto (Graft Versus Host Disease, GVHD); inoltre la sua raccolta non è invasiva.

Recentemente l'UCB insieme ad altri tessuti di derivazione fetale quali cordone ombelicale e placenta è stato preso in considerazione anche come fonte di MSC.

Tali tessuti rappresentano una fonte ideale di cellule in quanto la loro raccolta non comporta procedure invasive e non solleva questioni etiche, ma avviene al momento del parto in totale sicurezza sia per la madre che per il neonato.

Il cordone ombelicale deve il suo sviluppo all'espansione della cavità amniotica che progressivamente circonda quasi completamente l'embrione obliterando lo spazio precedentemente occupato dal mesoderma extra-embriionale: in tal modo l'embrione rimane attaccato al corion per mezzo di un peduncolo connettivo di mesenchima, che successivamente si sposta ventralmente, in posizione immediatamente caudale al dotto vitello-intestinale.

Le due strutture alla fine si fondono formando il cordone, che risulta circondato dall'amnios e dalla cavità amniotica: dalla metà del quinto mese di gestazione i resti del dotto vitello-intestinale, del sacco vitellino e del rivestimento del celoma extraembriionale scompaiono, mentre rimane il rivestimento da parte dell'amnios.

Nel cordone vengono comprese due arterie ombelicali e una vena ombelicale: le arterie convogliano verso la placenta sangue fetale a basso contenuto di ossigeno, mentre la vena porta sangue ossigenato al feto.

I vasi sanguigni sono circondati dalla gelatina di Wharton, residuo del mesoderma extraembriionale, ricca di mucopolisaccaridi e di mastociti. L'inserzione del cordone ombelicale normalmente è situata al centro della placenta, tuttavia nel 7% dei casi l'inserzione è marginale alla placenta e nell'1% è velamentosa, ossia sulle membrane. La lunghezza del cordone dipende dall'intensità dei movimenti attivi fetali: in assenza di mobilità il cordone è corto.

Normalmente al termine della gestazione la lunghezza si aggira attorno ai 50 cm e il diametro è di 1 o 2 cm. Il cordone cresce in forma di spirale, probabilmente a causa delle rotazioni del feto nella cavità amniotica.

Data la loro natura di annessi embriionali si ritiene che UCB e UC possano contenere cellule in stato indifferenziato.

Esistono molte evidenze a favore di questa ipotesi: nell'UC sono stati isolati progenitori mesenchimali sia dallo strato endoteliale/subendoteliale della vena ombelicale [Romanov YA et al., 2003] che dallo stroma cordonale o gelatina di Wharton [Wang HS et al., 2004]. Le indagini finora condotte sull'UCB invece hanno dato esiti controversi: se è ormai appurata la sua capacità di fornire precursori ematopoietici, non è altrettanto chiaro il suo ruolo come fonte di progenitori mesenchimali. Alcuni gruppi di ricerca sostengono la possibilità di isolare con facilità precursori mesenchimali multipotenti dall'UCB [Goodwin HS et al., 2001; Lee OK et al., 2004], mentre altri la considerano una possibilità remota [Mareschi K et al., 2001; Wexler SA et al., 2003].

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

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

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

Anche le cellule da UC hanno dimostrato capacità plastica tipica delle MSC venendo indotte a differenziarsi *in vitro* in osteoblasti ed adipociti [Covas DT *et al.*, 2003] ed anche in epatociti [Campard *et al.*, 2008]. *In vivo* invece hanno dimostrato capacità differenziativa maggiore dando origine a cellule muscolari scheletriche [Conconi MT *et al.*, 2006] e a cellule neuronali [Weiss ML *et al.*, 2003], lasciando intuire che la reale potenzialità di queste cellule probabilmente non è stata ancora indagata nella sua completezza.

3. CELLULE STAMINALI E RIGENERAZIONE EPATICA

Il fegato ha un ruolo centrale nell'omeostasi metabolica essendo responsabile del metabolismo, della sintesi, dello stoccaggio e della distribuzione dei nutrienti; inoltre, produce una considerevole quantità di proteine sieriche come l'albumina, le proteine di fase acuta, i fattori della coagulazione, enzimi e cofattori. Da non dimenticare infine, che il fegato è a tutti gli effetti il principale organo ad azione detossificante, in grado di rimuovere le scorie e gli xenobiotici attraverso processi metabolici e di coniugazione biliare. L'elemento cellulare protagonista della maggior parte delle funzioni svolte dal

fegato è in realtà la cellula parenchimale, o epatocita, che rappresenta oltre l'80% della popolazione cellulare presente nel tessuto. L'altro 20% di elementi cellulari è rappresentato da cellule non parenchimali, quali le cellule endoteliali, le cellule di Kupffer, i linfociti e le cellule stellate.

Le straordinarie capacità rigenerative del fegato dopo danno o chirurgia sono note da millenni, come già riconosciuto dal mito di Prometeo dell'antica mitologia greca.

Gli epatociti, infatti, pur essendo cellule che fisiologicamente presentano un basso turnover cellulare e che si dividono raramente, in seguito ad una lesione sono in grado di rigenerare il tessuto epatico [Fausto N, 2004]. È stato dimostrato che in topi transgenici nei quali gli epatociti residenti vanno incontro a continua distruzione gli epatociti trapiantati erano in grado di replicare anche più di 70 volte con il conseguente ripopolamento dell'organo [Overturf et al., 1997]. Anche gli epatociti maturi umani hanno dimostrato una robusta capacità rigenerativa, ripopolando dopo il trapianto fino al 90% del fegato di topi uPA-SCID [Tateno et al., 2004].

Nell'uomo, però, numerose condizioni patologiche sono tali da compromettere le capacità rigenerative degli stessi epatociti, cosicché in caso di lesione epatica grave come epatopatia cronica, epatite fulminante, epatite virale o steatosi epatica viene attivato un compartimento di cellule staminali allocato a livello delle più piccole diramazioni biliari intraepatiche (Canali di Hering) [Roskams et al., 2003]. Questa risposta, chiamata "risposta delle cellule ovali" o "reazione duttulare", si esprime sia in un aumento della popolazione biliare che in una differenziazione epatocitaria. L'esistenza di cellule staminali nel fegato era già stata postulata più di 40 anni fa quando Wilson & Leduc (1958) hanno avuto l'impressione che le cellule dei colangioli distali dei dotti biliari (canali di Hering) fossero responsabili del ripristino della massa epatica in roditori sottoposti ad una particolare dieta priva di colina [Wilson et al., 1958]. Il termine di "CELLULE OVALI" è stato introdotto per la prima volta da Farber [Farber et al., 1956] descrivendole come cellule di piccole dimensioni con scarso citoplasma lievemente basofilo e il nucleo con una pallida colorazione blu.

Nei roditori le cellule ovali possono essere attivate utilizzando diverse strategie che vanno ad inibire la replicazione degli epatociti residenti generando uno stimolo rigenerativo al danno. Questi modelli prevedono l'utilizzo combinato di diversi agenti chimici come la retrorsina [Gordon et al., 2000], il 2-acetilamino fluorene (AAF) [Evarts et al., 1987], il tetracloruro di carbonio [Petersen et al., 1998], la galattosamina [Lemire et al., 1991], o l'utilizzo di una dieta priva di colina [Akhurst et al., 2001],

oppure un intervento di epatectomia parziale [Evarts *et al.*, 1987]. Le cellule ovali sono risultate positive sia a marcatori di cellule mature come l'albumina, α -fetoproteina, citocheratine (CK) 7, 8, 18 e 19, come ai marcatori di cellule progenitrici come OV6 (ratto), A6 (topo) e G7 [Fausto, 2004]. La positività anche a marcatori delle cellule mesenchimali, come il CD44 e vimentina, ha suggerito l'ipotesi che il processo di transizione epitelio-mesenchimale possa svolgere un ruolo nella loro induzione. [Yovchev *et al.*, 2008; Sicklick JK *et al.*, 2006].

Nell'uomo la popolazione cellulare corrispondente alle cellule ovali murine è localizzate nei duttuli biliari terminali, vicino alla triade portale nella zona 1 dell'acino epatico. Esse costituiscono un compartimento di cellule silenti che possono venire attivate in seguito ad un importante danno epatico. Queste cellule progenitrici esprimono marcatori come EPCAM, NCAM, CD44, claudin e AC133, ma a differenza delle cellule ovali dei roditori, sono risultate negative per l' α -fetoproteina e l'albumina [Schmelzer E *et al.*, 2006; Schmelzer E *et al.*, 2007].

Nonostante quindi la grande capacità del fegato di rigenerare in seguito a danno, questa non è sufficiente in presenza di malattie croniche in fase terminale e in casi selezionati di insufficienza epatica acuta quando l'unica opzione terapeutica è rappresentata dal trapianto di fegato.

Esiste ancora tuttavia un notevole divario fra le donazioni d'organo ed il numero di pazienti in lista d'attesa, divario che ha portato alla ricerca di alternative al trapianto di fegato intero, tra le quali lo "split liver" (ossia la separazione del fegato in due emifegati per due riceventi, generalmente uno pediatrico ed uno adulto), l'utilizzo di organi "non ottimali", il trapianto di epatociti e più di recente, l'uso delle cellule staminali. Nell'ultima decade in particolare si è assistito ad un crescente interesse nell'ambito della ricerca sperimentale sulle cellule staminali, per la potenziale loro applicazione nella terapia delle malattie genetiche e dell'ingegneria tissutale, in particolare, in quella che viene oggi definita medicina rigenerativa, per la ricostruzione di tessuti bioartificiali. L'utilizzo di queste cellule non sarebbe limitato soltanto all'impiego per i trapianti, ma darebbe la possibilità di avere un illimitato numero di cellule epatiche permettendo uno studio più approfondito delle loro proprietà biologiche. Inoltre la cura definitiva per i diversi disturbi metabolici potrebbe essere la somministrazione di epatociti geneticamente manipolati, in grado di sintetizzare l'enzima o il trasportatore mancanti.

Le cellule staminali embrionali potrebbero essere utilizzate nell'ingegneria tissutale e nella terapia cellulare di malattie genetiche per la loro capacità di rigenerarsi e per la loro capacità di differenziarsi in linee cellulari derivate dai tre foglietti embrionali. Tuttavia il processo di estrazione di queste cellule necessita della distruzione dell'embrione. In Italia come in molti altri Paesi, motivi di ordine etico e legislativo (Legge del 19 febbraio 2004, n°40 Art. 13) impediscono la sperimentazione di embrioni umani. Per questo motivo è stato necessario ricercare una sorgente di cellule staminali alternativa, come sono le cellule staminali da tessuto adulto.

Negli ultimi anni infatti molti lavori hanno suggerito che ci sia un coinvolgimento nella rigenerazione epatica anche di cellule staminali extra-epatiche [Alison *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 2003; Lagasse *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 1999]. Studi condotti su cellule da midollo osseo hanno infatti evidenziato che sia le HSC che le MSC possono differenziare in epatociti [Shu SN, *et al.*, 2004]. Nel caso delle HSC sarebbe in particolare la frazione CD34 positiva a possedere capacità epatocitaria [Theise ND *et al.*, 2000; Fiegel HC *et al.*, 2003], mentre le MSC sono in grado di differenziare in cellule simil epatiche sia *in toto* [Lee KD *et al.*, 2004] che nella frazione multipotente costituita dalle MAPC [Schwartz RE *et al.*, 2002]. I risultati ottenuti sono però in contrasto con quelli di altri gruppi che hanno chiaramente dimostrato che il livello di ripopolamento epatocitario dopo trapianto da midollo osseo è molto basso (< 0.01%) anche se gli epatociti derivanti dal differenziamento delle cellule da midollo ha un vantaggio selettivo nella crescita [Cantz *et al.*, 2004; Kanawa *et al.*, 2003; Wagers *et al.*, 2003]. Inoltre in molti casi più che un vero e proprio differenziamento sembra essere avvenuta la fusione con gli epatociti dell'ospite [Alvarez-Dolado *et al.*, 2003; Quintana-Bustamante *et al.*, 2006; Vassilopoulos *et al.*, 2003].

Anche dall'UCB mediante l'utilizzo in coltura di specifici fattori di crescita, quali FGF-4 (Fibroblast Growth Factor 4) e HGF (Hepatocyte Growth Factor), sono state isolate MSC capaci di differenziare in cellule simil epatiche *in vitro* in grado di produrre urea, secernere albumina, AFP e Ck-18 (sono indici della attività metabolica epatocitaria) e di immagazzinare il glicogeno [Xin-Qin Kang *et al.*, 2005]. Inoltre, durante la trasformazione in epatociti, queste cellule hanno acquisito altri marcatori della linea epatocitaria come Thy-1, Flt-3 e c-Kit.

Invece la capacità di tali cellule di differenziare *in vivo* è stata testata per lo più in modelli animali di danno epatico, in quanto il danno indurrebbe le cellule staminali a migrare verso il sito del tessuto danneggiato e a differenziare nel tipo cellulare colpito.

Numerosi studi sono stati condotti con varie selezioni di cellule da UC e da UCB trapiantate in diversi modelli animali di danno: epatectomia, danno da agente chimico quale alcool allilico o tetracloruro di carbonio, o combinazione di questi due tipi di danno seguiti da somministrazione di cellule cordonali, portando ad interessanti esiti [Kakinuma *et al.*, 2003; Piscaglia *et al.*, 2005; Di Campli *et al.*, 2005; Campard *et al.*, 2008].

Tuttavia i meccanismi che regolano la conversione delle cellule trapiantate in cellule con caratteristiche di epatocita non sono ancora chiari. Attualmente sono state prese in considerazione due possibili vie che portano alla generazione di epatociti a partire da MSC da sangue cordonale: la fusione delle cellule con l'epatocita [Alvarez Dolado *et al.*, 2003] e la transdifferenziazione delle cellule dipendente non soltanto dalle proprietà intrinseche delle cellule ma anche dal microambiente.

Questi risultati offrono lo spunto per ricerche future orientate alla possibilità di utilizzare non solo le singole cellule come già avviene ad esempio per la terapia genica, ma di stimolare la loro organizzazione in una struttura tridimensionale che possa sostituire un organo, utilizzando tecniche di ingegneria tissutale.

Ad esempio importante per la coltura di epatociti, oltre che ai fattori di crescita specifici, è la presenza di un supporto adeguato che dia loro un sostegno meccanico e contribuisca a creare un ambiente che li mantenga funzionali; quindi anche per il differenziamento epatocitario delle cellule staminali si ritiene che il supporto possa svolgere un ruolo chiave.

Come supporti sono già stati utilizzati scaffold di materiale biodegradabile, quali l'acido poliglicolico, l'acido polilattico o non biodegradabili come poliuretano; inoltre componenti purificati della matrice extracellulare (Extracellular matrix, ECM) quali collagene [Weiss *et al.*, 2002], fibronectina [Sanchez. *et al.*, 2000]; peptidi autoassemblanti (PuraMatrix™) [Semino CE *et al.*, 2003], ECM ottenuta da colture cellulari neoplastiche (per esempio Matrigel™) [Richert L *et al.*, 2002] e matrice acellulare omologa [Burra P *et al.*, 2004].

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

Inoltre essa è già stata utilizzata con risultati incoraggianti per la ricostruzione di vari tessuti quali l'uretra [Parnigotto, PP *et al.*, 2000], l'intestino [Parnigotto PP, *et al.*,

2000], il muscolo scheletrico [*De Coppi P et al.*, 2006] e le valvole cardiache [*Steinhoff G et al.*, 2000] e quindi potrebbe essere potenzialmente utile anche per la ricostruzione del fegato.

SCOPO DELLA RICERCA

Scopo della ricerca è stato quello di isolare una popolazione di cellule con caratteristiche di cellule staminali mesenchimali da cordone ombelicale umano e sangue cordonale. Le popolazioni cellulari isolate sono state caratterizzate ed è stato valutato il loro grado di plasticità valutando *in vitro* la loro capacità di differenziare in cellule di origine mesodermica come gli adipociti e gli osteoblasti. Le stesse popolazioni di MSC sono state quindi sottoposte a differenziamento epatogenico utilizzando un terreno di coltura contenente specifici fattori di crescita per il differenziamento epatocitario e seminandole su differenti supporti per le colture cellulari: la semplice plastica da coltura, il MatrigelTM e la matrice acellulare omologa di fegato. Dopo aver valutato quale fosse la fonte migliore di MSC e quale fosse *in vitro* la reale capacità differenziativa in cellule simil-epatocitarie delle popolazioni di MSC isolate, è stata effettuato uno studio sulle capacità di engraftment *in vivo* delle MSC da UC in un modello animale di danno epatico acuto indotto da tetracloruro di carbonio (CCl₄).

MATERIALI E METODI

1. RACCOLTA DEI CAMPIONI DI UCB E UC UMANO

116 campioni di sangue cordonale e 135 campioni di cordone ombelicale provenienti da 137 donazioni sono stati raccolti presso l'Unità di Ostetricia e Ginecologia dell'Ospedale di Cittadella (PD) previo consenso informato delle madri. Per la raccolta del sangue cordonale sono state utilizzate sacche MacoPharma MSC 1203 DU contenenti citrato fosfato destrosio come anticoagulante; per la raccolta dei cordoni ombelicali sono stati utilizzati vasetti di plastica sterili contenenti soluzione salina tamponata (Phosphate Buffer Solution, PBS).

2. ISOLAMENTO E COLTURA DI MSC DA UCB

Per isolare la frazione di cellule mononucleate ogni campione di UCB è stato diluito 1:1 con PBS/EDTA 2 mM e caricato delicatamente su una soluzione di Histopaque-1077 (Sigma). Dopo centrifugazione a 2500 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente, le cellule mononucleate sono state rimosse dall'interfase, lavate 2 volte con PBS/EDTA 2mM e quindi poste in coltura in piastre Petri 100x20 mm (Falcon) con terreno di proliferazione costituito da DMEM a basso glucosio con HEPES (Euroclone), 20% FBS specifico per cellule mesenchimali (StemCell Technologies) e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica (10000U/ml penicillina, 10mg/ml streptomycina solfato, 25 µg/ml anfotericina B, Sigma). Le cellule così ottenute sono state coltivate a 37°C in 5% di CO₂, cambiando il terreno 2 volte la settimana.

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

Tali colonie sono state quindi isolate mediante incubazione con soluzione di tripsina 0,25% (Sigma) ed EDTA 0,025% (Sigma) in PBS per 5 minuti a 37°C e le cellule così ottenute sono state poste in coltura in piastre Petri con terreno di proliferazione.

3. COLTURE DI CELLULE MSC CD105 POSITIVE DA UCB

Per ottenere una sottopopolazione cellulare arricchita in cellule staminali mesenchimali CD105 positive, le colture primarie di cellule fibroblastoidi da sangue cordonale sono state sottoposte ad immunoseparazione positiva mediante biglie magnetiche condizionate con anticorpo anti-CD105 (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

3.1. CONDIZIONAMENTO DI BIGLIE MAGNETICHE CON ANTICORPO

Da una soluzione acquosa di 4×10^8 biglie/ml (Dynabeads M-450 Tosylactivated, Dynal) sono state prelevate 2×10^8 biglie. Una volta trasferite in una provetta sterile posizionata su un magnete, le biglie sono state sottoposte a lavaggio con buffer 1 (PBS 0,1 M, pH 7,4). Quindi è stato aggiunto l'anticorpo specifico ad una concentrazione di $5 \mu\text{g}/10^7$ biglie e la soluzione è stata incubata a 37°C per 15 minuti, in agitazione.

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

In seguito, dalla provetta posta sul magnete è stato tolto il buffer 1 e le biglie sono state sottoposte a due lavaggi di 5 minuti a 4°C con il buffer 2 (PBS, pH 7,4 con 0,1% BSA e 2 mM EDTA).

Successivamente il buffer 2 è stato sostituito con buffer 3 (Tris 0,2 M, pH 8,5 con 0,1% BSA) e si è lasciato incubare a 37°C per 4 ore, in agitazione.

Quindi è stato sostituito il buffer 3 nuovamente con buffer 2 raggiungendo un volume finale di 1ml in modo da ottenere una concentrazione di biglie pari a 2×10^8 biglie/ml.

3.2. IMMUNOSEPARAZIONE

Le cellule, dopo essere state staccate con soluzione di tripsina/EDTA, sono state sospese in buffer 2 ad una concentrazione pari a 1×10^6 cellule/ml.

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

Dopo un'incubazione di 30 minuti a 4°C , con agitazione manuale ogni 5 minuti, la sospensione di cellule e biglie è stata sottoposta all'azione di un campo magnetico per 5 minuti. Il surnatante, contenente la frazione negativa, è stato prelevato e scartato. La frazione positiva, composta dalle cellule legate alle biglie e che pertanto restano nella provetta posta sul magnete, è stata allontanata dal campo magnetico e risospesa in terreno di proliferazione (**Fig.1**).

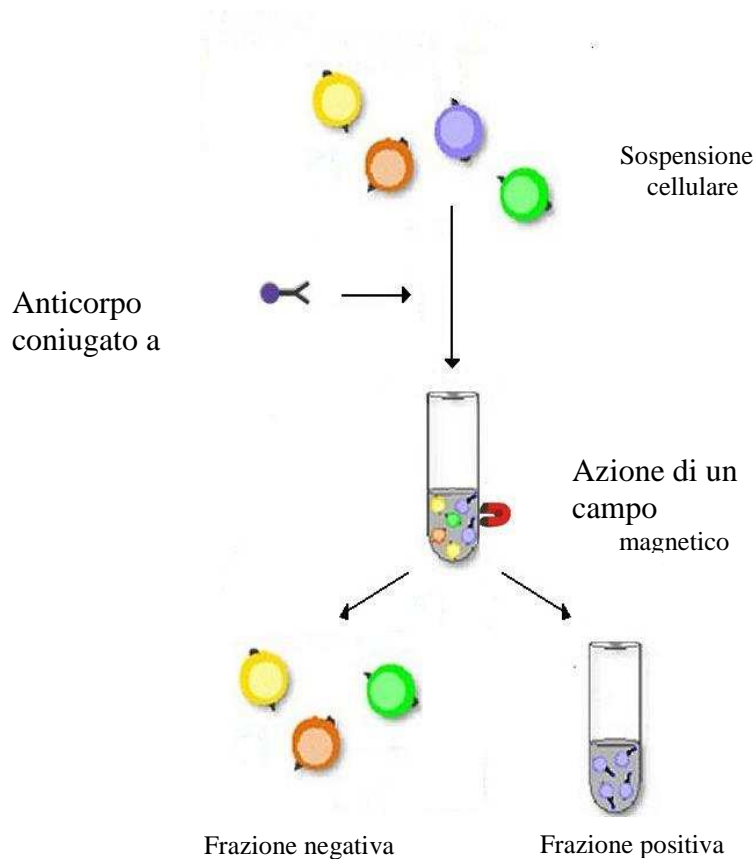


Fig.1. Immunoseparazione magnetica.

4. ISOLAMENTO E COLTURA DI MSC DA UC

Ogni campione di UC è stato privato meccanicamente della vena ombelicale e delle due arterie e la restante gelatina di Wharton è stata ridotta in frammenti molto piccoli mediante forbici.

Tali frammenti sono stati posti in coltura in piastre Petri 100x20 mm con terreno di proliferazione costituito da DMEM alto glucosio con L-glutamina stabile (Euroclone), 20% di FBS specifico per mesenchimali e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica. Le piastre sono state mantenute a 37°C e 5% di CO₂, cambiando il terreno 2 volte la settimana. Le colture primarie sono state osservate giornalmente al microscopio ottico per monitorare la presenza di cellule migrate dai frammenti in coltura. Subcolture cellulari costituite dalle cellule migrate dai frammenti sono state ottenute tramite distacco con soluzione di PBS contenente 0,25% di tripsina e 0,025% di EDTA per 5 minuti a 37°C e poste in coltura in piastre Petri con terreno proliferativo.

5. CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELLE MSC DA UCB E UC MEDIANTE ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Le cellule CD105⁺ ottenute da UCB e la popolazione di MSC isolata da UC sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica per lo studio di espressione dei seguenti antigeni: CD14, CD34, CD45, CD71, CD90, CD105, c-Kit, HLA-DR. Dopo trattamento con una soluzione di tripsina /EDTA, le cellule sono state marcate in modo diretto con gli anticorpi specifici coniugati a fluorocromo: CD14-PE, CD34-PE, CD90-FITC, CD105-PE, CD45-PE, CD71-PE, c-Kit-PE e HLA-DR-PE (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Sono stati utilizzati 3µl di anticorpo per 2x10⁵–1x10⁶ cellule risospese in 100 µl di soluzione di PBS addizionata con BSA al 2%. In parallelo sono stati preparati i campioni di controllo negativo contenente anticorpi isotipici coniugati con FITC o PE. Dopo l'incubazione al buio per 30 minuti, i campioni sono stati caricati su citofluorimetro MoFlo high-speed cell sorter (Dako). L'eccitazione dei fluorocromi e' stata eseguita mediante il laser Argon 488 e i segnali acquisiti sono stati poi elaborati mediante l'utilizzo del programma Summit 4.0 (Dako).

6. VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CELLULE FETALI NELLE MSC DA UCB E DA UC MEDIANTE RT-PCR

Per valutare l'eventuale origine fetale delle cellule CD105⁺ da UCB e delle MSCs da UC è stata verificata l'espressione del gene Sry da parte di cellule ottenute da campioni di sangue e cordone ombelicale di neonato maschio.

6.1. ESTRAZIONE RNA TOTALE

Alle cellule staccate meccanicamente utilizzando uno scraper, è stato aggiunto un volume adeguato di Trizol[®] (Invitrogen). Sono stati quindi aggiunti 0,2 volumi di cloroformio. I campioni sono stati mescolati energicamente per qualche secondo e quindi posti in ghiaccio per 15 minuti. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 12000 rpm in centrifuga refrigerata. Al termine della centrifugazione si possono individuare 3 fasi, la prima acquosa, la seconda biancastra costituita dalle membrane cellulari e la terza rossa contenente il Trizol residuo. È stata recuperata esclusivamente la fase acquosa nella quale è presente l'RNA, ponendo particolare attenzione a non toccare la parte bianca membranosa. A ciascun campione è stato quindi aggiunto 1 volume di isopropanolo freddo (a -20°C) e le Eppendorf sono

state mescolate per inversione e poste a -80°C per un'ora. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 12000rpm in centrifuga refrigerata. Il pellet ottenuto è stato quindi lavato per 3 volte con etanolo 75% in acqua DEPC (priva di RNasi, trattata con dietilpirocarbonato) mantenuto a -20°C . Dopo ciascun lavaggio i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 12000 rpm in centrifuga refrigerata. Al termine del terzo lavaggio l'etanolo è stato eliminato completamente ed il pellet fatto asciugare in speed-vac al fine di eliminare qualunque traccia di etanolo che potrebbe interferire con la successiva retro trascrizione. Il pellet di RNA asciutto è stato risospeso in 20 μl di acqua DEPC ed i campioni sono stati quindi conservati a -80°C . La concentrazione dell'RNA totale estratto è stata quantificata mediante lettura allo spettrofotometro a 260 nm mentre la purezza è stata stimata tramite i rapporti d'assorbanza A260/A280 e A260/A230.

6.2 .RETROTRASCRIZIONE

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA impiegando la retrotrascrittasi SuperScript e utilizzando primers universali (random). Tutte le procedure sono state eseguite in ambiente ad uso esclusivo per RNA al fine di evitare contaminazioni. Il protocollo di retro trascrizione prevede che venga preparata una mix di denaturazione per ciascun campione da retrotrascrivere così composta:

DTT	0,1 M
Buffer	5X
dNTPs	5 mM
Random primers	50 μM

Tutti i reagenti utilizzati per questa fase e la successiva sono della ditta Invitrogen.

È stato quindi aggiunto 1 μg di RNA e posto la mix a 72°C per 5 minuti al termine dei quali i campioni sono stati posti subito in ghiaccio per evitare la rinaturazione dell'acido nucleico.

La mix di retrotrascrizione è stata preparata nel seguente modo:

Retrotrascrittasi Superscript II	140 U
RNasi out	98 U
Acqua DEPC	q.b. per arrivare a 25 µl

La retrotrascrizione, che avviene in un volume totale di 25 µl, prevede i seguenti passaggi: 42°C per 50 minuti, 95 °C per 5 minuti. I campioni vengono mantenuti a 4°C fino alla successiva precipitazione del cDNA che viene effettuata mediante incubazione over-night a -80°C con 0,1 volumi di sodio acetato 3 M e 2.5 volumi di etanolo assoluto, allo scopo di eliminare i sali che potrebbero interferire nelle fasi successive. Il pellet di cDNA è stato quindi recuperato mediante centrifugazione e lavato con etanolo al 75%, lasciato asciugare e risospeso in acqua. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20 °C.

6.3.REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE

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

In un volume finale di 12 µl si è posto 1µl di c-DNA, con 1,25 µl di soluzione MgCl₂ 25 mM, 1,25 µl di buffer 10X, 6,8 µl di H₂O, 0,5 µl di dNTPs Mix 10 mM, 0,2 µl di Ampli Taq Gold 5 U/µl (Applied Biosystem), 0,5 µl di primer senso specifici e 0,5 µl di primer antisenso specifici (10 pM, Invitrogen).

L'amplificazione è stata effettuata con il seguente programma su termociclatore Icycler (Biorad):

- a) 95°C per 10 minuti (temperatura di attivazione della Taq Gold e di denaturazione iniziale)
- b) 95°C per 30 secondi (temperatura di denaturazione)
- c) temperatura di annealing variabile a seconda dei primer per 45 secondi
- d) 72°C per 30 secondi (temperatura di estensione)
- e) 72°C per 10 minuti (temperatura di estensione finale)
- f) 4°C

Le fasi *b*, *c*, *d* sono state ripetute per 40 cicli.

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

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

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

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

Gene	Primer (senso-antisenso)	Lunghezza (bp)	Cicli	Annealing Temp (°C)
GAPDH	5'AGTCCCTGCCCACTCAGTC3' 5'AGGGGTCTACATGGCAACTG3'	68	40	60
Sry	5'TCGCACTCTCCTTGTTTTG3' 5'TGGGTCGCTTCACTCTATCC3'	213	40	58

Tab.3 : Primer impiegati nella reazione di amplificazione

7. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO ED OSTEOGENICO IN VITRO DI MSC DA UCB E DA UC

7.1. INDUZIONE DEI DIFFERENZIAMENTI

Le cellule sono state seminate in chamber slides da 4 pozzetti (Falcon) ad una densità di 8000 cellule/cm² e quindi sottoposte a differenziamento adipogenico e osteogenico mediante uso di terreni contenenti fattori induttivi: per il differenziamento adipogenico il terreno differenziativo utilizzato era composto da DMEM basso glucosio (Gibco), 10% FBS (Sigma), 1% antibiotico-antimicotico e fattori adipogenici supplementari: 1µM dexametasone, 0.5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma), 10 µg/ml insulina (Sigma), 60 µM indometacina (Sigma), per il differenziamento osteogenico il terreno differenziativo utilizzato era composto da α-MEM (Gibco) addizionato di 10% FBS, 1% antibiotico-antimicotico, 2 mM L-glutammina, 50 µM acido ascorbico (Sigma), 10⁻⁸ M dexametasone, 10 mM β-glicerofosfato.

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

I terreni sono stati cambiati 2 volte alla settimana.

7.2. VALUTAZIONE DEI DIFFERENZIAMENTI

7.2.1. Analisi morfologica

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

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

La presenza di granuli lipidici nelle colture cellulari indotte a differenziamento adipogenico è stata determinata con la colorazione Oil-Red-O. Le cellule, fissate per 10 minuti a 4°C in acetone conservato a -20°C, sono state lavate in H₂O di fonte e incubate per 15 minuti con una soluzione di isopropanolo allo 0,5% di Oil-Red-O (Sigma), filtrata e diluita al 60% in H₂O distillata. Successivamente le cellule sono state lavate in H₂O di fonte e contrastate con ematossilina per un tempo variabile dai 30 secondi a un minuto. Dopo ripetuti lavaggi in H₂O di fonte, i preparati sono state montati con Histovitrex (Carlo Erba).

Come controllo si sono utilizzate cellule coltivate in terreno proliferativo.

7.2.3. Saggio von Kossa per la deposizione di sali di calcio

La capacità di produrre matrice mineralizzata da parte delle cellule indotte a differenziamento osteogenico è stata valutata mediante colorazione di von Kossa. Le cellule fissate in acetone a 4°C sono state reidratate per 5 minuti con H₂O milliQ, incubate in una soluzione acquosa di nitrato d'argento all'1% (Sigma) ed esposte a luce UV (Philips HPW) per 45 minuti. Successivamente le cellule sono state lavate con H₂O milliQ, trattate con soluzione acquosa contenente 3% di tiosolfato di sodio (Sigma) per 5 minuti, lavate e colorate con soluzione acquosa allo 0,2% di safranina (Sigma) filtrata. Infine i preparati sono stati montati con Eukitt (O.Kindler GmbH & Co.).

Il controllo era rappresentato dalla cellule coltivate in terreno proliferativo.

8. STUDIO DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI E DELL'ATTIVITÀ TELOMERASICA NELLE MSC DA UC

8.1. ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA CELLULE

L'estrazione di DNA genomico da cellule conservate a -80°C è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (Promega) secondo il protocollo fornito (Tissue Culture Cells and Animal tissue).

Brevemente 10⁶ cellule sono state omogenate con pestello in 600 µl di Nuclei Lysis Solution e 3 µl di Rnase Solution per lisare i nuclei e incubare a 37°C per 20 min. Al termine, ai campioni, lasciati raffreddare a temperatura ambiente, si aggiungono 200 µl di Protein Precipitation Solution. Quindi si vortexano i campioni per 20 sec e si lasciano in ghiaccio per 5 min. Dopo centrifugazione a 14.000 rpm per 4 min, si procede al recupero del surnatante contenente il DNA. Al surnatante vengono aggiunti 600 µl di isopropanolo e si agita gentilmente fino alla comparsa del flocculo. I campioni vengono quindi centrifugati a 14.000 rpm per 1 min ed il pellet, contenente il DNA, viene lavato con etanolo al 70% conservato a temperatura ambiente. Si centrifugano i campioni a 14.000 rpm per 1 min, per eliminare l'etanolo usato per di lavaggio, e si lasciano asciugare i pellet per 10-15 min. Il DNA estratto viene risospeso in 100 µl di DNA Rehydration Solution, lasciato in incubazione e conservato overnight a 4°C.

8.2. DETERMINAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DELLA CONCENTRAZIONE DEL DNA GENOMICO ESTRATTO

La concentrazione di DNA estratto da ogni campione è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica. Per ogni campione sono state effettuate letture spettrofotometriche degli assorbimenti a 320, 280 e 260 nm. La contaminazione da parte delle proteine è stata valutata considerando il rapporto OD260/OD280 ed eliminando i campioni con un rapporto inferiore a 1.7. La concentrazione di DNA è stata calcolata con il valore di assorbanza a 260 nm, tenendo conto del fattore di diluizione e applicando la seguente proporzione:

$$1 : 50 \mu\text{g/ml} = A \text{ campione } (\lambda 260) : x$$

8.3. ESTRAZIONE DI PROTEINE DA CELLULE

Per l'estrazione delle proteine sono stati aggiunti, ad ogni campione contenente 10⁶ cellule, 200 µl di tampone di lisi (0.5% CHAPS, 10% glicerolo, 0.1 mM fenilmetilsolfonilfluoruro, 10 mM Tris/ HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM

β -mercaptoetanol) e Protease Inhibitor Cocktail (Sigma). Quindi, omogenati mediante pestello, lasciati incubare in ghiaccio per 30 min e centrifugati a 14000 rpm 4°C per 45 min. Nel surnatante ottenuto dopo centrifugazione è stata determinata la concentrazione proteica. I campioni sono stati aliquotati e conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

8.4. DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato seguendo il protocollo fornito dal kit RCCD Protein Assay (BioRad). La curva standard è stata ottenuta con diluizioni seriali partendo da una soluzione madre di albumina alla concentrazione di 1,5 μ g/ml : 1,5 mg/ml - 0,75 mg/ml - 0,375 mg/ml - 0,1875 mg/ml. L'assorbanza dei campioni è stata letta a 750 nm.

8.5. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ TELOMERASICA MEDIANTE REAL TIME PCR -TRAP

L'attività telomerasica è stata testata partendo da proteine estratte conservate a -80°C, utilizzando un ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). L'amplificazione è stata ottenuta in un volume finale di 25 μ l in presenza di SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) contenente DNA polimerasi AmpliTaq Gold, dNTPs e dUTP, SYBR Green in 1X buffer, 0.2 μ g di T4 Gene 32 Protein, primers specifici: TS (5' – AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') alla concentrazione di 0.6 μ M e ACX [5'– GCGCGG(CTTACC)3CTAACC] alla concentrazione di 0.4 μ M e 1 μ g/ μ l di omogenato proteico. La reazione di amplificazione è stata eseguita in una piastra con 96 pozzetti separati e previa incubazione a 25°C per 20 min in modo da permettere l'attacco del primer TS alla telomerasi, presente nei campioni, con conseguente aggiunta delle sequenze ripetute TTAGGG. La PCR è stata condotta a 95°C per 10 min, seguita da 40 cicli a 95°C per 20 sec e a 60°C per 30 sec. Alla fine della PCR la temperatura è stata aumentata da 60°C a 95°C alla velocità di 2°C/min e la fluorescenza è stata misurata ogni 15 sec al fine di permettere la costruzione della curva di melting. In ogni seduta di amplificazione è stato inserito un controllo negativo in cui l'aliquota di omogenato proteico è stata sostituita con H₂O. Tutte le determinazioni sono state eseguite in triplicato per valutare la riproducibilità. Sono stati allestiti inoltre controlli negativi per ciascun campione considerato trattando un'aliquota di omogenato proteico con 1 μ g/ μ l Rnase a 37°C per 30 min.

8.6. DETERMINAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI (T/S) MEDIANTE REAL-TIME PCR

Il DNA genomico estratto è stato usato anche per misurare la lunghezza dei telomeri mediante il metodo messo a punto da Cawthon. Quindi per ogni esperimento sono state preparate 2 piastre da 96 pozzetti, una contenente i primers per i telomeri (Tel- 1: 5'- GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3', Tel-2: 5'TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3') e una seconda contenente i primers per il gene 36B4, che codifica per P0, una fosfoproteina ribosomiale acida usato come gene a singola copia (36B4u: 5'- CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3', 36B4d: 5'CCCATTCCTATCATCAACGGG TACAA-3').

In ogni 25 µl di reazione di PCR sono presenti 40 ng di DNA, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e i primers alle rispettive concentrazioni finali 270 nM Tel-1 e 900 nM Tel-2 o 300 nM 36B4u e 500 nM 36B4d.

La reazione di amplificazione è stata effettuata con un ABI PRISM 7900 (Applied Biosystem).

In ogni piastra, è stata preparata una curva standard con human reference DNA (Applied Biosystem) da 4 a 80 ng. La reazione di amplificazione per i telomeri è stata effettuata a 95°C per 10 min, seguita da 30 cicli a 95°C per 5s, 56°C per 10s e 72°C per 60s o 35 cicli a 95°C per 5s, 58°C per 10 s e 72°C per 40s. La reazione di amplificazione è, seguita da una curva di dissociazione per confermare la specificità della reazione.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato per valutare la riproducibilità del test e in ogni saggio è stato inserito un controllo negativo dove il DNA è stato sostituito con H₂O.

Il rapporto Telomeri/gene a singola copia (T/S) per ogni campione è stato ottenuto dividendo la quantità media dei telomeri con la quantità media del gene 36B4 .

8.7. ANALISI DEI DATI DELLA REAL TIME PCR-TRAP

Al termine dell'amplificazione, i prodotti di PCR sono stati salvati ed elaborati mediante il software ABI 7900 SDS 2.3. Il software determina il numero di cicli in cui la reazione raggiunge la Threshold. Questo valore, indicato come ciclo soglia (Ct), compare sempre durante la fase esponenziale della reazione ed è inversamente proporzionale al numero iniziale di molecole stampo presenti nel campione. Il software costruisce le curve standard fornendo tutti i parametri che permettono il calcolo

dell'efficienza della reazione di amplificazione. Le concentrazioni dei campioni vengono estrapolate dalla curva standard.

9. OTTENIMENTO E ANALISI DELLA MATRICE ACELLULARE DI FEGATO

9.1. OTTENIMENTO DELLA MATRICE ACELLULARE DI FEGATO

La matrice acellulare è stata ottenuta da campioni di fegato umano provenienti da interventi di resezione epatica e conservati a -20°C. Tali campioni sono stati scongelati rapidamente a temperatura ambiente e quindi tagliati al criostato raffreddato a CO₂ (Jung) per ottenere delle sezioni dello spessore di 200 µm. Le sezioni raccolte sono state lavate in PBS sterile contenente l'1% di soluzione antibiotica-antimicotica (AF) e quindi sottoposte a 1 ciclo di decellularizzazione secondo il metodo detergente-enzimatico di Meezan parzialmente modificato che prevede i seguenti passaggi:

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

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

9.2. ANALISI ISTOCHEMICA

9.2.1 Inclusione in paraffina

I campioni di matrice fissati per 24 ore in PBS contenente formalina al 4% (Sigma) sono stati disidratati mediante la scala ascendente degli alcoli nel seguente modo: 2 ore in alcool 70%, 2 ore in alcool 80%, 2 ore in alcool 90%, una notte in alcool 95%, 2 ore in alcool 100%, 2 ore in xilolo/alcool 100% (1:1, v/v) e quindi in xilolo per

altre 2 ore. E' seguito quindi passaggio in paraffina a 58°C per 2 ore per l'impregnazione e quindi l'inclusione in vaschette metalliche.

Al microtomo (Histoslide 2000, Reichert-Jung), sono state ottenute sezioni dello spessore di 5-7 µm, raccolte su vetrini porta-oggetti SuperFrost Plus (Menzel-Glaser).

9.2.3 Colorazione con ematossilina-eosina

E' stata eseguita mediante colorazione con ematossilina-eosina (Merck); le sezioni sono state preventivamente sparaffinate tramite due passaggi in xilolo, ciascuno di 5 minuti, e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in una scala discendente di alcool: alcool 100%, alcool 95%, alcool 80%, alcool 70%, alcool 50%, alcool 30%, alcool 10%, per finire con un passaggio di 15 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con ematossilina per 2 minuti, lavata 2 volte velocemente in acqua distillata e contrastata per 6 minuti in acqua di fonte, quindi è stata trattata con eosina per 1 minuto e lavata ancora velocemente in acqua distillata. Dopo la colorazione i preparati sono stati disidratati tramite passaggi veloci in alcool 80%, alcool 95%, alcool assoluto, trattati con xilolo e montati con Eukitt. E' stata inoltre eseguita la colorazione Masson tricromica utilizzando il kit Masson trichrome Goldner (Bio-optica) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

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

10. DIFFERENZIAMENTO EPATOCITARIO *IN VITRO* DI MSC DA UCB E UC

10.1. INDUZIONE DEI DIFFERENZIAMENTI

Per il differenziamento epatocitario le MSC isolate da UCB e da UC sono state seminate su 3 differenti supporti (plastica, MatrigelTM e matrice acellulare omologa di fegato) e trattate con terreno differenziativo epatogenico composto da Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Euroclone S.p.a.), contenente il 15% di FBS, l'1% di soluzione antibiotica-antimicotica e addizionato di fattori di crescita favorenti il differenziamento epatocitario: 10⁻⁷ M desametasone (Sigma), 10 mg/ml ITS supplement (25 mg/ml insulin, 25 mg/ml transferrin, and 25 µg/ml sodium selenite, Roche), 20 ng/ml Hepatocyte Growth Factor (HGF, PeproTech EC), 100 ng/ml Fibroblast Growth Factor-4 (FGF-4, PeproTech EC), 10 ng/ml Oncostatine M (OSM, Sigma).

10.1.1 Differenziamento su supporto di MatrigelTM

Le MSC da UC e UCB sono state seminate in piastre da 6 pozzetti precedentemente condizionati con MatrigelTM (BD Biosciences) lasciato scongelare per una notte in ghiaccio a 4°C, diluito in DMEM in rapporto 1:10, piastrato e incubato a 37°C per un'ora prima della semina. Dopo 24 ore dalla semina il terreno proliferativo è stato sostituito con terreno differenziativo. Come controllo sono state utilizzate cellule coltivate in terreno proliferativo.

Le MSC da UCB sono state fissate a 7 e 14 giorni, mentre le MSC da UC sono state fissate e analizzate a 7, 14, 21 e 28 giorni dall'inizio dell'induzione al differenziamento.

10.1.2 Differenziamento su matrice acellulare omologa di fegato

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

2×10^5 cellule sono state seminate sulla matrice per ogni pozzetto da 24 con terreno proliferativo o con terreno differenziativo epatocitario. Le cellule sono state raccolte e fissate agli stessi tempi di quelle seminate su MatrigelTM.

10.1.3 Differenziamento su plastica (piastra Petri)

Le MSC da UC e UCB sono state seminate in piastre da 6 pozzetti. Dopo 24 ore dalla semina il terreno proliferativo è stato sostituito con terreno differenziativo. Come controllo sono state utilizzate cellule coltivate in terreno proliferativo.

Le MSC da UCB sono state fissate a 7 e 14 giorni, mentre le MSC da UC sono state fissate e analizzate a 7, 14, 21 e 28 giorni dall'inizio dell'induzione al differenziamento.

10.2. VALUTAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO

10.2.1 Analisi morfologica

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

I costrutti costituiti da sola matrice o matrice sulla quale erano state seminate le MSC sono stati fissati con gluteraldeide al 3% (Merck) in tampone sodio cacodilato (Sigma)

0,1 M pH 7,2. Dopo disidratazione con scala ascendente degli alcoli, crytical point drying e metallizzazione in oro, i preparati sono stati esaminati al Microscopio Elettronico a Scansione (Cambridge Stereoscan).

L'analisi è stata eseguita dopo 7 e 14 giorni per le matrici seminate con MSC da UCB e 7, 14, 21, 28 giorni per le matrici seminate con MSC da UC.

10.2.2 Valutazione della vitalità cellulare con saggio MTS

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

10.2.3 Analisi immunocitochimica

Le MSC da UCB e da UC sono state analizzate per la presenza dei marcatori di linea epatocitaria AFPe Albumina (Sigma) ai diversi time-point.

Dopo essere state fissate per 15 minuti a 4°C in paraformaldeide (Sigma) al 2% in tampone ISO 2X, le cellule sono state lavate velocemente in PBS.

Quindi sono state poste in una soluzione di PBS contenente H₂O₂ al 15% per 20 minuti, a temperatura ambiente, al buio al fine di disattivare le perossidasi endogene. In seguito, sono state lavate con PBS e incubate con una soluzione contenente il 10% di siero della specie animale dell'anticorpo secondario per 1 ora a temperatura ambiente, per ottenere il blocco dei siti aspecifici.

E' seguita un'incubazione di 120 minuti in camera umidificata a temperatura ambiente con l'anticorpo primario diluito 1:200 in PBS contenente il 3% di siero della specie

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

Dopo lavaggio in PBS le cellule sono state poste in una soluzione rivelatrice (cromogena) contenente 3,3'diaminobenzidina (DAB), substrato delle perossidasi, preparata utilizzando 100 µl di buffer, 200 µl di DAB e 100 µl di H₂O₂ al 3% (Vector) in 5 ml di acqua distillata e mantenuta al buio.

La soluzione così preparata è stata aggiunta alle cellule e si è seguita la reazione enzimatica al microscopio ottico. Dopo un tempo variabile dai 5 ai 10 minuti la reazione è stata bloccata con acqua distillata. La colorazione di contrasto è stata ottenuta con ematossilina (Merck) e il preparato è stato montato con Acquavitrex (Carlo Erba), montante acquoso.

Come controllo sono state utilizzate cellule trattate solo con l'anticorpo secondario, soluzione A/B e DAB.

10.2.4 REAL-TIME PCR PER I MARCATORI DI LINEA EPATOCITARIA

Per valutare l'espressione dell'mRNA per i marcatori di linea epatica AFP, Albumina e PEPCCK-C è stata effettuata la Real-Time PCR sulle MSC da UCB seminate sui tre supporti a 7 e 14 giorni dall'induzione del differenziamento sia in terreno proliferativo che differenziativo. La stessa metodica è stata utilizzata per valutare la presenza dell'mRNA per AFP, Albumina e MTP (proteina microsomale di trasporto del triacilglicerolo) sulle MSC da UC seminate sui tre supporti a 7, 14, 21, 28 giorni dall'induzione del differenziamento sia in terreno proliferativo che differenziativo.

I campioni di cDNA ottenuti dopo estrazione dell'RNA totale della cellula seguito dalla retrotrascrizione, sono stati analizzati mediante Real Time PCR utilizzando il SYBR Green (Quiagen) come indicatore di fluorescenza e verifica della specificità dei prodotti amplificati mediante curva di melting. La Real-Time PCR è una tecnica che consente la

simultanea amplificazione e quantificazione del DNA stampo attraverso il monitoraggio in tempo reale dell'intensità di fluorescenza che si libera dal prodotto di amplificazione durante la reazione a catena della DNA polimerasi: questo risulta possibile mediante l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo, a livello del prodotto di reazione, segue la stessa cinetica della PCR. Il SYBR Green emette una fluorescenza maggiore quando intercalato al DNA a doppia elica, quindi, con il procedere dei cicli di amplificazione, si assisterà ad un continuo aumento della fluorescenza. Il ciclo raggiunto al quale la fluorescenza supera il valore base (threshold) viene indicato come Ct (Cycle threshold).

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta sui campioni conservati a -80°C per i seguenti geni: AFP, Albumina, PEPCK-C, MTP, GAPDH. Le sequenze nucleotidiche dei geni di interesse sono state individuate tramite consultazione del database online <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>. I primer sono stati disegnati mediante impiego del software Probe Finder (Roche) a cavallo tra 2 esoni adiacenti, in modo tale da escludere l'amplificazione di eventuale DNA contaminante ed analizzati mediante il software disponibile online al sito www.bmr-genomics.it.

I primer utilizzati sono indicati in **Tabella 4**.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
AFP	TGACTCCAGTAAACCCTGGT	AGAAATCTGCAATGACAGCC
Albumina	ATCAAGAAACAAACTGCACT	GCAGGTCTCCTTATCGTCAG
PEPCK-C	CAGGCGGCTGAAGAAGTATGA	AACCGTCTTGCTTTTCGATCCT
MTP	CGTTCGGCATCTACTTACAGC	GTTCTCCTCCCCCTCGTCAG
GAPDH	AGCAACAGGGTGGTGGAC	GTGTGGTGGGGACTGAG

Tab.4: Primer impiegati nella reazione di amplificazione

La mix di reazione per ciascun campione è costituita da:

- 2 µl di cDNA campione
- 0,75 µM primer Forward e 0,75 µM Reverse
- acqua RNAsi free
- SYBR Green PCR Master mix secondo le indicazioni della ditta fornitrice.

Nel controllo negativo sono stati utilizzati 2 μ l di acqua RNAsi free al posto del cDNA. L'amplificazione è stata condotta utilizzando lo strumento Lightcycler II (Roche) con il seguente programma:

- a) 15 minuti a 95°C per attivare la Taq DNA polimerasi;
- b) 20 secondi alla temperatura di appaiamento che dipende dalla coppia di primers utilizzati;
- c) 15 secondi a 95°C per la denaturazione;
- d) 10 secondi a 72°C per l'estensione.

Tali cicli sono stati ripetuti in media 40 volte.

I dati sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa dell'algoritmo della derivata seconda. Tale metodo consente di valutare le differenze nei livelli di espressione di un gene tra un campione ed il relativo controllo. Per poter effettuare tale confronto è necessario disporre di uno "standard interno", di un riferimento, comune sia al campione trattato, sia al controllo ed espresso costitutivamente in entrambi. Tali geni costitutivi, denominati housekeeping, sono caratterizzati dal fatto che la loro espressione segue l'attività trascrizionale della cellula: ne consegue che la quantità di RNA e quindi di cDNA utilizzato quale template è ad essa proporzionale. Tale valore, che risulta attendibile a parità di efficienza di amplificazione del gene target e dell'housekeeping, esprime dunque l'entità dell'espressione differenziale del gene d'interesse tra il campione ed il suo controllo.

Per ogni campione (analizzato in triplicato) è stato individuato il valore di Ct del gene di interesse e di quello housekeeping. È stata quindi calcolata la loro differenza che rappresenta il Δ Ct in modo tale che la quantità di ogni messaggero codificante il gene di interesse sia normalizzata rispetto al gene housekeeping. Per ogni gruppo di trattamento è stato calcolato il Δ Ct medio e la deviazione standard. La differenza tra il Δ Ct di un qualsiasi gruppo di trattamento ed il Δ Ct del gruppo controllo rappresenta il $\Delta\Delta$ Ct, derivandone che il $\Delta\Delta$ Ct del gruppo controllo è pari a zero. L'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$, che per il gruppo dei campioni controllo sarà quindi uguale ad 1, rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene di interesse è espresso rispetto all'espressione basale (quella riscontrata nei campioni non trattati). Con tale metodo per

ogni campione la quantità del gene di interesse analizzato è quindi espressa come n-volte rispetto alla quantità presente nelle cellule trattate con terreno proliferativo per ogni supporto analizzato.

10.2.5 Colorazione PAS (Acido Periodico di Schiff)

Per valutare la presenza di glicogeno nelle cellule differenziate, le MSC da UC sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 10 minuti dopo 7, 14, 21, 28 giorni dall'induzione del differenziamento. Quindi, dopo essere state incubate con acido periodico 0,5% (Merck) per 5 minuti, sono state trattate con il reagente di Schiff (Merck) per 15 minuti. Successivamente le cellule sono state lavate con acqua corrente per 5 minuti ed è stata effettuata la colorazione di contrasto per i nuclei con ematossilina (Merck).

I preparati così ottenuti sono stati disidratati con passaggi successivi in etanolo 70%, 80%, 100% e xilolo e quindi montati con Eukitt.

10.2.6 Valutazione della produzione di albumina umana

La capacità delle MSC isolate da UC e differenziate verso la linea epatocitaria di produrre albumina è stata valutata mediante un saggio immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) sui surnatanti provenienti da colture di cellule trattate sia con terreno proliferativo che con terreno differenziativo a 7, 14, 21 e 28 giorni dall'induzione del differenziamento utilizzando il kit commerciale Human Albumin Elisa Kit (Alpha Diagnostic International, Texas, USA). I campioni sono stati conservati a -80 °C fino al momento dell'uso.

Questo tipo di saggio si basa sul legame che viene ad instaurarsi tra l'albumina umana presente nei campioni analizzati e due anticorpi, uno immobilizzato su microwells e l'altro coniugato con l'enzima perossidasi. Una volta effettuati i due passaggi di incubazione con gli anticorpi, i campioni sono stati lavati ed è stato aggiunto il substrato dell'enzima perossidasi legato all'anticorpo che ha così sviluppato una reazione cromogenica proporzionale alla quantità di albumina presente nei campioni. A questo punto è stata aggiunta la stopping solution per bloccare la reazione ed è stata letta l'assorbanza dei campioni 450 nm utilizzando un lettore per piastre ELISA (Packard Fusion Microplate Reader). La curva standard di riferimento è stata realizzando con delle soluzioni di albumina a concentrazione nota fornite dal kit.

11. ANALISI STATISTICA

I dati di PCR Real-Time delle MSC isolate da UCB sono espressi come media \pm errore standard. L'analisi statistica è stata condotta mediante *t* test di Student. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$.

I dati di PCR Real-Time e produzione di albumina delle MSC isolate da UC sono espressi come mediane (Quartile 1; Quartile 3). Il test *U* non-parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per analizzare le differenze tra cellule trattate con terreno proliferativo (cellule controllo) e cellule trattate con terreno differenziativo (cellule differenziate); l'andamento nel tempo dell'espressione degli mRNA e della produzione di albumina sono stati valutati utilizzando il test di Cuzick. Infine il test di Kruskal-Wallis seguito dalla correzione di Bonferroni è stato utilizzato per i confronti multipli tra i diversi marcatori sui diversi supporti. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$. I dati sono stati analizzati con SPSS e StasDirect.

12. VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ RIGENERATIVA *IN VIVO* DELLE MSC DA UC

Per valutarne la capacità di contribuire alla rigenerazione epatica dopo danno acuto *in vivo*, le MSC da UC sono state somministrate in topo Balb-c maschi dopo 24 h dal danno epatico.

12.1. Induzione del danno e somministrazione delle MSC

Previo consenso veterinario, è stato allestito un modello animale di danno epatico acuto chimicamente indotto. 16 topi Balb-c maschi hanno ricevuto un'unica iniezione intraperitoneale di CCl₄ (0,75 ml/Kg) sciolto in olio di oliva fino ad un volume pari a 100 μ l. Dopo 24 ore dall'induzione del danno acuto in 12 topi sono state somministrate, mediante iniezione nella vena della coda, 10⁶ MSCs sospese in 200 μ l di PBS. Gli animali sono stati sacrificati a 24, 48, 72 ore e 7 giorni dall'iniezione delle cellule. Per ogni time-point sono stati utilizzati due topi controllo, uno trattato solo con CCl₄ e uno trattato solo con le cellule, e tre topi trattati con CCl₄ e cellule.

12.2. Valutazione istologica degli organi

Dopo il sacrificio da ogni animale sono stati prelevati il fegato e i reni per valutare il grado di danno presente in questi organi e l'eventuale localizzazione delle cellule iniettate a livello epatico.

Gli organi dopo esser stati lavati in PBS e ridotti in pezzi, sono stati fissati per 24 ore in soluzione di PBS contenente il 4% di formalina (Sigma). In seguito ciascun pezzo è stato disidratato con successivi passaggi in alcol e xilolo (alcool 70%, alcool 80%, alcool 90%, alcool 95%, alcool 100%, alcool 100% + xilolo, xilolo) ed incluso in paraffina.

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

RISULTATI

1.ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE MSC DA UCB

Sono stati raccolti e processati 116 campioni di UCB e dal 10% di questi, dopo 3-4 settimane di coltura, sono state ottenute colonie di cellule con morfologia fibroblastoide, tipica delle cellule staminali mesenchimali (**Fig. 2**).

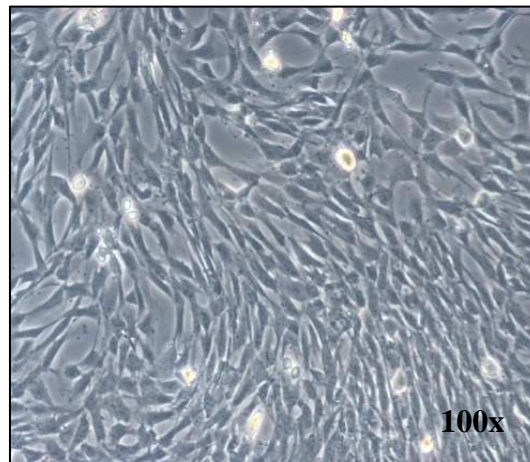


Fig.2. Microscopia ottica a contrasto di fase di colture primarie di cellule fibroblastoidi da UCB a 14 giorni dall'isolamento. Ingrandimento: 100x.

Per ottenere una popolazione cellulare arricchita in staminali mesenchimali le cellule precedentemente isolate sono state sottoposte ad immunoseparazione positiva per l'antigene CD105.

La successiva analisi al citofluorimetro eseguita su questa sottopopolazione cellulare ha mostrato una forte espressione dei marker tipici della linea mesenchimale CD105 e CD90, mentre sono risultati debolmente espressi o assenti i marker della linea ematopoietica CD14, CD34, CD45, CD71, c-Kit e assente il marker del complesso maggiore di istocompatibilità HLA-DR (**Fig. 3**).

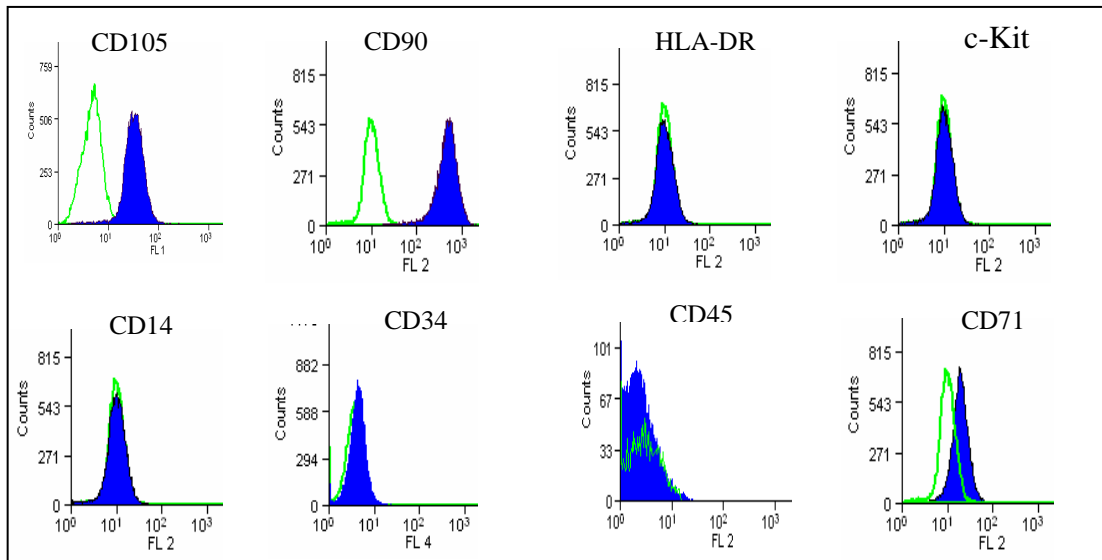


Fig. 3. Istogrammi di citofluorimetria che mostrano l'immunofenotipo delle MSC da UCB (picco blu) rispetto al controllo negativo (picco verde). Come controllo negativo è stato utilizzato anticorpo isotipico di topo IgG1 multicolour (FITC / RPE / RPE Cy5).

Infine l'analisi attraverso RT-PCR per il gene SRY, localizzato solo sul cromosoma Y, di MSC isolate da campioni di sangue di neonati maschi ha dimostrato la presenza in questa sottopopolazione di cellule di origine fetale (**Fig. 4**).

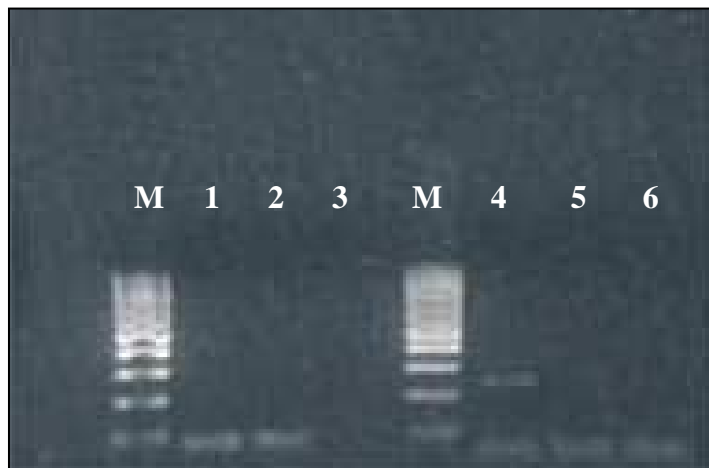


Fig. 4. RT-PCR delle MSC da UCB per l'espressione del gene Sry (213pb): cellule da UCB di neonato maschio (linea 4); cellule da UCB di neonato femmina (linea 5); espressione del gene housekeeping GAPDH (68pb) nei campioni (linea 1, 2); controllo della retrotrascrizione (linea 3 e 6); M, marcatore di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

2. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO E OSTEOGENICO *IN VITRO* DI MSC DA UCB

Le MSC ottenute da sangue cordonale sono state sottoposte a differenziamento adipogenico ed osteogenico per verificare la loro potenziale plasticità.

2.1. INDUZIONE ADIPOGENICA

Dopo 11 giorni di coltura in terreno differenziativo adipogenico le MSC da UCB hanno assunto una morfologia rotondeggiante e nel loro citoplasma comparivano granuli citoplasmatici, tipici degli adipociti, il cui contenuto era di natura lipidica, come evidenziato dalla colorazione Oil-Red-O (**Fig 5A**). Al contrario, nelle colture di controllo mantenute in terreno di proliferazione, le cellule hanno mantenuto una morfologia fibroblastoide risultando negative alla stessa colorazione (**Fig 5B**).

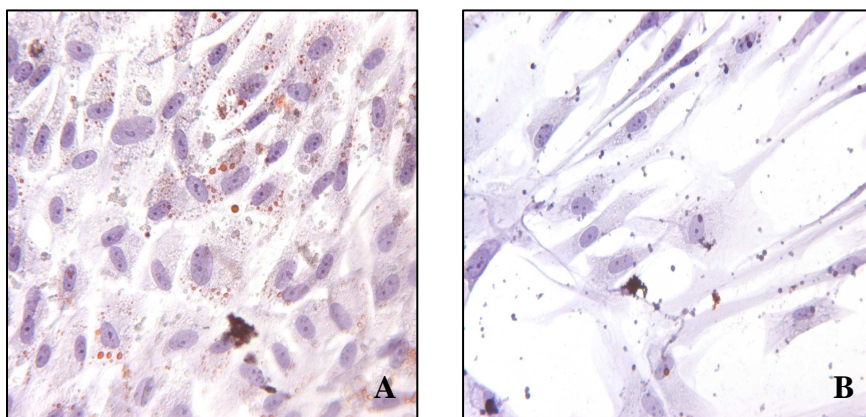


Fig. 5. Colorazione Oil-Red-O di colture di MSC da UCB in terreno adipogenico (A) e in terreno proliferativo (B). Ingrandimento 200x.

2.2 INDUZIONE OSTEOGENICA

Le MSC da UCB dopo 14 giorni di coltura in terreno differenziativo osteogenico erano in grado di produrre matrice mineralizzata, come evidenziato dalla colorazione von Kossa (**Fig. 6A**), mentre da parte delle cellule mantenute in terreno proliferativo non è risultata alcuna deposizione di sali di calcio (**Fig. 6B**).

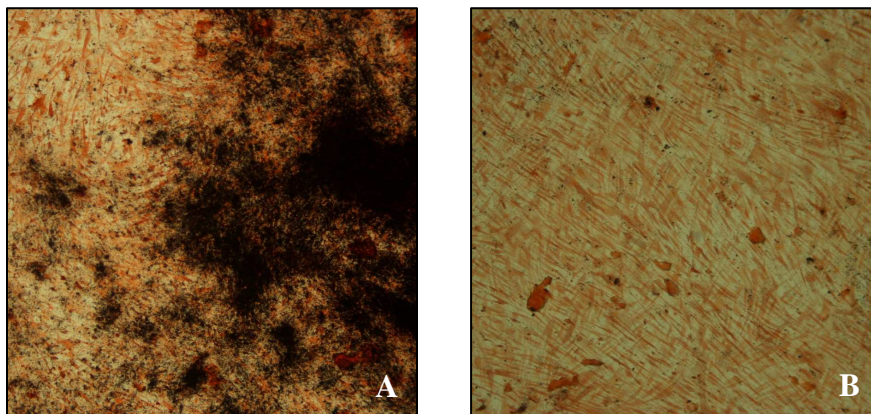


Fig. 6. Colorazione von Kossa di MSC da UCB trattate con terreno osteogenico (A) e con terreno proliferativo (B). Ingrandimento: 100 x.

3. DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO *IN VITRO* DI MSC DA UCB

Una volta dimostrata la capacità delle MSC da UCB di differenziare verso la linea mesodermica, è stata valutata la loro capacità di differenziare in epatociti, cioè in cellule di diversa origine embrionale in quanto provenienti dal foglietto embrionale endodermico, utilizzando per la coltura cellulare diversi supporti: plastica da coltura non trattata, Matrigel™ e matrice acellulare di fegato.

3.1 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU PLASTICA NON TRATTATA

Attraverso l'utilizzo di Real-Time PCR è stata valutata l'espressione dell'mRNA per i marcatori di linea epatocitaria AFP, Albumina e PEPCK-C nel corso di 14 giorni di differenziamento.

Le MSC seminate su plastica non trattata hanno mostrato di esprimere in maniera costitutiva l'mRNA per l'Albumina ed il PEPCK-C. Dopo 7 e 14 giorni di coltura in terreno differenziativo l'espressione dell'mRNA per l'Albumina è aumentata rispettivamente di 6.4 volte e di 9.1 volte rispetto alle cellule tenute in coltura con terreno proliferativo (**Fig. 7A**). L'mRNA per il PEPCK-C è stato up-regolato di 2.3 volte nelle cellule in terreno differenziativo dopo 7 giorni di coltura, mantenendo stabile la sua espressione fino a 14 giorni di differenziamento (**Fig. 7B**).

Non è invece stata rilevata l'espressione dell'mRNA per l'AFP in nessuna delle condizioni sperimentali analizzate.

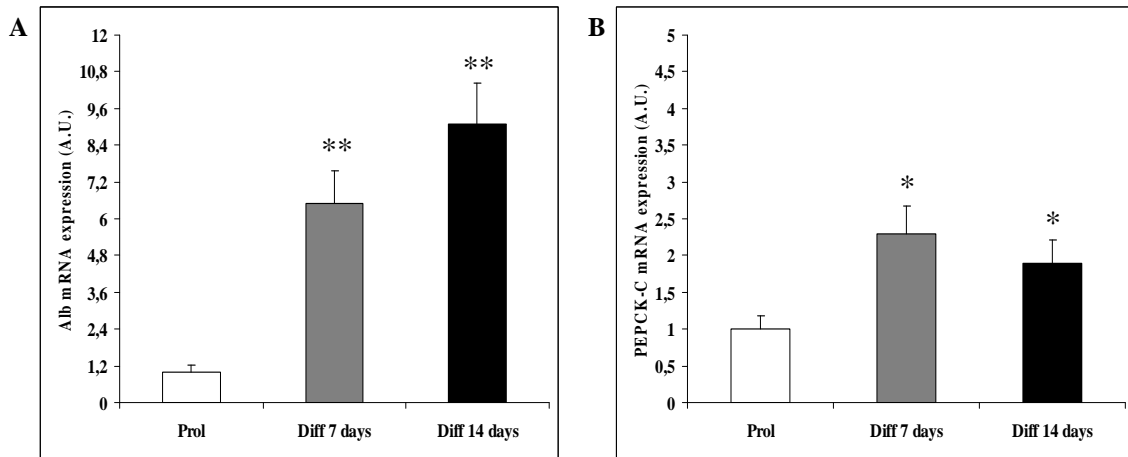


Fig.7. Espressione dell'mRNA dei marcatori epatocitari Albumina (A) e PEPCK-C (B) nelle MSC da UCB seminate su plastica non trattata e trattate con terreno proliferativo (Prol) e differenziativo (Diff) per 7 e 14 giorni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$.

La successiva analisi immunocitochimica per la presenza delle proteine Albumina e AFP ha confermato i risultati ottenuti dalla Real-Time PCR. Infatti queste cellule sono risultate positive all'anticorpo diretto contro l'albumina umana dopo 14 giorni di coltura in terreno proliferativo (**Fig. 8A**), mostrando però una colorazione più intensa dopo 14 giorni di differenziamento (**Fig.8B**), mentre non è stata rilevata l'espressione dell'AFP a nessun time-point né nelle cellule indifferenziate né in quelle differenziate (**Fig. 8C-D**).

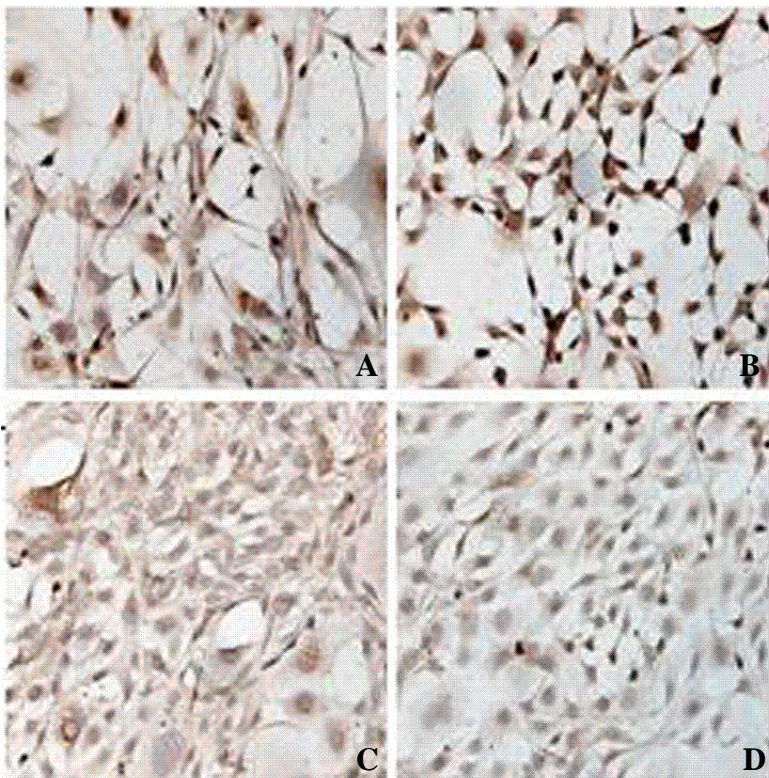


Fig. 8. Immunocitochimica su MSC da UCB poste in coltura con terreno proliferativo e trattate con anticorpi anti-Albumina (A) e AFP (C). MSC da UCB poste in coltura per 14 giorni con terreno differenziativo e trattate con anticorpo anti Albumina (B) e AFP (D). Ingrandimento: 200x.

3.2 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRIGELTM

Le MSC isolate dal sangue cordonale sono state seminate su piastre di colture precedentemente condizionate con MatrigelTM ed è stata nuovamente testata la loro capacità di differenziare verso lineage epatogenico.

E' stata misurata la vitalità delle cellule seminate su supporto di MatrigelTM e confrontata con quella delle stesse cellule seminate su plastica non trattata sia con terreno differenziativo che proliferativo. L'analisi dei dati ottenuti non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa ad ogni time-point tra la vitalità espressa dalle MSC seminate sui due diversi supporti e trattate con terreno differenziativo. Invece MSC seminate su MatrigelTM e trattate con terreno proliferativo hanno mostrato una vitalità inferiore rispetto a quella delle cellule seminate su plastica non trattata, anche se con una tendenza ad aumentare progressivamente fino ai 14 giorni di coltura (Fig. 9).

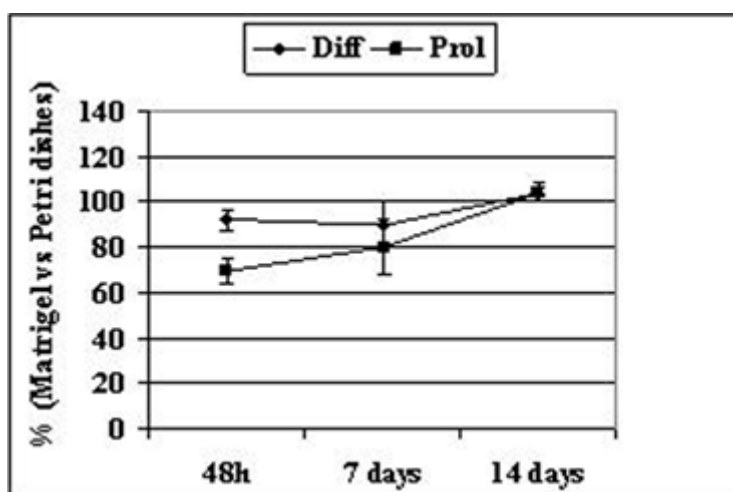


Fig. 9. Saggio di vitalità eseguito su MSC da UCB seminate su MatrigelTM con terreno proliferativo (Prol) e con terreno differenziativo (Diff). Valori espressi in percentuale rispetto al controllo rappresentato dalle MSC seminate su plastica non trattata (100%).

In maniera simile alle cellule seminate su plastica, le cellule seminate su MatrigelTM hanno mostrato di esprimere in maniera costitutiva l'mRNA per i marker epatici Albumina e PEPCK-C ma soltanto dopo 14 giorni di coltura. L'espressione di questi marcatori nelle cellule, dopo 14 giorni di coltura in terreno differenziativo, è aumentata rispettivamente di 91.77 volte e 7.7 volte rispetto al controllo in terreno proliferativo (Fig. 10A-B). Anche seminate su questo supporto le MSC da UCB non esprimevano l'mRNA per l'AFP in nessuna delle due condizioni sperimentali.

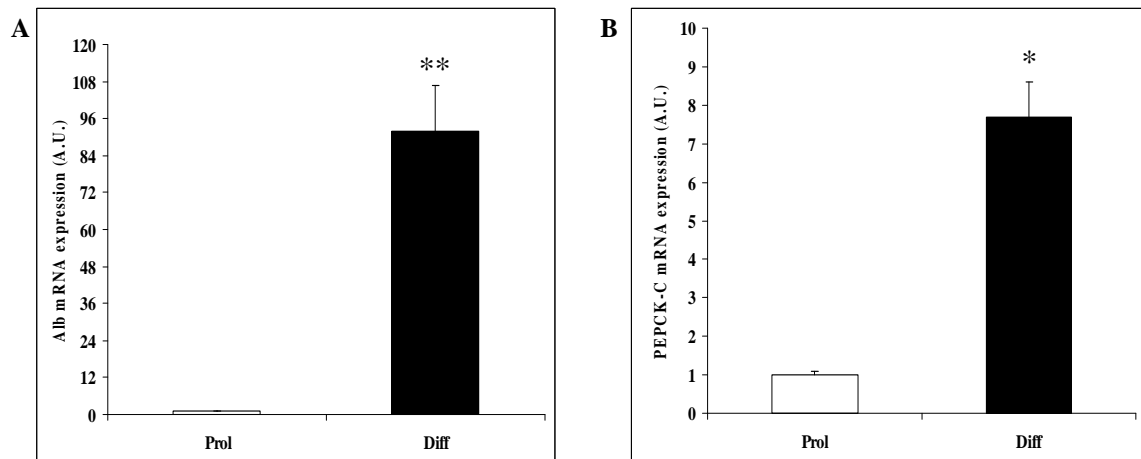


Fig. 10. Espressione dell'mRNA dei marcatori epatocitari Albumina (A) e PEPCK-C (B) nelle MSC da UCB seminate su MatrigelTM e trattate con terreno proliferativo (Prol) e differenziativo (Diff) per 14 giorni. ** p<0.02.

Come per le cellule seminate su plastica non trattata, l'analisi immunocitochimica per l'espressione dell'Albumina e dell'AFP ha confermato i dati ottenuti dalla Real-Time PCR. Come mostrato in **Fig. 11**, infatti, le MSC sono risultate negative alla colorazione effettuata con l'anticorpo diretto contro l'AFP e positive solo a 14 giorni di coltura all'anticorpo diretto contro l'Albumina.

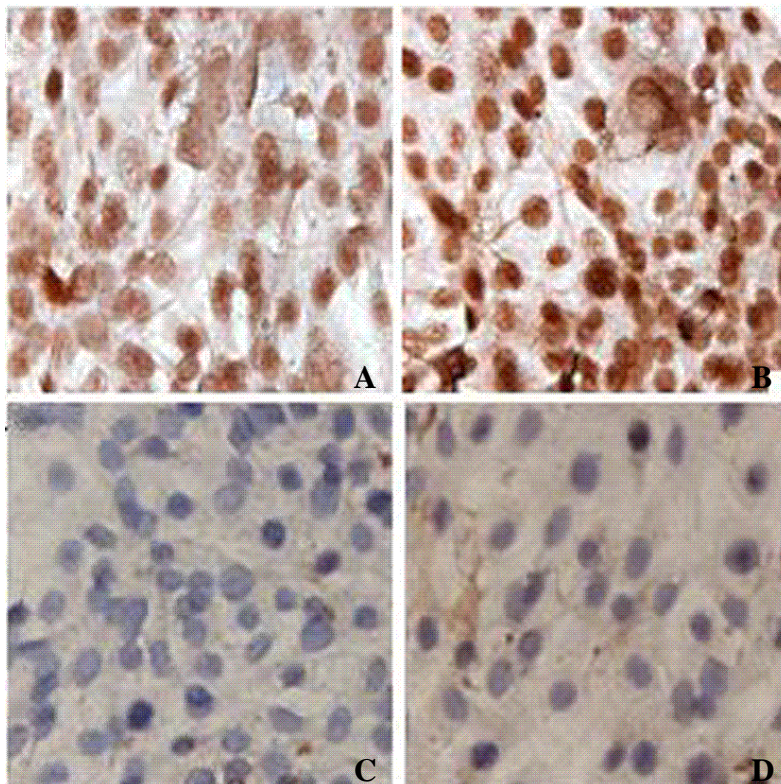


Fig. 11. Immunocitochimica su MSC da UCB poste in coltura con terreno proliferativo e trattate con anticorpi anti-Albumina (A) e AFP (C). MSC da UCB poste in coltura per 14 giorni con terreno differenziativo e trattate con anticorpo anti -Albumina (B) e AFP (D). Ingrandimento: 400x.

3.3 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRICE ACELLULARE OMOLOGA

L'istochimica della matrice ottenuta da sezioni di fegato ha mostrato che dopo un solo ciclo di trattamento detergente-enzimatico il tessuto risultava completamente decellularizzato (**Fig. 12A**) e manteneva invece la componente fibrillare come dimostrato dalla colorazione Masson tricromica (**Fig. 12B**).

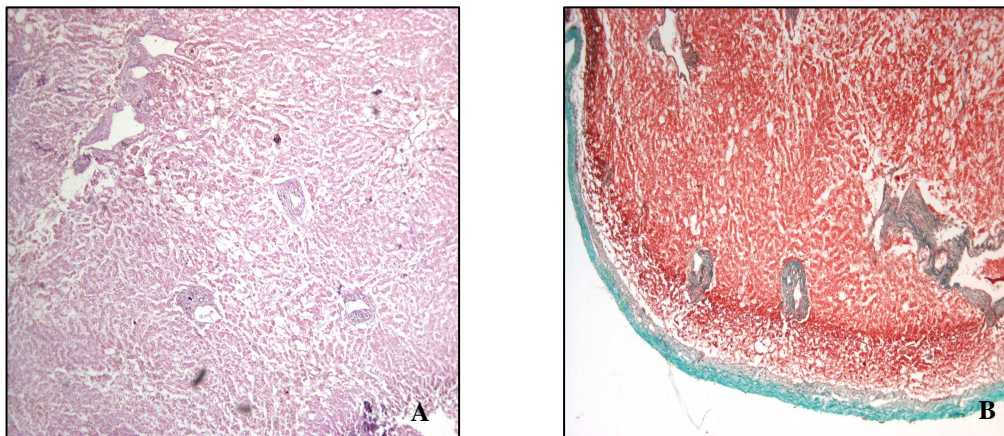


Fig. 12. Matrice acellulare di fegato umano in seguito a trattamento detergente-enzimatico. Colorazione ematossilina-eosina (A); Colorazione Masson-Tricromica (B). Ingrandimento: 40x.

Come per le cellule seminate su Matrigel, anche per le cellule seminate su matrice acellulare di fegato è stata misurata la vitalità e confrontata con quella delle stesse cellule messe in coltura su plastica non trattata. La vitalità delle MSC seminate sulla matrice e trattate con terreno proliferativo è scesa significativamente fino a 7 giorni per poi risalire nella settimana successiva. Quando sono state messe in coltura con terreno differenziativo le MSC da sangue cordonale hanno invece mostrato una drastica diminuzione della vitalità già nei primi due giorni di coltura. Solo dopo 7 giorni di coltura la vitalità di questa cellule ha cominciato a risalire progressivamente fino ai 14 giorni senza però mai raggiungere il livello di quelle seminate su plastica non trattata (**Fig. 13**).

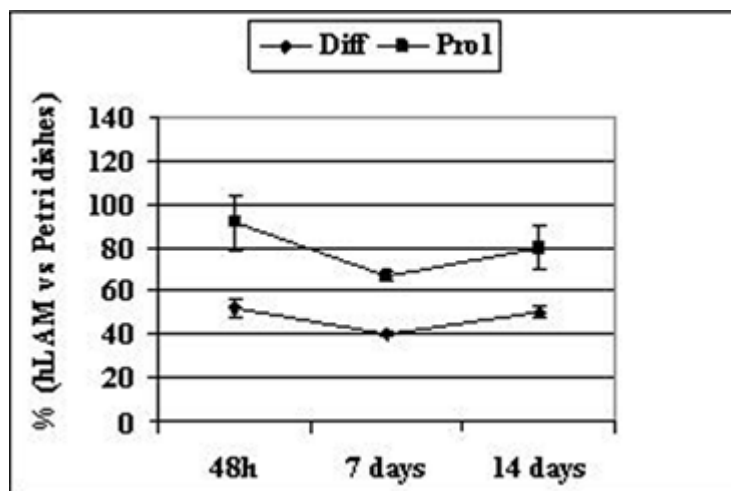


Fig. 13. Saggio di vitalità eseguito su MSC da UCB seminate su matrice acellulare di fegato con terreno proliferativo (Prol) e con terreno differenziativo (Diff). Valori espressi in percentuale rispetto al controllo rappresentato delle MSC seminate su plastica non trattata (100%).

L'osservazione alla microscopia elettronica a scansione ha messo in evidenza che le MSC coltivate con terreno proliferativo, dopo 7 giorni dalla semina, erano in grado di aderire alla matrice ma senza ricoprirla completamente. Le cellule mostravano una forma allungata ed erano orientate parallelamente al substrato fibroso (**Fig. 14A**). Dopo 14 giorni di coltura con lo stesso terreno l'analisi al SEM (Microscopio Elettronico a Scansione) ha mostrato che le cellule avevano coperto completamente la matrice creando uno strato con superficie liscia (**Fig. 14B**).

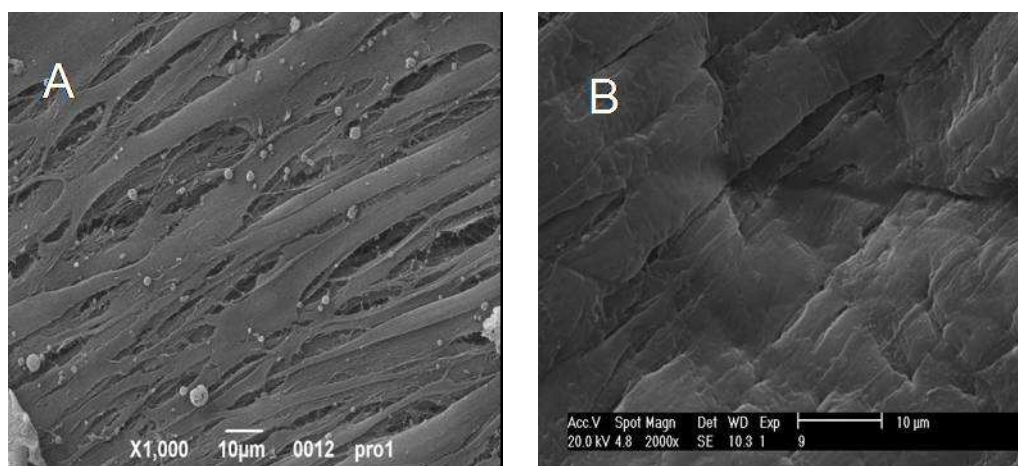


Fig. 14. Microscopia elettronica a scansione delle MSC da UCB su matrice acellulare di fegato umano a 7 giorni (A) e a 14 giorni (B) dalla semina con terreno proliferativo. Ingrandimenti: 1000x, 2000x.

In maniera simile, ad una settimana dalla semina sulla matrice, le cellule trattate con il terreno differenziativo avevano aderito alla matrice, senza coprirla completamente (**Fig. 15A**), mentre dopo 14 giorni di coltura le stesse cellule avevano formato uno strato compatto e ben organizzato, mostrando la formazione di ramificazioni della membrana citoplasmatica (**Fig. 15B**).

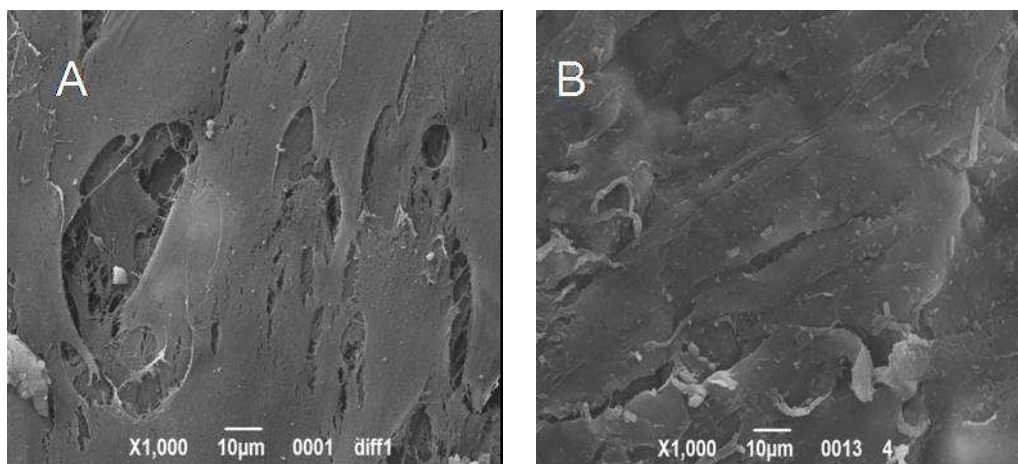


Fig. 15. Microscopia elettronica a scansione delle MSC da UCB su matrice acellulare di fegato umano a 7 giorni (A) e a 14 giorni (B) dalla semina con terreno differenziativo. Ingrandimento: 1000x.

L'analisi effettuata con Real-time PCR dei marcatori epatici ha confermato l'espressione costitutiva da parte di queste cellule dell'mRNA per l'AFP, l'Albumina e il PEPCK-C. Quando sono state messe in coltura con terreno differenziativo epatogenico, l'espressione dell'mRNA per l'AFP è risultata assente fino al settimo giorno di coltura per poi aumentare progressivamente fino al quattordicesimo giorno senza mai raggiungere il livello di espressione delle cellule in terreno proliferativo (**Fig. 16A**). L'espressione dell'mRNA per l'Albumina presente nelle cellule in coltura con terreno proliferativo, è stata persa in quelle trattate con terreno differenziativo a 7 giorni, per essere poi presente dopo 14 giorni di differenziamento senza raggiungere, ancora una volta, il livello di espressione dello stesso mRNA nelle cellule in terreno proliferativi (**Fig. 16B**). L'espressione dell'mRNA per il PEPCK-C invece, a 7 e 14 giorni dall'induzione del differenziamento, è stata rispettivamente di 1.3 e 6.4 volte rispetto alle cellule in terreno proliferativo agli stessi time-point (**Fig. 16C**).

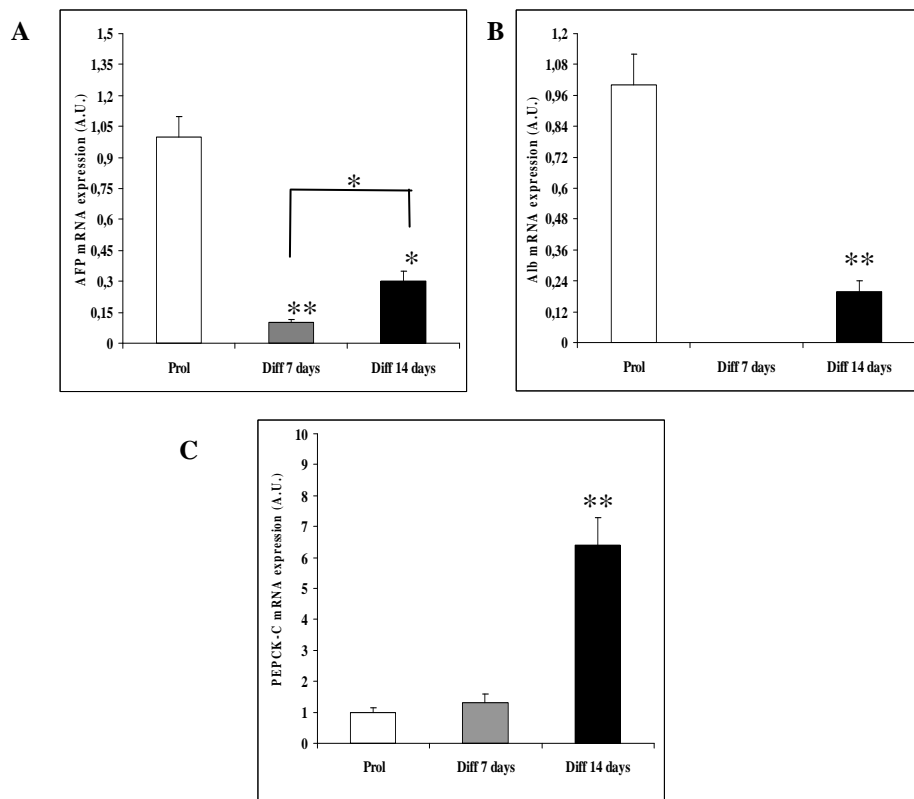


Fig.16 Espressione dell'mRNA dei marcatori epatocitari AFP (A), Albumina (B) e PEPCK-C (C) nelle MSC da UCB seminate su matrice acellulare di fegato e trattate con terreno proliferativo (Prol) e differenziativo (Diff) per 7 e 14 giorni. * p<0.05; ** p<0.02.

4. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE MSC DA UC

Sono stati raccolti e processati 135 campioni di UC e dal 98% di questi, dopo 2 settimane di coltura, sono state ottenute colonie di cellule con morfologia fibroblastoide, tipica delle cellule staminali mesenchimali (**Fig. 17**).

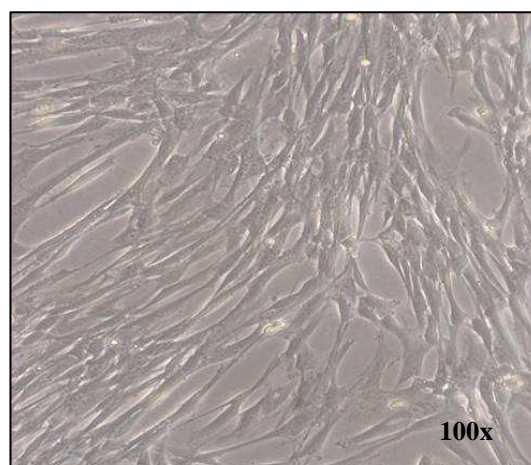


Fig.17. Microscopia ottica a contrasto di fase di colture primarie di cellule fibroblastoidi da UC a 14 giorni dall'isolamento. Ingrandimento:100x.

L'analisi al citofluorimetro eseguita su questa popolazione cellulare al secondo passaggio ha mostrato una forte espressione dei marker tipici della linea mesenchimale CD105 (94.4%) e CD90 (51.1%), mentre sono risultati debolmente espressi i marker della linea ematopoietica CD14, CD34, CD45, CD71 e assente il marker HLA-DR (Fig.18).

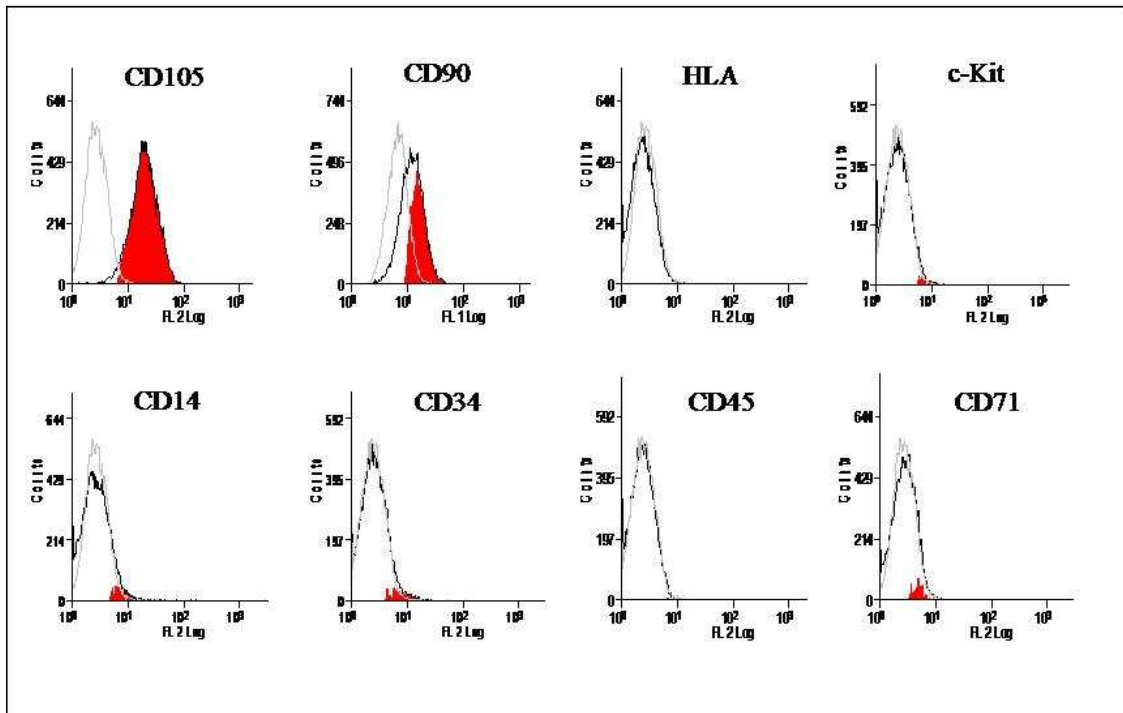


Fig. 18. Istogrammi di citofluorimetria che mostrano l'immunofenotipo delle MSC da UC (picco rosso) rispetto al controllo negativo (picco nero). Come controllo negativo è stato utilizzato anticorpo isotipico.

La successiva analisi attraverso RT-PCR per il gene SRY di MSC isolate da campioni di UC di neonati maschi ha dimostrato la presenza in questa sottopopolazione di cellule di origine fetale (Fig.19).

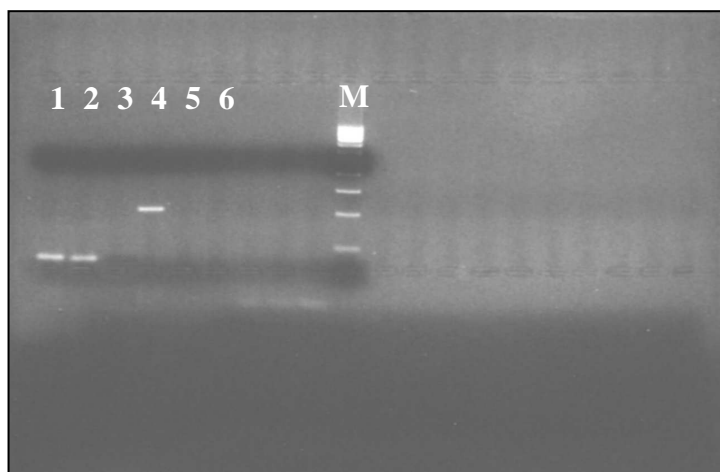


Fig. 19. RT-PCR delle MSC da UC per l'espressione del gene Sry (213pb): cellule da UC di neonato maschio (linea 4); cellule da UC di neonato femmina (linea 5); espressione del gene housekeeping GAPDH (68pb) nei campioni (linea 1, 2); controllo della retrotrascrizione (linea 3 e 6); M, marcatore di peso molecolare.

E' stato inoltre effettuato un primo studio preliminare, anche se con una bassa numerosità di campioni, sulla lunghezza dei telomeri e l'attività dell'enzima telomerasi in queste cellule a passaggi successivi fino al 18°. E' stato riscontrato che i telomeri tendevano ad allungarsi nei primi passaggi in coltura per poi accorciarsi progressivamente e raggiungere una certa stabilità agli ultimi passaggi analizzati (**Fig. 15**).

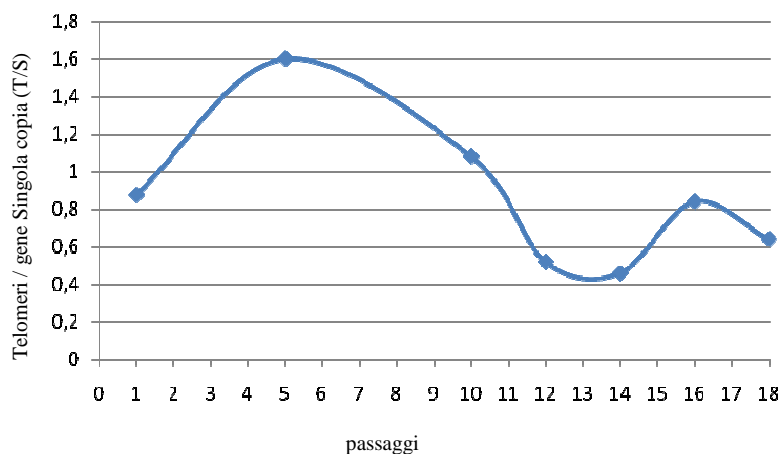


Fig.20. Studio della lunghezza dei telomeri espressa come rapporto Telomeri/gene a singola copia (T/S).

L'attività dell'enzima telomerasi sembrava essere correlata con l'andamento della lunghezza dei telomeri aumentando leggermente nei primi passaggi, in corrispondenza dell'allungamento dei telomeri, per poi abbassarsi in corrispondenza dell'accorciamento dei telomeri, ed avere un ultimo picco negli ultimi passaggi. (Fig. 21)

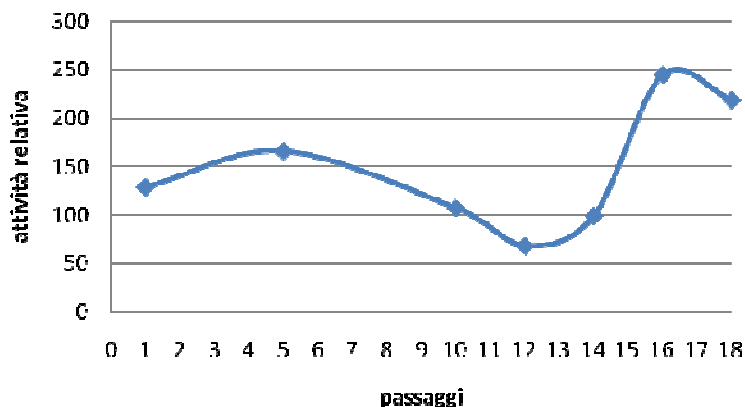


Fig. 21. Studio dell'attività telomerasica delle MSC da UC messe in coltura con terreno proliferativo a passaggi successivi.

5. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO E OSTEOGENICO IN VITRO DI MSC DA UC

Come per le MSC da UCB, anche in questo caso è stata verificata la capacità della popolazione cellulare isolata di differenziare in diverse linee cellulari di origine mesodermica, quali la linea adipogenica ed osteogenica, per confermarne la natura di cellule staminali mesenchimali.

5.1 INDUZIONE ADIPOGENICA

Dopo 9 giorni di coltura in terreno differenziativo adipogenico, le cellule perdevano la loro caratteristica morfologia fibroblastoide e assumevano una forma rotondeggiante. Nel citoplasma comparivano granuli citoplasmatici il cui contenuto di natura lipidica è stato evidenziato dalla colorazione Oil-Red-O (Fig. 22A). Le stesse cellule mantenute in terreno di proliferazione hanno invece mantenuto una morfologia fibroblastoide risultando negative alla stessa colorazione (Fig. 22B).

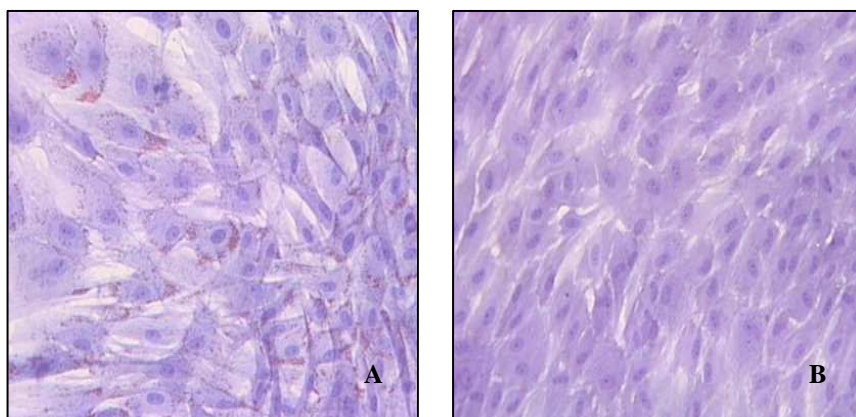


Fig. 23. Colorazione Oil-Red-O di colture di MSC da UC in terreno adipogenico (A) e in terreno proliferativo (B). Ingrandimento: 200x.

5.2 INDUZIONE OSTEOGENICA

Dopo 7 giorni di coltura in terreno differenziativo osteogenico, le cellule ottenute da UC tendevano a stratificare ed erano in grado di produrre matrice mineralizzata, come evidenziato dalla colorazione von Kossa (**Fig. 24A**), mentre non risultava deposizione di sali di calcio da parte di cellule mantenute in terreno proliferativo (**Fig. 24B**).

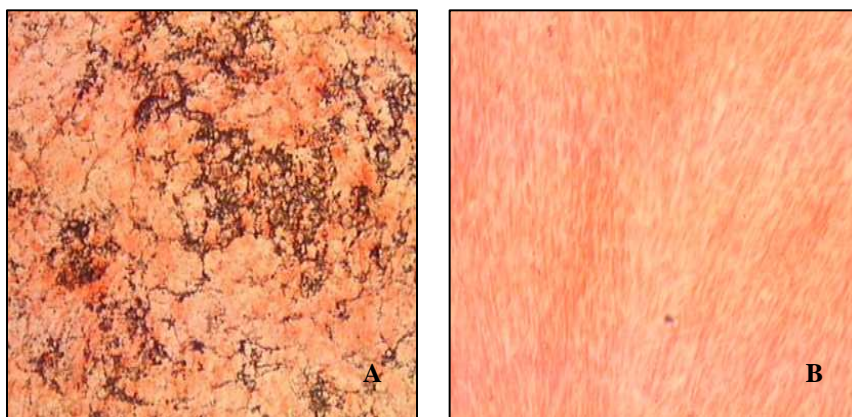


Fig. 24. Colorazione von Kossa di MSC da UC trattate con terreno osteogenico (A) e con terreno proliferativo (B). Ingrandimento: 100x.

6. DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO *IN VITRO* DI MSC DA UC

6.1 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU PLASTICA NON TRATTATA

E' stata valutata la capacità delle cellule staminali mesenchimali ottenute da UC e seminate su plastica non trattata, di differenziare in epatociti, cioè in cellule di origine embrionale diversa in quanto provenienti dal foglietto embrionale endodermico.

Le cellule poste in coltura con terreno differenziativo contenente fattori induttivi epatogenici hanno mostrato un cambiamento morfologico già dopo 14 giorni, acquisendo una forma poligonale e mostrando la comparsa di un citoplasma granulare (**Fig. 25**).

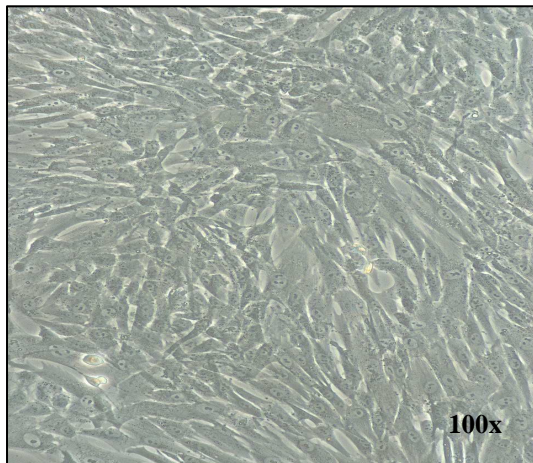


Fig.25. Microscopia ottica a contrasto di fase di MSC da UC seminate su plastica non trattata dopo 14 giorni di coltura con terreno differenziativo. Ingrandimento: 100x.

L'analisi attraverso Real-Time PCR dell'espressione dell'RNA messaggero dei marcatori epatici AFP, Albumina e dell'MTP ha mostrato che la popolazione di staminali isolata esprimeva in maniera costitutiva questi marcatori e la loro espressione rimaneva stabile fino al 28esimo giorno di coltura in terreno proliferativo mettendo in evidenza la potenzialità epatogenica insita in queste cellule.

La stessa analisi effettuata sulle cellule poste in coltura con terreno differenziativo ha evidenziato una down-regolazione statisticamente significativa ad ogni time-point dell'espressione dell'mRNA per l'AFP, marcatore precoce del differenziamento epatocitario, rispetto alle cellule in terreno proliferativo. L'espressione dell'mRNA per l'Albumina invece aumentava progressivamente fino ai 28 giorni di coltura rispetto alle cellule non differenziate. Infine l'espressione dell'mRNA per l'MTP rimaneva stabile fino a 7 giorni di coltura in terreno differenziativo per poi aumentare progressivamente fino ai 28 giorni (**Tab. 5**).

All'analisi immunocitochimica queste cellule sono risultate positive all'anticorpo diretto contro l'albumina umana dopo 14 giorni di coltura in terreno differenziativo (**Fig. 26A-B**), mentre non è stata rilevata l'espressione dell'AFP a nessun time-point né nelle cellule indifferenziate che differenziate (**Fig. 26C-D**).

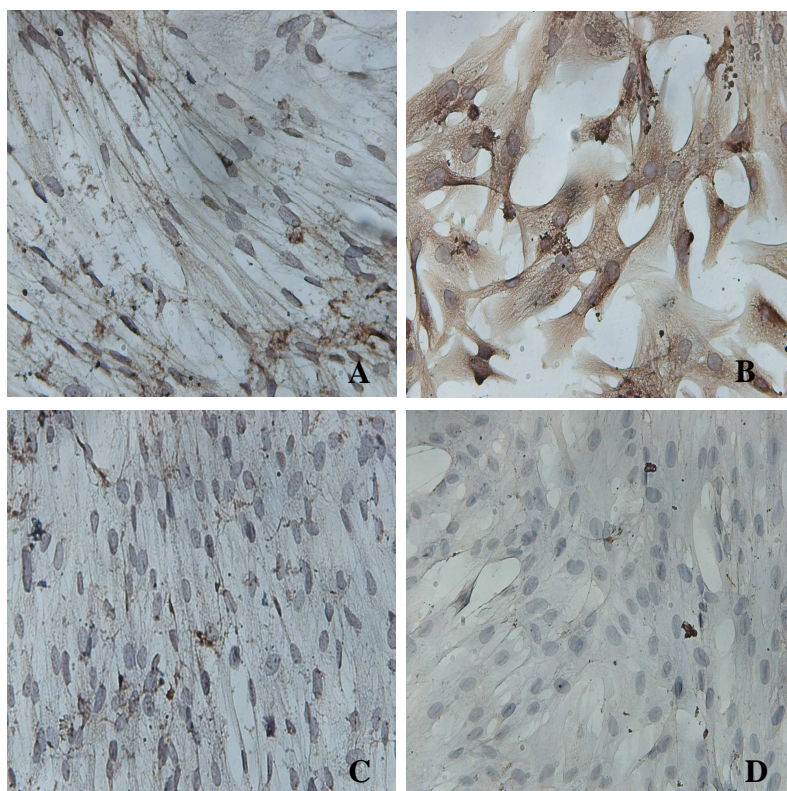


Fig. 26. Immunocitochimica su MSC da UC seminate su plastica non trattata, messe in coltura con terreno proliferativo e trattate con anticorpi anti-Albumina (A) e AFP (C).

MSC da UCB seminate su plastica non trattata, messe in coltura per 14 giorni con terreno differenziativo e trattate con anticorpo anti Albumina (B) e AFP (D). Ingrandimenti 200x.

I test funzionali hanno confermato la capacità delle MSC da UC di differenziare in cellule simil-epatocitarie. Infatti il saggio ELISA ha messo in evidenza che la quantità di albumina secreta da queste cellule poste in terreno differenziativo aumentava progressivamente ad ogni time-point fino a raggiungere il livello massimo a 28 giorni (**Tab. 6**), e la colorazione PAS per l'accumulo di glicogeno è risultata positiva già dopo 14 giorni di coltura sempre con terreno differenziativo (**Fig. 27**).

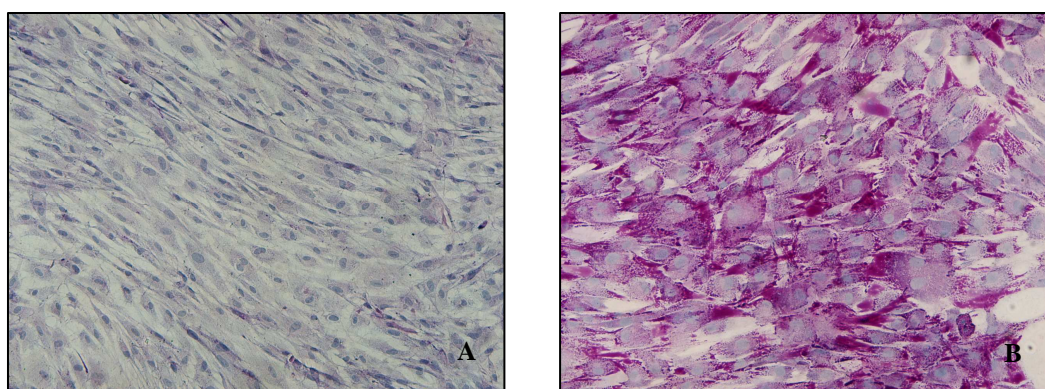


Fig. 27. Colorazione PAS di MSC da UC dopo 14 giorni di coltura con terreno proliferativo (A) e con terreno differenziativo (B). Ingrandimento: 200x.

Infine l'analisi al citofluorimetro delle cellule differenziate ha mostrato una diminuzione dell'espressione dei markers staminali mesenchimali CD105 e CD90. Dopo 7 e 14 giorni di differenziamento, infatti, la percentuale delle cellule CD90 positive era del 45% e del 32.8% rispettivamente e la percentuale delle cellule CD105 positive era del 64% e del 13.7% (**Fig. 28**).

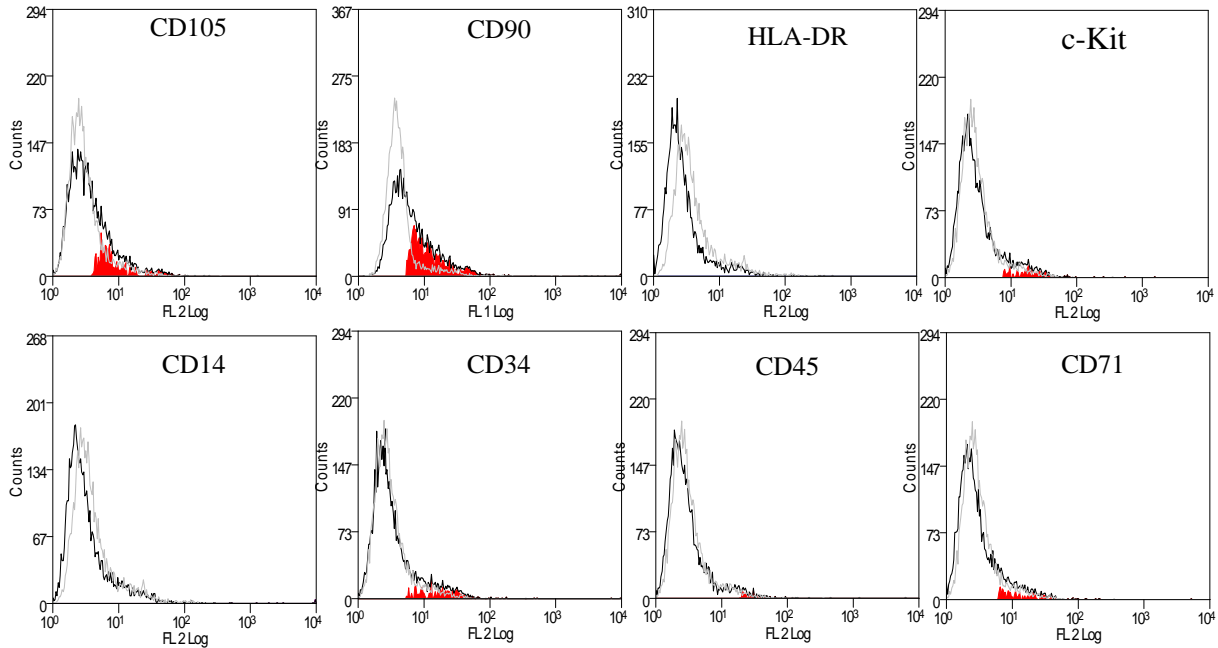


Fig. 28. Istogrammi di citofluorimetria che mostrano l'immunofenotipo delle MSC da UC (picco rosso) dopo 14 giorni in terreno differenziativo rispetto al controllo negativo (picco nero). Come controllo negativo è stato utilizzato anticorpo isotipico.

6.2 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRIGELTM

Le MSC da UC sono state seminate su piastre di colture precedentemente condizionate con MatrigelTM ed è stata nuovamente testata la loro capacità di differenziare in cellule simil-epatocitarie.

Come per le cellule seminate sul supporto di plastica non trattata, anche le MSC seminate su MatrigelTM hanno cambiato morfologia già dopo 14 giorni dall'induzione del differenziamento (**Fig.29**).

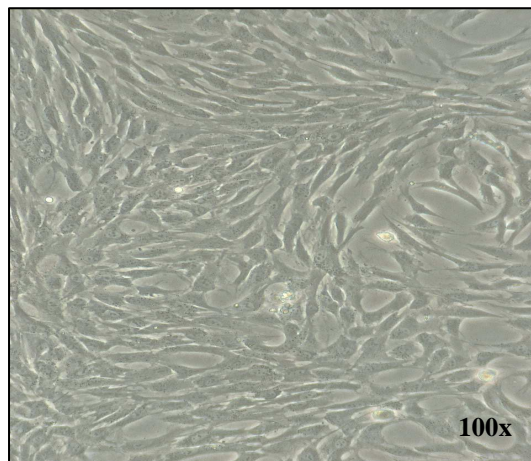


Fig. 29. Microscopia ottica a contrasto di fase di MSC da UC seminate su MatrigelTM dopo 14 giorni di coltura con terreno differenziativo. Ingrandimento: 100x.

E' stata quindi misurata la vitalità delle MSC seminate su supporto di MatrigelTM e confrontata con quella delle MSC seminate su plastica sia con terreno differenziativo che proliferativo. L'analisi dei dati ottenuti non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa tra le MSC seminate sui due diversi supporti ad ogni time-point considerato (7, 14, 21, 28 giorni) (**Fig. 30**).

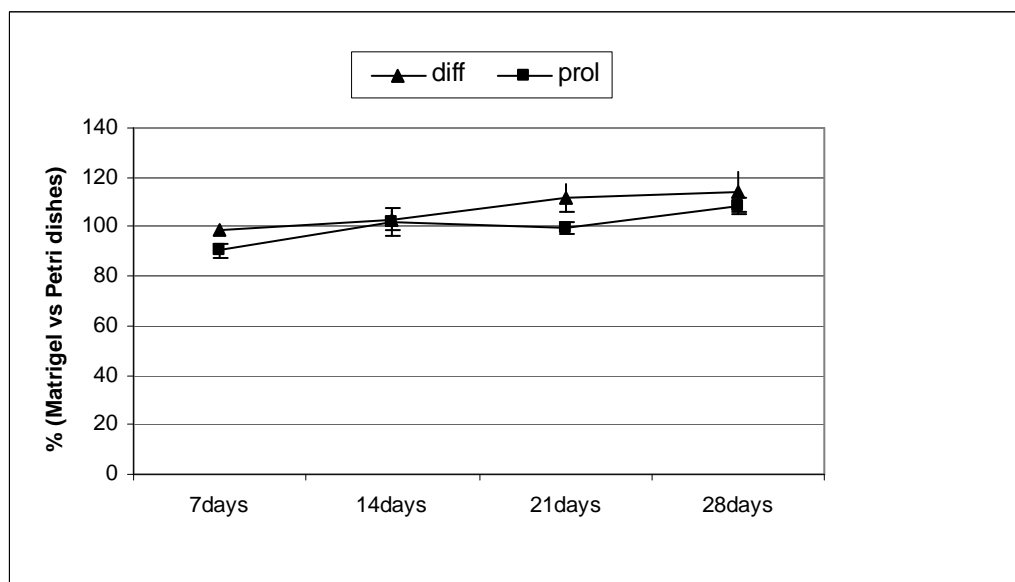


Fig. 30. Saggio di vitalità eseguito su MSC da UC seminate su MatrigelTM e trattate con terreno proliferativo (Prol) e con terreno differenziativo (Diff). Valori espressi in percentuale rispetto al controllo rappresentato dalle MSC seminate su plastica non trattata (100%).

L'analisi attraverso Real-Time PCR ha mostrato che, in maniera simile alle MSC seminate su plastica non trattata, le MSC seminate su MatrigelTM esprimevano in

maniera costitutiva l'mRNA per i marker epatici AFP, Albumina e MTP ed erano in grado di modularne l'espressione durante il processo di differenziamento.

Nelle MSC trattate con terreno differenziativo, ad ogni time-point, l'espressione dell'mRNA per l'AFP era inferiore rispetto a quella delle stesse cellule coltivate con terreno proliferativo e, a differenza delle cellule seminate su plastica non trattata, si è mantenuta stabile fino al 28esimo giorno di coltura. L'espressione dell'mRNA per l'Albumina, rimasta al di sotto del valore delle cellule in terreno proliferativo a 7 giorni dall'induzione del differenziamento, è invece aumentata in maniera progressiva fino a 28 giorni, pur rimanendo sempre al di sotto dei valori trovati per le cellule seminate sulla semplice plastica non trattata. Infine è stato dimostrato che l'espressione dell'mRNA per l'MTP rimaneva stabile fino a 14 giorni di coltura per raggiungere il picco a 21 giorni dall'induzione del differenziamento. Tutti gli esperimenti hanno mostrato una diminuzione dell'espressione di quest'ultimo marcatore a 28 giorni dal differenziamento rispetto ai 21 giorni (**Tab. 5**).

Come per le MSC seminate su plastica non trattata, anche per le MSC seminate su MatrigelTM la successiva analisi immunocitochimica ha rivelato l'espressione della proteina Albumina solo nelle cellule poste in terreno differenziativo dopo 14 giorni di coltura (**Fig. 31A-B**) mentre l'AFP non è mai stata rilevata (**Fig. 31C-D**).

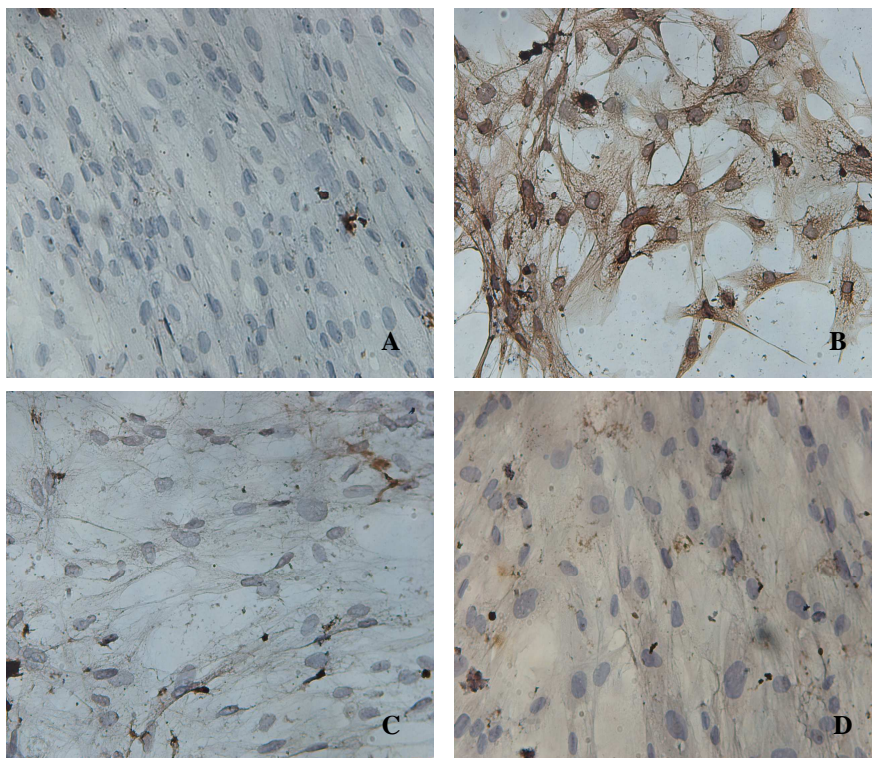


Fig. 31. Immunocitochimica su MSC da UC seminate su MatrigelTM, messe in coltura con terreno proliferativo e trattate con anticorpi anti-Albumina (A) e AFP (C). MSC da UCB seminate su MatrigelTM, messe in coltura per 14 giorni con terreno differenziativo e trattate con anticorpo anti Albumina (B) e AFP (D). Ingrandimento: 200x.

Il saggio ELISA ha dimostrato che le MSC seminate su MatrigelTM, oltre ad essere in grado di secernere Albumina nel surnatante, mostravano un aumento della quantità di proteina prodotta durante il differenziamento raggiungendo livelli paragonabili a quelli delle MSC differenziate su plastica non trattata (**Tab. 6**). Inoltre la colorazione PAS per l'accumulo di glicogeno è risultata positiva anch'essa dopo 14 giorni di coltura in terreno differenziativo (**Fig. 32**).

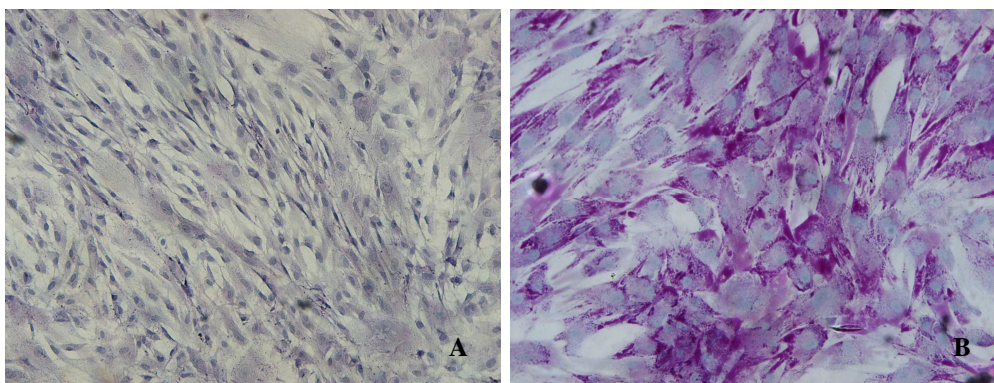


Fig. 32. Colorazione PAS di MSC da UC dopo 14 giorni di coltura con terreno proliferativo (A) e con terreno differenziativo (B). Ingrandimento: 200x.

6.3 DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO SU MATRICE ACELLULARE DI FEGATO

Analogamente a quanto fatto per le MSC seminate su MatrigelTM, è stata misurata la vitalità anche per le MSC seminate sulla matrice acellulare omologa e confrontata con quella delle stesse cellule seminate su plastica non trattata. Dopo la semina sulla matrice, sia in terreno proliferativo che in terreno differenziativo, la vitalità cellulare mostrava una diminuzione significativa fino a 14 giorni di coltura, per poi risalire gradualmente ai successivi time-point, restando comunque al di sotto dei valori espressi dalle MSC seminate su plastica non trattata (**Fig. 33**).

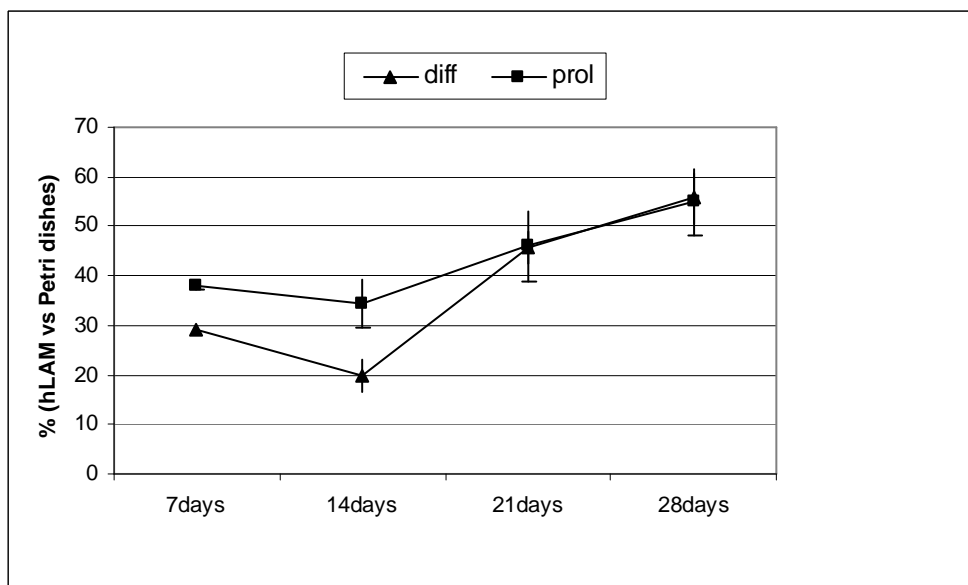


Fig. 33. Saggio di vitalità eseguito su MSC da UC seminate su matrice acellulare di fegato e trattate con terreno proliferativo (Prol) e con terreno differenziativo (Diff). Valori espressi in percentuale rispetto al controllo rappresentato dalle MSC seminate su plastica non trattata (100%).

L'analisi morfologica effettuata al microscopio elettronico a scansione non ha evidenziato alcun cambiamento morfologico nelle cellule anche dopo 28 giorni di coltura con terreno differenziativo (**Fig. 34**).

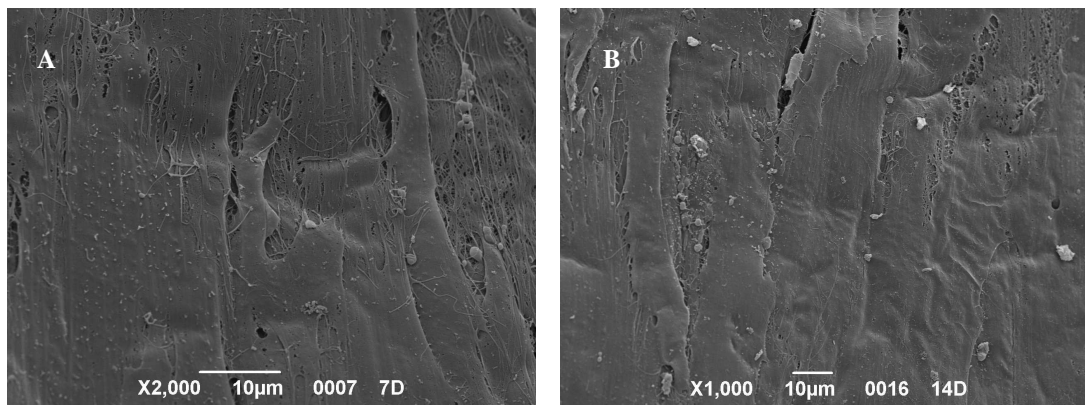


Fig. 34. Microscopia elettronica a scansione delle MSC da UC su matrice acellulare di fegato umano a 7 giorni (A) e a 28 giorni (B) dalla semina con terreno differenziativo. Ingrandimento: 2000x, 1000x.

La successiva analisi molecolare mediante Real-time PCR ha nuovamente confermato l'espressione costitutiva da parte di queste cellule dell'mRNA per l'AFP e l'Albumina anche se l'andamento nel corso della coltura è stato diverso rispetto a quello mostrato dalle stesse cellule seminate sulla plastica non trattata. Infatti mentre l'espressione dell'mRNA per l'AFP è rimasta approssimativamente stabile fino al 28esimo giorno, l'espressione dell'mRNA dell'Albumina è diminuita già dopo 14 giorni di coltura.

Dopo induzione del differenziamento epatogenico, l'espressione dell'mRNA per l'AFP è rimasta stabile fino a 28 giorni di coltura mentre l'espressione dell'mRNA per l'Albumina è stata debolmente up-regolata a 7 giorni per poi mantenere valori simili a quelli delle cellule indifferenziate fino a 28 giorni.

L'espressione dell'mRNA per l'MTP invece non è mai stata rilevata (**Tab. 5**).

Infine il saggio ELISA per rilevare la presenza dell'albumina secreta dalle cellule ha messo in evidenza un aumento nel tempo della quantità della proteina presente nel surnatante. Il valore raggiunto però è sempre stato significativamente inferiore a quello riscontrato per le cellule seminate sugli altri due supporti. (**Tab. 6**).

Tab. 5 : Real-time PCR per I marcatori epatici nelle MSC da UYC differenziate sui tre diversi supporti .

	7 giorni	*p	14 giorni	*p	21 giorni	*p	28 giorni	*p	§ p
Plastica non trattata									
AFP	0.481 (0.472; 0.482)	0.040	0.573 (0.566; 0.575)	0.038	0.358 (0.357; 0.364)	0.049	0.124 (0.122; 0.124)	0.000	0.0378 (z= -2.08)
Alb	2.652 (2.630; 2.683)	0.016	4.298 (4.276; 4.438)	0.010	5.991 (5.966; 6.261)	0.012	7.880 (7.718; 8.144)	0.008	0.0219 (z= 2.30)
MTP	1.012 (1.007; 1.017)	NS	1.924 (1.910; 1.929)	0.005	3.606 (3.521; 3.612)	0.010	4.805 (4.741; 4.821)	0.001	0.0021 (z= 3.08)
Matrigel™									
AFP	0.719 (0.715; 0.719)	0.045	0.592 (0.591; 0.596)	NS	0.638 (0.635; 0.639)	0.020	0.587 (0.583; 0.589)	0.009	NS
Alb	0.704 (-0.701; 0.704)	0.041	1.437 (1.419; 1.445)	NS	1.926 (1.895; 1.945)	NS	2.486 (2.446; 2.520)	0.020	0.0065 (z= 2.72)
MTP	0.789 (0.781; 0.790)	NS	0.814 (0.813; 0.820)	NS	2.452 (2.432; 2.461)	0.009	2.274 (2.258; 2.278)	0.009	0.0122 (z= 2.51)
Matrici									
AFP	0.992 (0.982; 0.994)	NS	0.823 (0.819; 0.829)	NS	0.778 (0.777; 0.788)	NS	0.871 (0.837; 0.876)	NS	NS
Alb	1.580 (1.570; 1.595)	0.035	0.860 (0.859; 0.867)	NS	0.834 (0.822; 0.847)	NS	0.788 (0.786; 0.793)	NS	NS
MTP	nd		nd		nd		nd		

*p Mann-Whitney U-test

§p Cuzick's trend test

Tab. 6. Secrezione dell'Albumina nel surnatante delle MSC da UC differenziate sui diversi supporti

	7 giorni	14 giorni	21 giorni	28 giorni	[¥] p
Plastica non trattata	2.135 (2.010; 2.345)	6.565 (6.512; 6.642)	7.850 (7.725; 7.925)	10.668 (10.525; 10.760)	0.0002 (z= 3.75)
Matrigel	1.690 (1.627; 1.772)	6.990 (6.422; 7.607)	6.580 (6.400; 6.890)	10.230 (10.082; 10.407)	0.0010 (z= 3.28)
Matrice	1.475 (1.382; 1.562)	1.740 (1.677; 1.822)	2.825 (2.677; 3.117)	2.985 (2.852; 3.232)	0.0006 (z= 3.45)

[¥]p Cuzick's trend test

7. DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO DI MSC DA UC: CONFRONTO TRA I DIVERSI SUPPORTI

Per analizzare il diverso contributo dei tre differenti supporti alla capacità delle MSC da cordone ombelicale di differenziare in cellule simil-epatociti, è stato effettuato un confronto dell'espressione di ciascun marcatore molecolare e della secrezione dell'albumina ad ogni tempo considerato su ogni supporto utilizzato. Questa analisi ha mostrato una evidente differenza tra i supporti (**Tab. 7A**).

Il test Kruskal-Wallis seguito dalla correzione di Bonferroni ha mostrato che la matrice acellulare di fegato è il supporto peggiore per il differenziamento delle MSC in epatociti. Infatti dal confronto è stato messo in evidenza che la down-regolazione dell'espressione dell'mRNA per l'AFP e l' up-regolazione dell'mRNA per l'Albumina erano più marcati nelle MSC seminate sulla plastica non trattata. Inoltre la secrezione dell'Albumina era inequivocabilmente più alta nelle cellule seminate su plastica non trattata o su MatrigelTM che in quelle seminate sulle matrice acellulare. Inoltre l'assenza dell'mRNA per l'MTP suggerisce che le MSC da UC messe in coltura su matrice non sono in grado di raggiungere il fenotipo simil-epatocitario (**Tab. 7B**).

Il successivo confronto tra plastica non trattata e MatrigelTM ha messo in evidenza che la down-regolazione dell'espressione dell'mRNA per l'AFP è stata maggiore nella plastica non trattata raggiungendo livelli significativi dopo 28 giorni di coltura ([§]p=0.0118). Inoltre l' up-regolazione dell'espressione dell'mRNA per l'MTP sembra essere più marcata nelle cellule seminate su plastica non trattata ([¥]p=0.0021 vs. [¥]p=0.0122). Infine dal confronto multiplo seguito dalla correzione di Bonferroni è risultato che l'espressione dell'mRNA per l'MTP dopo 14 e 28 giorni dall'induzione del

differenziamento era significativamente più alta nelle cellule seminate sulla plastica non trattata (**Tab. 7B**).

Tab. 7. Analisi dell' espressione dell' mRNA dei marcatori epatici e della secrezione di Albumina ad ogni time-point (A). Confronto tra i supporti (B).

A) Kruskal-Wallis test

	7 giorni	14 giorni	21 giorni	28 giorni
AFP	0.0493	NS	0.0491	NS
Albumina	0.0332	0.0273	0.0391	0.0394
MTP	nd	nd	nd	nd
Secrezione Albumina	0.0125	0.0231	0.0248	0.0210

B) Kruskal-Wallis test seguito dalla correzione di Bonferroni

		7 giorni	14 giorni	21 giorni	28 giorni
Plastica vs. matrice	AFP	0.0153	NS	0.0138	0.0040
	Alb	NS	0.0014	0.0034	0.0010
	MTP	nd	nd	nd	nd
	Alb secr	0.0009	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
Matrigel TM vs. matrice	AFP	NS	NS	NS	NS
	Alb	0.0039	NS	NS	NS
	MTP	nd	nd	nd	nd
	Alb secr	NS	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
Plastica vs. Matrigel TM	AFP	NS	NS	NS	0.0118
	Alb	0.0003	0.0082	NS	NS
	MTP	NS	0.0026	NS	0.0127
	Alb secr	0.0088	NS	NS	NS

8. VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ RIGENERATIVA *IN VIVO* DELLE MSC DA UC

Per la sperimentazione *in vivo* sono stati utilizzati 20 topi Balb-c maschi: 4 sono stati trattati solo con una iniezione intraperitoneale di CCl₄ (controllo danno), a 4 sono state solo iniettate 10⁶ MSC attraverso la vena della coda (controllo cellule), 12 sono stati trattati con CCl₄ seguito, dopo 24 ore dall'iniezione intraperitoneale, dalla somministrazione delle cellule. A 24, 48, 72 ore e 7 giorni dalla somministrazione delle cellule sono stati sacrificati 1 animale per ogni gruppo controllo e 3 animali trattati.

La colorazione istologica con ematossilina-eosina eseguita su sezioni di fegato dopo 48 ore dall'induzione del danno permetteva di notare la presenza di sinusoidi molto dilatati, di aree multiple di necrosi coagulativa, che in alcune sezioni si estendeva anche alle zone periportalì con più focolai di necrosi dalla zona 3 alla zona 1 (**Fig. 35A-B**). Questo tipo di danno è risultato essere presente anche negli animali sacrificati dopo 72 ore e 4 giorni dall'induzione del danno.

L'analisi istologica effettuata sulle sezioni degli animali sacrificati a 8 giorni dal danno, invece, mostrava un quadro di progressiva risoluzione ma con la presenza ancora di zone di necrosi residua e aree di citolisi determinata dall'infiammazione in corso (**Fig. 35C-D**).

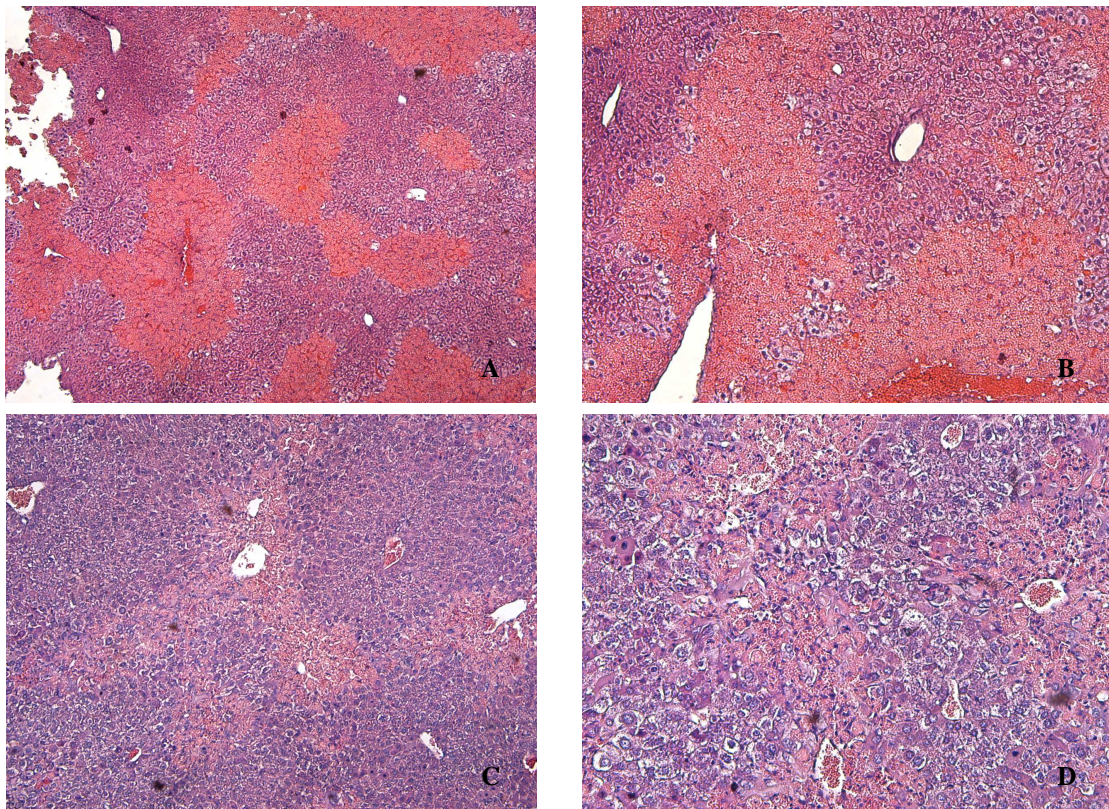


Fig. 35. Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di topo a 48 ore (A,B) e a 8 giorni (C,D) dall'iniezione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio. Ingrandimenti: A-C 50x, B-D 100x.

La stessa analisi istologica effettuata sulle sezioni di fegato provenienti dagli animali trattati anche con le cellule, non ha messo in evidenza alcuna differenza tra i trattati con le cellule e i controlli che avevano ricevuto la sola iniezione di tetracloruro di carbonio fino a 4 giorni dall'induzione del danno (**Fig. 36A-B**).

Invece negli animali sacrificati dopo 7 giorni dalla somministrazione delle cellule (8 giorni dall'induzione dal danno) il parenchima epatico risultava pressochè integro senza nessun segno di necrosi né di infiltrato infiammatorio e del tutto comparabile con quello di un animale sano (**Fig. 36C-D**).

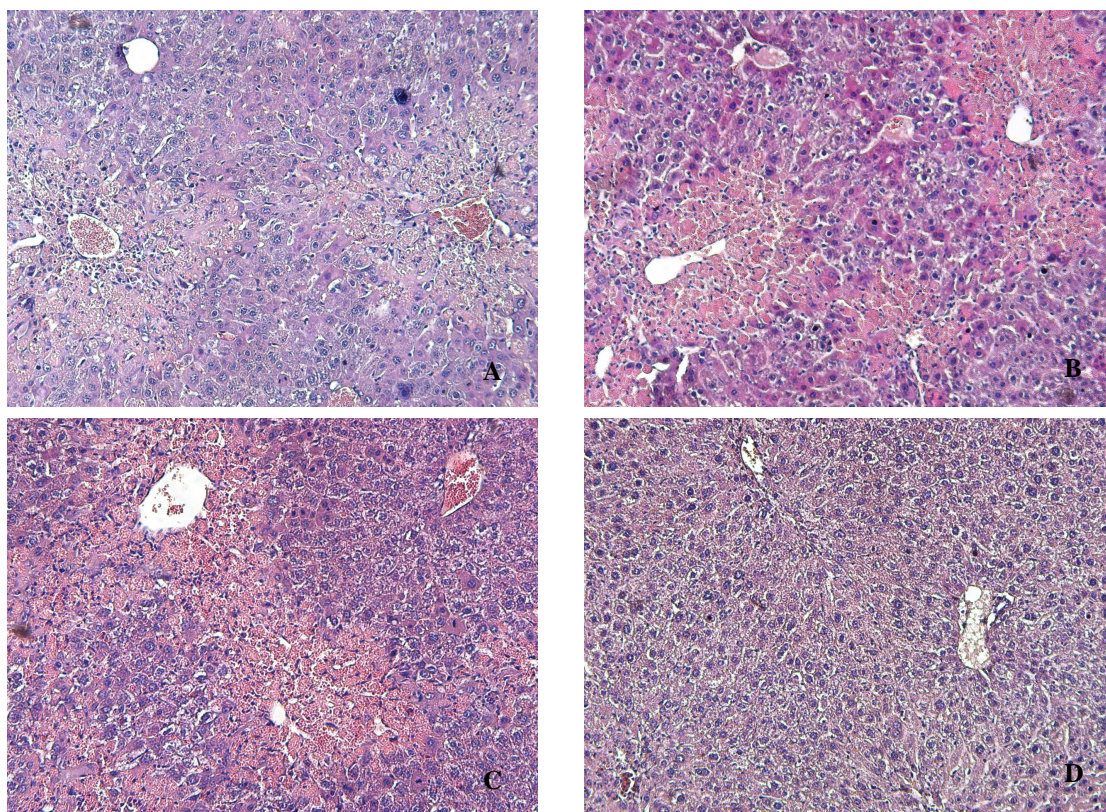


Fig. 36. Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di topo a 4 giorni (A) e a 8 giorni (B) dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio e a 72h (B) e 7 giorni dalla somministrazione delle MSC da UC (D). Ingrandimento: 100x.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni gli studi sull'utilizzo delle cellule staminali e le loro possibili fonti si sono intensificati, date le promettenti possibilità di una applicazione clinica, in modo particolare nella medicina rigenerativa [Stocum, 2001].

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che le ESC rappresentano le migliori candidate per l'utilizzo terapeutico, data la loro pluripotenzialità, ossia la capacità di differenziarsi in linee cellulari appartenenti a tutti i tre foglietti embrionali [Thomson et al., 1998]. Tuttavia i problemi di natura etica connessi all'utilizzo di embrioni umani, nonché i rischi di insorgenza di tumore in seguito all'utilizzo *in vivo* delle ESC [Reya et al., 2001], hanno portato i ricercatori ad indagare la presenza di cellule staminali in tessuti adulti.

Certamente il midollo osseo rappresenta la fonte principale di cellule staminali adulte, non solo di natura ematopoietica, ma anche di cellule progenitrici multipotenti e cellule staminali mesenchimali [Pittenger et al., 1999]. In particolare è stato dimostrato in numerosi studi che quest'ultime sono in grado di differenziare in linee cellulari non solo di origine mesodermica, ma anche endo- ed ecto-dermica.

Tuttavia la presenza in numero ristretto delle cellule staminali mesenchimali, con frequenza 1×10^{-4} - 1×10^{-5} rispetto alle cellule mononucleate stromali, l'invasività della procedura di aspirazione del midollo osseo, l'alto grado di rischio di esposizione virale durante il prelievo e l'evidenza che il numero di cellule staminali contenuto in esso diminuisca con l'avanzare dell'età del donatore [D'Ippolito et al., 1999], la ricerca si è indirizzata all'identificazione di fonti alternative di MSC.

Anche se alcuni studi hanno dimostrato che grandi quantità di progenitori mesenchimali sono presenti in organi fetali e circolano nel sangue di feti pretermine insieme ai precursori ematopoietici [Campagnoli et al., 2001; Guillot et al., 2007], sembra che il numero dei progenitori mesenchimali presenti, purtroppo, diminuisca drasticamente fino al termine della gestazione [Yu et al., 2004]. Questo fatto ha indotto alcuni scienziati a formulare l'ipotesi che alcune delle cellule ad elevato potenziale differenziativo effettivamente presenti nel circolo placentare durante la gestazione, possano lasciare il torrente circolatorio e possano essere ritrovate al termine della gravidanza nelle strutture annesse [Romanov et al., 2003].

Sono stati pertanto presi in considerazione i tessuti di derivazione fetale, quali cordone ombelicale e sangue cordonale in quanto proprio per la loro origine fetale si ritiene

possano contenere cellule in stato maggiormente indifferenziato [Lee O. K et al., 2004; Wang et al., 2004].

Anche se esistono molte evidenze riguardo la possibilità di ottenere MSC da UC e da UCB, la reale capacità proliferativa e differenziativa in cellule di origine embrionale diversa, come gli epatociti, delle popolazioni cellulari ottenute da tali fonti deve essere ancora del tutto chiarita.

Lo scopo della presente ricerca, quindi, è stato quello di studiare MSC isolate da UC e da UCB umano per valutarne l'espressione fenotipica e la potenzialità differenziativa *in vitro* verso linee cellulari di origine mesodermica ed endodermica, quale la linea epatocitaria. Infine, si è valutata la capacità di engraftment *in vivo* di tali cellule in un modello animale di danno epatico, aspetto molto importante per un possibile futuro impiego clinico di queste cellule.

In questo studio sono stati processati 135 campioni di UC e 116 unità di UCB dai quali sono stati isolate due popolazioni cellulari dalla morfologia fibroblastoide, tipica delle cellule staminali mesenchimali, attraverso sminuzzamento della gelatina di Wharton del cordone ombelicale o centrifugazione su gradiente per il sangue cordonale.

Come già dimostrato in letteratura [Secco et al., 2008], anche in questo studio la percentuale di ottenimento delle cellule è stata però molto differente tra le due diverse fonti: infatti solo da circa il 10% dei campioni di sangue cordonale è stato possibile isolare le staminali mesenchimali, mentre per il cordone ombelicale sono state ottenute le cellule dal 98% dei campioni.

L'analisi fenotipica di queste colture ha evidenziato un profilo compatibile con quello delle MSC, in quanto nelle cellule erano assenti o debolmente espressi marcatori tipici della linea ematopoietica quali c-kit, CD14, CD34 e CD45. CD14 è una proteina di membrana espressa dai monociti e dai macrofagi [Haziot A et al., 1988]. CD34 fa parte della famiglia delle sialomucine ed è implicata nell'adesione cellulare e nel mantenimento dello stato indifferenziato dei progenitori ematopoietici, inibendo il processo di differenziamento ematopoietico negli stessi [Fackler et al., 1995]. CD45 è una glicoproteina di superficie con funzione di fosfatasi tirosinica espressa ad alti livelli in tutte le cellule ematopoietiche [Trowbridge IS et al., 1993]. D'altra parte, le popolazioni cellulari isolate erano positive a marcatori considerati tipici delle MSC quali CD71, CD90 e CD105 [Pittenger et al., 1999; Weiss et al., 2006] e negative per HLA-DR, il complesso maggiore di istocompatibilità.

Lo studio dell'espressione del gene Sry in MSC da UC e UCB di neonato maschio mediante RT-PCR, che rappresenta una tecnica sensibile e specifica per determinare la presenza di DNA maschile in una popolazione cellulare mista, ha evidenziato la presenza di cellule fetali in tale popolazione cellulare, confermando l'ipotesi di una loro origine fetale e quindi la possibilità che queste si trovino in uno stato maggiormente indifferenziato [Muller-Ehmsen J et al., 2002].

La successiva dimostrazione della plasticità verso linee di derivazione mesodermica, quali la linea adipogenica e quella osteogenica delle due popolazione di MSC da noi isolate ha ulteriormente confermato il carattere "mesenchimale" di queste cellule .

La differenziazione adipogenica, infatti, è stata confermata dal cambiamento di morfologia cellulare da fibroblastoide a rotondeggiante e dalla presenza di vacuoli lipidici evidenziata mediante colorazione Oil-Red-O dopo coltura in terreno differenziativo per 9 giorni delle MSC da UC e per 11 giorni delle MSC da UCB, mentre la differenziazione in senso osteogenico delle stesse cellule è stata confermata oltre che dal cambiamento di morfologia (da fibroblastoide a osteoblasto-simile), dalla deposizione di matrice mineralizzata rivelata dalla colorazione von Kossa a 7 giorni dall'inizio dell'induzione delle cellule da UC e a 14 giorni dall'induzione delle cellule da UCB. In complesso, la capacità differenziativa *in vitro* verso queste due linee cellulari mesodermiche, nonché il profilo fenotipico presentato dalle MSC da UCB e da UC rientrano nei criteri minimi definiti dalla Società Internazionale per la Terapia Cellulare per essere considerate MSC [Dominici et al., 2006].

E' ancora una questione controversa, invece, la capacità delle MSC di differenziare in epatociti funzionali anche se iniziano ad essere numerose le evidenze positive in tal senso a partire da MSC da midollo osseo [Schwartz et al., 2002], da UCB [Lee OK et al., 2004] e da UC [Campard et al., 2008].

La prima difficoltà è legata all'origine embrionale endodermica degli epatociti rispetto a quella mesodermica delle MSC, quindi da due diversi foglietti embrionali. In secondo luogo, anche se esistono evidenze di differenziamento di MSC in cellule simil-epatocitarie, non c'è un unico protocollo di differenziamento adottato a livello internazionale. Inoltre numerosi studi hanno evidenziato la difficoltà di mantenere in coltura epatociti funzionali utilizzando i convenzionali supporti per le colture cellulari [Tanaka et al., 2006]. A tal proposito è di fondamentale importanza per la coltura di tali cellule la presenza di un supporto adeguato che dia un sostegno meccanico e che

contribuisca a creare un microambiente idoneo al mantenimento delle funzioni cellulari [Tabata Y. et al., 2005].

In questo studio sono stati presi in considerazione e confrontati tra di loro tre differenti supporti per la coltura e il differenziamento in epatociti delle MSC da UC e da UCB:

- la convenzionale plastica per colture cellulari;
- il MatrigelTM, una matrice extracellulare ottenuta da colture di cellule neoplastiche di topo già utilizzata con successo per le colture di epatociti di ratto [Runge D. et al, 1997; Nagaki M et al., 1995];
- la matrice acellulare di fegato già testata precedentemente nel nostro laboratorio [Burra P et al, 2004; Tomat S et al., 2006].

Nella prima parte della ricerca è stata studiata la capacità differenziativa verso la linea epatocitaria delle MSC ottenute da UCB. Abbiamo dimostrato che questa popolazione cellulare esprimeva in maniera costitutiva l'mRNA di marcatori epatocitari adulti, come l'Albumina e il PEPCK-C quando veniva seminata su tutti i supporti presi in considerazione e che il livello di espressione dell'mRNA di questi stessi marcatori veniva up-regolato quando le cellule venivano seminate su plastica non trattata o MatrigelTM e trattate con terreno differenziativo epatogenico. Quando venivano seminate sulla matrice, invece, il livello di espressione dell'Albumina non mostrava cambiamenti mentre l'espressione dell'mRNA del PEPCK-C aumentava progressivamente ai successivi time-point in presenza dei fattori di differenziamento. E' stata inoltre riscontrata una diminuzione della vitalità delle MSC isolate da UCB dopo due giorni di coltura su MatrigelTM rispetto a quelle delle MSC seminate sulla plastica non trattata, vitalità che poi è tornata a livelli comparabili a quelli delle stesse cellule seminate su plastica dopo due settimane di coltura sia in terreno proliferativo che differenziativo. Per quanto riguarda la matrice, invece, le cellule hanno sempre mantenuto un livello di vitalità inferiore a quello delle cellule seminate sulla plastica in ogni condizione sperimentale testata. Questo dato suggerisce che le MSC sembrano necessitare di un tempo maggiore per colonizzare un supporto tridimensionale quale è la matrice e iniziare poi il processo di differenziamento. Infatti l'analisi alla microscopia elettronica a scansione ha mostrato che solo dopo 14 giorni di coltura le MSC riuscivano a coprire completamente la matrice formando un monostrato compatto di cellule.

L'analisi immunocitochimica ha confermato i dati ottenuti dalla biologia molecolare. Infatti le cellule coltivate su MatrigelTM e sulla plastica sono risultate positive per l'Albumina, mentre l'AFP non è mai stata rilevata in entrambi i supporti.

Le MSC da UCB, quindi, rispondono in maniera differente agli stimoli differenziativi epatogenici quando vengono seminate sui diversi supporti utilizzati per la coltura. La plastica sembra essere il miglior substrato per la loro crescita e differenziamento in quanto sugli altri supporti le cellule mostrano una vitalità più bassa sia a 48 ore che a 7 giorni dalla semina, restando addirittura più bassa anche a 14 giorni se viene utilizzata la matrice acellulare di fegato.

Per la difficoltà di ottenimento delle cellule staminali mesenchimali da sangue cordonale la ricerca si è fermata ad un primo studio che prevedeva soltanto 14 giorni di differenziamento, mentre per le staminali da cordone ombelicale è stato possibile effettuare uno studio più approfondito e portare il differenziamento fino a 28 giorni di coltura.

E' stato dimostrato che le MSC isolate da UC esprimevano in maniera costitutiva l'mRNA di marcatori di linea epatocitaria quali AFP ed Albumina e per la prima volta è stata riscontrata l'espressione costitutiva anche dell'mRNA per l'MTP, una proteina di trasporto dei trigliceridi, degli esteri del colesterolo e dei fosfolipidi localizzata nel reticolo endoplasmatico degli epatociti maturi e degli enterociti [Mirandola *et al.*, 2006]. Questa evidenza rinforza la convinzione che le MSC da UC posseggano un forte potenziale differenziativo epatocitario *in vitro*.

Infatti, quando sono state sottoposte agli stimoli differenziativi epatogenici, le MSC da UC hanno cambiato morfologia assumendo un fenotipo simile a quello degli epatociti già dopo 14 giorni di coltura sia su plastica che su MatrigelTM.

La successiva analisi molecolare ha dimostrato che questo cambiamento morfologico era associato alla modulazione dell'espressione di tipici marcatori epatocitari. Infatti entrambi i marcatori di epatociti maturi, Albumina e MTP, erano significativamente up-regolati nelle cellule differenziate su plastica e su MatrigelTM. Inoltre, l'analisi immunocitochimica, utilizzata per verificare la reale traduzione in proteina dell'mRNA riscontrato con Real-Time PCR, ha confermato che solo le cellule stimulate con fattori epatogenici erano positive per l'anticorpo diretto contro l'Albumina come già riportato da Lee *et al* [Lee K. D. *et al.*, 2004].

A questo punto è stata valutata la funzionalità delle cellule differenziate attraverso la colorazione PAS per l'accumulo di glicogeno e il saggio ELISA per la secrezione

dell'Albumina. Utilizzando queste metodiche è stato dimostrato che le cellule seminate e differenziate su plastica e MatrigelTM erano in grado di accumulare glicogeno già dopo 14 giorni di coltura e di secernere una quantità di albumina maggiore ad ogni time-point considerato. Un'ulteriore conferma della capacità delle MSC da UC di raggiungere un fenotipo simil-epatocitario maturo è stata data dalla significativa down-regolazione dell'espressione dell'mRNA per l'AFP, marcatore epatocitario precoce, nelle cellule differenziate rispetto alle cellule in terreno proliferativo.

La plasticità mostrata dalle MSC di differenziare verso la linea epatocitaria era ancora più evidente quando queste venivano coltivate sulla semplice plastica o il MatrigelTM rispetto a quando venivano coltivate sulla matrice acellulare di fegato. Infatti anche se le MSC sono state in grado di aderire alla matrice (come mostrato dall'analisi alla microscopia elettronica a scansione), la loro capacità proliferativa è stata più bassa rispetto a quella delle stesse seminate sugli altri supporti e hanno perso l'espressione dell'mRNA per l'MTP già dopo 7 giorni di coltura. Inoltre il livello di espressione dell'mRNA per l'AFP e l'Albumina non è cambiato anche dopo 28 giorni di coltura in terreno differenziativo. La matrice acellulare di fegato si è quindi dimostrata il peggiore tra i supporti analizzati per il differenziamento delle MSC da UC.

L'ulteriore confronto tra plastica non trattata e MatrigelTM ha messo in evidenza una diversa cinetica dell'espressione dell'mRNA dei marcatori analizzati nelle cellule seminate sui due differenti supporti e differenziate in epatociti. Infatti la down-regolazione dell'espressione dell'AFP è stata statisticamente significativa durante tutti i time-point del differenziamento soltanto nelle cellule seminate sulla plastica non trattata mentre in quelle seminate su MatrigelTM è stata significativa solo dopo 28 giorni di coltura. Questo suggerisce che le cellule seminate su MatrigelTM necessitano di un tempo maggiore per assumere un fenotipo epatocitario maturo.

Un'ulteriore conferma del progressivo differenziamento delle MSC seminate su plastica è stata data dall'analisi al citofluorimetro che mostrava un forte abbassamento delle percentuali di espressione dei marcatori delle staminali mesenchimali come il CD90 e il CD105.

Anche la cinetica di espressione dell'mRNA per l'Albumina è stata diversa nelle cellule seminate sui due supporti: mentre sulla plastica l'aumento è stato rapido fino a 14 giorni per poi rimanere stabile fino al 28esimo giorno dall'induzione del differenziamento, sul MatrigelTM l'up-regolazione è cominciata più tardi ma è continuata fino a 28 giorni di coltura. Tuttavia questa diversità nella cinetica d'induzione dell'mRNA per l'Albumina,

non ha influenzato la quantità di proteina secreta dalle MSC differenziate nel surnatante. Probabilmente il messaggero codificante per l'Albumina indotto dal differenziamento non è stato tradotto in proteina.

Infine l'up-regolazione dell'mRNA per l'MTP, che in entrambi i supporti è stata tempo-dipendente, è sembrata essere più marcata nelle cellule differenziate su plastica come dimostrato dal test di Kruskal Wallis seguito dalla correzione di Bonferroni ($^{\text{¥}}p=0.0021$ vs. $^{\text{¥}}p=0.0122$).

Tutti i risultati ottenuti, quindi, hanno dimostrato che in queste condizioni sperimentali il miglior supporto per la crescita e il differenziamento epatocitario delle MSC isolate da UC è rappresentato dalla semplice plastica di coltura non trattata. Infatti le caratteristiche morfologiche, la perdita del fenotipo mesenchimale, il cambiamento dell'espressione genica, l'analisi immunocitochimica, la secrezione di albumina e la capacità di accumulare glicogeno suggeriscono che queste cellule possono crescere e differenziare in epatociti maturi senza la necessità di alcun supporto tridimensionale per mantenere la loro vitalità e caratteristiche funzionali.

La facilità di ottenimento di un gran numero di MSC dal cordone ombelicale, la loro capacità differenziativa epatogenica e l'assenza di immunogenicità, data la negatività per il complesso maggiore di istocompatibilità ha suggerito la possibile applicazione di queste cellule nella sperimentazione *in vivo* in un modello di danno epatico.

L'ultimo aspetto studiato è stata quindi la potenzialità rigenerativa delle MSC da UC *in vivo*. A questo scopo è stato allestito un modello animale di danno epatico acuto da agente chemiotossico.

In topi Balb-c è stato somministrato tetracloruro di carbonio, che si accumula nel parenchima epatico dove subisce una trasformazione citocromo P450 dipendente producendo un metabolita altamente reattivo. Questo induce per ossidazione lipidica e conseguente rottura delle membrane degli epatociti, determinando una necrosi acuta pericentrale [Nakahira K *et al.*, 2003; Pilichos C *et al.*, 2004].

In seguito a somministrazione di tetracloruro di carbonio è stato valutato il grado di danno presente in sezioni di fegato proveniente da animali trattati solo con l'agente chimico confrontandole con quello presente sulle sezioni di fegato di topi trattati con le MSC e sacrificati a differenti time-point.

Le cellule somministrate infatti avrebbero potuto trovare un microambiente, costituito da citochine e altri segnali molecolari conseguenti al danno acuto, in grado di creare un gradiente di mobilitazione delle cellule staminali somministrate verso il sito del danno

stesso. Tale modalità di mobilitazione è stata già osservata *in vivo* in caso di danno ad altri tessuti, quali miocardio [Toma C et al., 2002] o tessuto muscolare [Ferrari G et al., 1998].

Il quadro istologico emerso dall'analisi dei fegati dei topi dopo 24, 48 e 72 ore dalla somministrazione delle cellule è risultato in gran parte simile a quello osservato negli animali di controllo che avevano subito il danno ma che non avevano ricevuto cellule. Dopo 7 giorni dalla somministrazione delle cellule invece, il parenchima epatico è risultato completamente integro a differenza degli animali controllo dove erano ancora presenti aree di infiammazione e necrosi.

I risultati ottenuti indicano che le MSC da UC contribuiscono alla rigenerazione epatica anche se resta da indagare se differenziano in epatociti maturi o producono citochine e fattori dall'azione antinfiammatoria che quindi riducono il danno, come già dimostrato per altri organi [Henning et al., 2008].

CONCLUSIONI

La dimostrazione *in vitro* della plasticità delle MSC da UC e UCB non solo verso la linea mesodermica ma anche verso la linea endodermica e la loro capacità *in vivo* di contribuire alla rigenerazione epatica, rappresenta un risultato utile sulla futura applicazione di tali cellule nella terapia delle malattie epatiche acute e croniche.

La possibilità di utilizzare la MSC da UC e UCB nel campo della terapia cellulare e della medicina rigenerativa è rafforzata dalla facilità con cui un numero significativo di cellule possono essere ottenute (in particolare dal cordone ombelicale), dalla natura omogenea della popolazione staminale isolata, dall'assenza di immunogenicità (visto la negatività di tali cellule per l'antigene maggiore di istocompatibilità HLA-DR) e, soprattutto, dal fatto che il loro utilizzo non comporta alcun tipo di implicazioni etiche o legali.

Inoltre il rischio di contaminazione è limitato dal fatto che, per la coltura cellulare, non sono necessari alcun coating o matrice extra-cellulare come supporto per la crescita e il differenziamento e, grazie al breve tempo di mantenimento delle cellule in coltura, è ridotto anche il rischio che queste subiscano delle trasformazioni maligne.

Anche se l'applicabilità dei risultati alla pratica clinica deve essere valutata con molta cautela, viste soprattutto le poche informazioni sul comportamento *in vivo* di queste cellule, il potenziale proliferativo, differenziativo e rigenerativo dimostrato dalle MSC da UC e UCB è innegabilmente affascinante e promettente.

BIBLIOGRAFIA

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

Allsopp RC, Vaziri C, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 10114-10118.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; 425: 968–973

Akhurst B, Croager EJ, Farley-Roche CA et al. A modified choline-deficient, methionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology* 2001; 34: 519–22.

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2002; 159: 123-134.

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

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

Blackburn EH, Greider CW, Henderson E, Lee MS, Shampay J, Shippen-Lentz D, Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome*. 1989; 31: 553-560.

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994; 56: 283–294.

Burra P, Tomat S, Conconi M T, Macchi C, Russo F P, Parnigotto P P, Naccarato R, Nussdorfer G G. Acellular liver matrix improves the survival and functions of isolated rat hepatocytes cultured in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 2004; 14: 511-515.

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

Campard D, Lysy P A, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology.* 2008; 134(3): 833-848.

Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Klein C, MannsMP, OttM. Reevaluation of bonemarrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant.* 2004; 13: 659–666.

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

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

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

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2739-49.

Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendhal U, Frisén J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000; 288: 1660-1663.

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

Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1994; 91:2900-2904.

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

Cross SH, Allshire RC, McKay SJ, McGill NI, Cooke HJ. Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature*. 1989; 338: 771-774.

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

De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A, Gasparotto L, Piccoli M, Taiani J, Pozzobon M, Boldrin L, Okabe M, Cozzi E, Atala A, Gamba P, Sartore S. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J Urol*. 2007; 177(1): 369-76.

de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1994; 91: 2882-2885.

Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch*. 2000; 437: 1-16

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

Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res.* 2005; 308(2): 283-90.

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

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

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

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

Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1737–40.

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

Farber E. Similarities of the sequence of the early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 1956; 16 142–148.

Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477–87.

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

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

Fortier L. Classifications, Controversies, and Clinical Applications Surgery. *Stem Cells*. 2005; 34: 415–423.

Frenck Jr. RW, Blackburn EH, Shannon KM, The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 5607-5610.

Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2000;3(10):986-91

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

Gelse K, von der MK, Aigner T, Park J, Schneider H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 430–441.

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

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

Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 607-19.

Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190(1): 239-45.

Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* 1987;51: 887-898.

Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringdén O, Sylvén C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127(5): 1293-300.

Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ. Res.* 2003; 93: 1023-1025.

Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells.* 2007; 25(3): 646-54.

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

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

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature.* 1990; 346: 866-868.

Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells.* 2002; 20(4): 329-37.

Henning RJ, Shariff M, Eadula U, Alvarado F, Vasko M, Sanberg PR, Sanberg CD, Delosita V. Human cord blood mononuclear cells decrease cytokines and inflammatory cells in acute myocardial infarction. *Stem Cells and Development.* 2008; 17: 1207-1220.

Herzog EL, Chai L, Krause DS Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003 102: 3483–3493.

Hong Y, Winkler C, Scharl M. 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.* 1998; 208(10): 595-602.

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

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999; 5: 309–313.

Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001; 97: 1227–1231.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, Mcnall RY et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99: 8932–8937.

Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med*. 2003; 141(5): 342-9.

In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 2003; 88(8): 845-52.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004; 22(7): 1338-45.

Ippokratis P, Peter V. Biology of mesenchymal stem cells. *Int J Care Injured* 2005; 36S: S8-S12.

Jackson KA, Tiejuan M, Goodell M. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS*. 1999; 96(25): 14482-14486.

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

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

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

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

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

Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100 (Suppl 1):11850–11853

Kim S, Honmou O, Kato K, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res.* 2006; Dec 6;1123(1):27-33.

Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30: 215–222.

Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 307–316.

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

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105: 369-377.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001; 153(5): 1133-40.

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

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40(6): 1275-1284.

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* . 2004; 103(5):1669-1675.

Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by d-galactosamine. *Am. J. Pathol*. 1991; 139: 535–52.

Liang L, Bickenbach JR Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells*. 2002; 20: 21-31.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000; 6(11): 1282-6.

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. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc*. 2005; 37(1): 292-4.

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

Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William DA, Hall DM, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen RI, Rappaport EF, Saitta B. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem Cells Dev*. 2007; 16(1): 53-73

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

Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *PNAS*. 2003; 100(3): 1364-1369.

Mirandola S, Realdon S, Iqbal J, Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, Marcolongo M, Vario A, Datz C, Hussain MM, Alberti A. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology*. 2006; 130(6): 1661-1669.

Müller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Dow JS, Long TI, Laird PW, Kloner RA. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation*. 2002; 105(14): 1720-6.

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

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

Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*.1989; 60: 334–339.

Olmest-Davis EA, Gugala Z, Camargo F, Gannon FH, Jackson K, Kienstra KA, Shine HD, Lindsey R., Hirschi KK, Goodell MA, Brenner MK, Davis AR. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *PNAS*. 2003.; 100(26): 15877-15882.

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

Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol*. 1997; 151: 1273–80.

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

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

Park J, Ries J, Gelse K, Kloss F, von der MK, Wiltfang J et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Therapy* . 2003; 10: 1089–1098.

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

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

Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004; 103(5): 1662-8.

Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology*. 1998; 27: 1030-8.

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

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

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

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

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001; 344: 385-386.

Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*. 2006; 43:108-116

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

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

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

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov V. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21(1): 105-110.

Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol*. 2003; 163:1301–1311

Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, et al. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med*. 1999; 190: 157-167.

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

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005; 26:2:8.

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

Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells*. 2006; 24: 1852–8.

Schmelzer E, Zhang L, Bruce A *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 1973–87.

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

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LQ, Cerqueira A, Carvalho DF, Jazedje T, Okamoto OK, Muori AR, Zarz M. Multipotent stem cells from Umbilical Cord: Cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008; 26: 146-150.

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

Serakinci N, Graakjaer J, Kolvraa S. Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells. *Biochimie*. 2008; 90: 33-40

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal D, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95: 13726-13731.

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

Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M *et al.* Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 291: G575–83.

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

Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73: 177-208.

Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. Stem cells find their niche. *Nature.* 2001; 414: 98-104.

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

Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.* 2001; 52: 443–451.

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

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

Tabata Y. Significance of release technology in tissue engineering. *Drug. Discov.* 2005; 10(23-24): 1639-46.

Tanaka K, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Jun HS, Kobayashi N. Functional hepatocyte culture and its application to cell therapies. *Cell Transplant.* 2006; 15(10): 855-64.

Tateno C, Yoshizane Y, Saito N *et al.* Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am.J. Pathol.* 2004; 165: 901–12.

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

Thomas ED, Loechte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957; 257(11): 491-6.

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

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

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

Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J*. 1996; 10; 1249-56.

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

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

Tomat S, Burra P, Gringeri E, Cillo U, Calabrese F, Giacometti C, Carraro P, Macchi C, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. Metabolic activity of rat hepatocytes cultured on homologous acellular matrix and transplanted into Gunn rats. *Int J Mol Med*. 2006; 18(5):837-42.

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

Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol.* 2003; 23(1): 37-49.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003; 422: 901–904

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science.* 2002; 297: 2256–2259.

Wang HS, Hung SC, Peng S.T, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004; 22(7):1330-1337.

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

Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells.* 2006; 24(3): 781-792.

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

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

Wilson JW, Leduc EH. Roles of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J. Pathol. Bacteriol.* 1958; 76: 441-449.

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

Xin-Qin Kang, Wei-Jin Zang, Li-Jun Bao, Dong-Ling Li, Tu-Sheng Song, Xiao-Li Xu, Xiao-Jiang Yu: Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes *World J Gastroenterol* 2005; 11(47): 7461-7465.

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

Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 2008; 47: 636-47.

Yu M, Xiao Z, Shen L, Li L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. *Br J Haematol.* 2004; 124(5): 666-75.