

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**  
**Scuola di Dottorato in**  
**“Biotecnologie applicate alle Scienze Mediche”**  
**XXIV Ciclo**



***“Transdifferenziamento di Cellule Staminali Mesenchimali di  
roditore in cellule del sistema nervoso centrale”***

**Relatore: Prof. Diego Maria Michele Fornasari**

**Tutor: Dott. Fabio Bianco PhD**

**Caterina Bossio**

**Matr. N. R08148**

**Anno accademico 2010/2011**

## **INDICE**

- 1. INTRODUZIONE**
  - 1.1 Le Cellule staminali
    - 1.1.1 Le cellule staminali embrionali (ESC) e i problemi di natura etica
    - 1.1.2 Le Cellule staminali adulte (ASC)
    - 1.1.3 Sorgenti di cellule staminali adulte
    - 1.1.4 Le Cellule staminali mesenchimali (MSC)
    - 1.1.5 Potenziale differenziativo delle MSC
    - 1.1.6 MSC e Invecchiamento
    - 1.1.7 Le MSC come mediatori trofici
  2. Cellule del sistema nervoso centrale
    - 2.1 Le cellule gliali
      - 2.1.1 Ruolo degli astrociti
    - 2.2 Le cellule neuronali (I Neuroni)
      - 2.2.1 Stadi di sviluppo di Neuroni in coltura
      - 2.2.2 La sinapsi
      - 2.2.3 I trasportatori vescicolari
      - 2.2.4 trasportatori vescicolari del glutammato
      - 2.2.5 Trasportatore vescicolare del GABA
  3. Terapia genica
    - 3.1 Sistemi cellulari come veicoli per Terapia Genica
    - 3.2 Terapia cellulare
      - 3.2.1 Promesse e problemi della terapia cellulare
      - 3.2.2 Stato dell'arte della terapia cellulare in modelli patologici
    - 3.3 La medicina rigenerativa
    - 3.4 L' Ingegneria Tissutale
      - 3.4.1 Speranze e Problemi dell'ingegneria tissutale
      - 3.4.2 Biomateriali
      - 3.4.3 Scaffolds
      - 3.4.4 Titanio come biomateriale: applicazioni in ambito biomedicale
      - 3.4.5 Idrogeli e matrici iniettabili per la crescita cellulare
      - 3.4.6 Prospettive future
- 4. SCOPO DELL'ELABORATO**
- 5. MATERIALI E METODI**
  - 5.1 Estrazione delle MSC dal tessuto adiposo di ratto (rASC)
    - 5.1.1 Mantenimento in coltura delle MSC

- 5.2 Estrazione degli astrociti corticali e loro mantenimento in coltura
  - 5.2.1 Colture di microglia primaria
- 5.3 Colture di neuroni corticali e ippocampali
- 5.4 Le co-colture cellulari
- 5.5 Differenziamento Cellulare
- 5.6 Dosaggio Proteico
- 5.7 Quantificazione dell'attività enzimatica della Fosfatasi Alcalina
- 5.8 Valutazione della deposizione di matrice extracellulare calcificata
- 5.9 Immunofluorescenza
- 5.10 Analisi della morte cellulare
- 5.11 Attività metabolica cellulare: saggio con l'Alamar Blue™
- 5.12 Estrazione di RNA totale
  - 5.12.1 Trattamento con DNase
  - 5.12.2 PCR
  - 5.12.3 Disegno primers
- 5.13 Misure di elettrofisiologia mediante la tecnica del patch-clamp
- 5.14 Registrazioni di imaging per il calcio su singola cellula
- 5.15 Analisi di quantizzazione mediante software di elaborazione grafica
- 5.16 Preparazione dei campioni di Titanio
  - 5.16.1 Realizzazione delle superfici BioRough™
  - 5.16.2 Morfologia cellulare: analisi con microscopia elettronica a scansione
- 5.17 Pre-trattamento dei vetrini copri- oggetto
- 5.18 Analisi statistiche
- 5.19 Anticorpi
- 6. RISULTATI**
  - 6.1 Caratterizzazione delle MSC
    - 6.1.1 Differenziamento Osteoblastico
    - 6.1.2 Morfologia
    - 6.1.3 Attività dell' enzima Fosfatasi Alcalina e produzione di matrice calcificata
  - 6.2 Interazioni MSC-Biomateriali
  - 6.3 Identificazione di un protocollo per lo sviluppo di un mezzo di coltura per le proliferazione delle MSC in condizioni GMP
    - 6.3.1 Caratterizzazione delle MSC mantenute in mezzo T3
  - 6.4 Transdifferenziamento delle MSC
    - 6.4.1 Trans-differenziamento delle MSC mediante formazione di sfere
    - 6.4.2 Trans-differenziamento delle MSC mediante co-cultura con colture primarie di astrociti corticali

- 6.4.3 Caratterizzazione di un mezzo proprietario per il differenziamento delle MSC in cellule del sistema nervoso centrale
- 6.4.3.1 Analisi funzionale delle MSC differenziate
- 6.5 Sviluppo *in vitro* di sistemi *cell carrier* per iniezione *in vivo*
- 6.6 Messa a punto di un protocollo affidabile per marcare le MSC utilizzando un vettore lentivirale che esprima Luciferasi
- 7.     **DISCUSSIONE****
- 8.     **BIBLIOGRAFIA****

# ***INTRODUZIONE***

## 1.1 Le Cellule staminali

Le cellule staminali sono una popolazione di cellule primitive indifferenziate in grado di dividersi (autoreplicarsi) per periodi di tempo molto lunghi, spesso per l'intera vita dell'organismo, costituendo, così, una riserva inesauribile di cellule clonali non specializzate. (Alison MR et al. 2009) E' stato osservato che in particolari condizioni ambientali, o in presenza di segnali specifici, una cellula staminale può dare origine a differenti tipi di cellule, assumendo morfologia e funzionalità specializzate. Infatti, la mancanza di qualsiasi tessuto-specificità conferisce loro la potenzialità di differenziarsi in cellule di diversi tessuti. (Verfaillie Catherine M. et al., 2002).

Normalmente, le cellule seguono un ciclo cellulare che è composto da quattro fasi: nella prima fase, chiamata G1 (fase gap 1) la cellula aumenta le sue dimensioni in rapporto all'ambiente esterno, sintetizzando RNA e proteine; successivamente nella Fase S (fase di sintesi) avviene la replicazione del materiale genetico; in seguito, nella fase G2 (fase gap 2), viene verificata la corretta replicazione di tutti i cromosomi e vi è un ulteriore aumento delle dimensioni cellulari; infine nella fase M (Mitosi), composta da profase, metafase, anafase e telofase, si verifica la duplicazione cellulare. A differenza delle cellule non staminali, che si dividono in maniera *simmetrica*, le cellule staminali si dividono in maniera *asimmetrica*, infatti ogni cellula madre si divide generando due cellule figlie, una che mantiene il suo stato di cellula staminale e una che invece va incontro a differenziamento tessuto-specifico; in questo modo una parte va incontro a differenziamento mentre le cellule che rimangono indifferenziate mantengono il loro numero costante all'interno del tessuto (fig. 1; Serakinci and Keith. 2006).

Generalmente, le cellule staminali vanno incontro a divisione in seguito a uno stimolo induttivo, come, ad esempio, un aumento della richiesta del numero di cellule nel tessuto in seguito per esempio ad una lesione. Un esempio è rappresentato dalle cellule dell'epidermide: il tessuto progenitore (caratterizzato dalla presenza di cellule staminali adulte) provvede a fornire una popolazione di cellule che differenzia in cellule mature con funzioni specifiche, in caso di necessità, e quando la richiesta viene soddisfatta, queste cessano di proliferare.



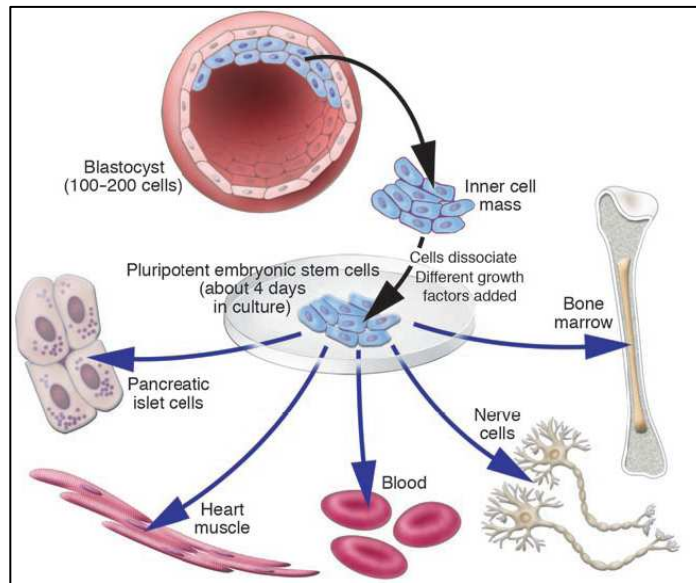
- *Adulte (ASC):* cellule indifferenziate presenti in tessuti specifici. Sono cellule tendenzialmente multipotenti, ma con capacità non illimitate, provvedono al mantenimento dei tessuti e alla loro riparazione dopo un danno. Fino ad oggi, quelle estratte dal midollo osseo, sono state utilizzate per i trapianti del midollo stesso, ma recenti studi hanno dimostrato che sono anche in grado di differenziarsi in alcuni tipi di tessuti differenti. (Henningson et al., 2003). Questo fenomeno viene definito *transdifferenziamento*.  
Inoltre, esistono cellule staminali non classificabili in questi due gruppi perché possiedono caratteristiche comuni ad entrambi. Queste cellule sono definite come:
  - *Fetali:* cellule recuperate dal feto: possono essere ricavate da aborti naturali. Hanno caratteristiche intermedie tra le cellule staminali embrionali e quelle adulte. Tendenzialmente sono pluripotenti e deputate all'accrescimento peri-natale dei tessuti. A tutt'oggi non si conoscono i meccanismi alla base della loro capacità di generare tessuti diversi.
  - *Amniotiche:* derivano dal liquido amniotico, possiedono caratteristiche sia delle cellule staminali embrionali che delle cellule staminali adulte. Hanno caratteristiche biologiche molto simili alle cellule staminali embrionali, ma non sono soggette a questioni di tipo etico che normalmente coinvolgono quest'ultime. Secondo uno studio (De Coppi et al., 2007) le cellule ritrovate nel liquido amniotico esprimono marcatori specifici per le staminali embrionali e adulte, e sono in grado di differenziare verso la linea osteogenica, miogenica, endoteliale, epatogenica, adipogenica e neurogenica.
  - *Prelevate da sangue placentare e del cordone embrionale:* sono cellule pluripotenti, vengono prelevate dalla placenta e dal cordone ombelicale dopo il parto. Si conservano congelate in banche apposite anche per decenni a disposizione dei pazienti onco-ematologici che necessitano del trapianto del midollo osseo.

### **1.1.1 Le cellule staminali embrionali (ESC) e i problemi di natura etica**

La scoperta dell'esistenza delle cellule staminali embrionali è stata uno degli eventi più importanti dell'ultimo decennio in biologia. La comunità medica considera davvero interessante il potenziale utilizzo delle cellule staminali embrionali nella medicina rigenerativa poiché è noto che le cellule staminali embrionali umane hanno un enorme potenziale per il trattamento di diverse patologie, questo perché tali cellule, in determinate condizioni, *in vitro* o *in vivo*, sono in grado di differenziarsi in molti, se non tutti, i tipi di cellule dell'organismo (Keller, 2005).



Una sorgente di cellule staminali embrionali è il nodo embrionale del blastocista. Le cellule dissociate dal nodo sono cellule staminali pluripotenti (fig.3).



**Figura 2.** Le cellule staminali pluripotenti, isolate dal nodo embrionale, hanno l'abilità di differenziare in tutti i tipi cellulare presenti nel corpo umano, tranne in cellule della placenta e di altri tessuti extraembrionali. (Gerald D. Fischbach et al., 2004)

Esse si distinguono dalle altre cellule staminali per alcune proprietà quali:

- immortalità (alti e consistenti livelli di telomerasi)
- alta proliferazione (divisione simmetrica)
- pluripotenza, plasticità e versatilità
- mantenimento del cariotipo dopo l'espansione *in vitro*
- assenza di marcatori specifici di differenziamento (Rao M. S., 2006)

Il percorso verso l'applicazione in terapia delle cellule staminali embrionali però non è così lineare a causa di una serie di problemi, tra cui alcuni di carattere etico-sanitario che impediscono il progresso della comunità scientifica verso l'utilizzo di queste cellule. In particolare:

1. Tumorigenicità: alcune terapie basate sull'utilizzo di cellule staminali embrionali sono caratterizzate da rischio di formazione di tumori da parte di cellule indifferenziate trapiantate.
2. Contaminazione del prodotto animale: tutti gli agenti terapeutici e le cellule usate per le terapie umane **devono** essere prive di patogeni che possono suscitare una reazione immunitaria dopo trapianto nell'ospite. Ogni linea cellulare ES (*embryonic stem cell*) deve essere, quindi, in regola con la registrazione del National Institutes of Health (NIH) che certifica l'assenza di contaminazioni di questo tipo.

3. Compatibilità genetica: spesso i trapianti di cellule ES sono soggetti ad un rigetto immunitario. La generazione di linee cellulari di ES geneticamente identiche al paziente, attraverso il clonaggio terapeutico è quindi di vitale importanza.
4. Tipo di cellule per il trapianto: l'utilizzo di una sola dose di cellule ES differenziate, per sostituire nell'organismo cellule morte o che stanno morendo, potrebbe essere sufficiente per trattare patologie, per le quali l'ambiente dell'ospite è favorevole, questo diminuirebbe anche la probabilità di formazione di tumori che risulterebbe maggiore trapiantando più dosi di cellule proliferanti. Però, se il paziente soffre di una patologia degenerativa caratterizzata dalla distruzione delle proprie cellule, anche le cellule ES differenziate e trapiantate potrebbero subire lo stesso destino. Risulta chiaro, pertanto, che se si otterranno risultati incoraggianti dalle ricerche effettuate con l'utilizzo delle cellule staminali adulte, la maggior parte dei problemi etici discussi fino ad ora verrebbero evitati. Questo permetterebbe di conseguenza anche una più rapida applicazione nelle terapie cellulari umane.

### **1.1.2 Le Cellule staminali adulte (ASC)**

Le cellule staminali adulte sono distribuite nei vari tessuti che compongono l'intero organismo ed ognuna presenta comportamenti differenti a seconda del microambiente in cui si trova. La loro funzione principale è quella del mantenimento dell'omeostasi cellulare e la sostituzione di cellule morte a causa di lesioni o patologie. In molti tessuti è presente un numero piuttosto ridotto di cellule staminali, le quali sono localizzate in un microambiente specializzato e vascolarizzato detto nicchia . La maggior parte delle informazioni riguardanti le cellule staminali adulte provengono da studi effettuati su modelli murini che sono in continua evoluzione infatti la lista di tessuti riconosciuti come dotati di cellule staminali è in continua crescita. Tra questi possiamo ricordare il midollo osseo, il sangue periferico, il tessuto cerebrale, il midollo spinale, i vasi sanguigni, la polpa dentaria, il muscolo scheletrico, l'epidermide, gli epiteli dell'apparato digerente, la cornea, la retina, il fegato, il pancreas. il liquido amniotico (De Coppi et al. 2007).

Attualmente l'attenzione di un numero crescente di ricercatori è focalizzata sull'utilizzo delle cellule staminali adulte che fino a poco tempo fa si pensava fossero multipotenti, monopotenti o *"tissue restricted"*, ma a cui oggi sono state attribuite anche proprietà pluripotenti (vedi par 1). Gli sforzi della comunità scientifica vertono a sfruttare nel migliore dei modi quest'ultima potenzialità al fine di testare trattamenti terapeutici innovativi ed efficaci adatti alla cura di diverse patologie anche invalidanti.

### **1.1.3 Sorgenti di cellule staminali adulte**

La ricerca sulle cellule staminali si trova oggi ad affrontare il problema di identificare la fonte ideale per un possibile utilizzo come terapia rigenerativa. A causa delle restrizioni etiche per quanto riguarda l'utilizzo delle cellule staminali embrionali (4, 5), sono stati effettuati numerosi tentativi utilizzando tessuti adulti come fonte di cellule pluripotenti per terapie di sostituzione tissutale. Le fonti autologhe, come il midollo osseo, le cellule prelevate dal midollo o le cellule pluripotenti residenti nei tessuti periferici sono con ogni probabilità una fonte potenzialmente utilizzabile per la riparazione tissutale in seguito a danni tissutali estesi. Questo approccio ha l'evidente vantaggio di essere al riparo dalle possibili complicazioni derivanti dall'incompatibilità immunitaria: tali cellule possono infatti essere prelevate dal midollo osseo, dal rene, dal cuore, dal tessuto adiposo o da un altro tessuto del paziente, coltivate ed amplificate, portate ad una densità cellulare compatibile con l'estensione del danno tissutale e caratterizzate in vitro prima dell'uso, per quanto riguarda il loro potenziale differenziativo. Tuttavia lo sviluppo di popolazioni cellulari "personalizzate" che possono essere utilizzate solo dal donatore o da soggetti con esso istocompatibili rende problematica e molto costosa questa terapia. Inoltre l'uso di cellule che appartengono ad una linea differenziativa diversa potrebbe non rappresentare la soluzione ideale per quanto concerne l'integrazione anatomica e funzionale all'interno del tessuto ricevente.

Differenze funzionali tra le cellule residenti nel tessuto danneggiato e le cellule trapiantate potrebbero rendere più difficile l'integrazione funzionale di queste ultime, dando origine ad una zona di tessuto dotata di proprietà autonome rispetto al resto dell'organo.

Esistono diverse fonti di cellule staminali adulte:

- **Midollo osseo:** Il midollo osseo è caratterizzato dalla presenza di tre diverse popolazioni di cellule staminali: cellule staminali ematopoietiche (HSC), cellule staminali mesenchimali (MSC) e progenitori endoteliali (EPC). Le HSC sono rare, hanno una frequenza di una cellula ogni 10,000. Sono cellule tondeggianti che crescono in sospensione, e grazie alla loro elevata capacità differenziativa possono dare origine a cellule del sistema ematopoietico e ad altri tipi cellulari quali cellule muscolari lisce e scheletriche, quando sottoposte a stimoli adeguati.

Le MSC sono cellule staminali multipotenti derivate dalla frazione stromale, non ematopoietica, del midollo osseo. Inizialmente esse furono identificate come cellule con la sola funzione di sostegno per le cellule ematopoietiche e vennero utilizzate

come base sulla quale coltivare in vitro le HSC. Solo successivamente furono isolate e caratterizzate, e questo ha permesso di osservare che le MSC sono in grado di differenziare lungo la via osteoblastica. *In vitro*, si è visto che le MSC oltre che avere un'elevata capacità proliferativa sono clonogeniche, cioè sono in grado di formare, partendo da una singola cellula, colonie di varie grandezze e densità con morfologia fibroblastoide. Le MSC hanno la capacità di differenziare in osteoblasti, condrociti e adipociti (Prockop et al., 1997).

Le EPC costituiscono un'unica popolazione di cellule mononucleate del sangue periferico. La maggior parte di queste cellule, se sottoposte ad adeguati stimoli sono in grado di differenziare ed entrano nel sistema circolatorio contribuendo al processo di angiogenesi e al riparo del tessuto danneggiato. Recenti studi hanno dimostrato che il numero e la funzione delle EPC sono collegate direttamente con un miglioramento nella rigenerazione endoteliale (Foresta C. et al., 2010).

Le HSC sono cellule in grado di autoriprodursi e di dare vita ad altre linee cellulari dalle quali, in seguito ad un processo maturativo e differenziativo, derivano tutte le cellule del sangue: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, sono localizzate principalmente nel midollo osseo, ma è possibile reperirle anche nel sangue circolante, in seguito a regimi di mobilitazione. Esse sono presenti anche nel sangue del cordone ombelicale del neonato al momento del parto.

Le HSC e le EPC sembrano derivare apparentemente da un unico precursore chiamato emangioblasto.

- **Muscolo scheletrico:** presenta cellule staminali muscolari. Queste cellule dette cellule satelliti sono normalmente quiescenti e sono localizzate al di sotto della membrana basale delle miofibre. Esse sono la principale risorsa di cellule miogeniche per la rigenerazione del muscolo scheletrico post-natale. Muschler è stato il fautore del termine "progenitori del tessuto connettivo" (CTP) per comprendere un gruppo eterogeneo di cellule multipotenti responsabili della riparazione del muscolo scheletrico; solo in un secondo momento si è osservato che l'abilità del muscolo scheletrico di rigenerarsi dopo una lesione è dovuta alle cellule satellite.

Le cellule unipotenti satelliti sono cellule quiescenti e costituiscono una piccola popolazione (5%) di tutte le cellule presenti nelle fibre muscolari (Mauro A. 1961).

- **Tratto digestivo:** presenta cellule staminali intestinali. Nell'esofago la proliferazione cellulare è confinata alla base dello strato epibasale. Nello stomaco, l'epitelio è ripiegato a formare la ghiandola gastrica e si pensa che le cellule staminali siano localizzate subito al di sopra delle fossette. Nell'intestino le cellule staminali sono localizzate in nicchie alla base delle cripte (Alison MR and S Islam, 2009).

- **Pancreas e fegato:** presentano cellule staminali epatiche. Sia il pancreas che il fegato originano dall'endoderma; alcuni ricercatori sostengono che sia una singola cellula progenitrice responsabile della loro generazione altri invece sostengono che vi siano popolazioni multiple di cellule staminali in grado di produrre la molteplicità di cellule che compongono il fegato ed il pancreas. (Lumelsky et al., 2001). La questione pertanto resta ancora aperta.
- **Pelle:** presenta cellule staminali epidermiche che sono deputate al rinnovo dello strato più esterno dell'epidermide. Le cellule epiteliali costituiscono circa il 60% delle cellule differenziate dell'organismo e rivestono le superfici corporee interne ed esterne, pertanto devono essere costantemente rinnovate e sostituite. Per esempio, la popolazione cellulare che rinnova l'epitelio dell'intestino crasso risiede all'interno delle cripte intestinali e possiede caratteristiche staminali; invece le popolazioni di cellule staminali deputate al rinnovamento dell'epidermide sarebbero almeno tre, ognuna corrispondente ai tre principali tipi di cellule epiteliali: epidermiche, follicolari e ghiandolari. (Ghazizadeh et al., 2001).
- **Ghiandole mammarie:** le cellule staminali possono risiedere nello strato di cellule apicali come piccole cellule non differenziate. Queste cellule sono in grado di aumentare sia le cellule apicali che le cellule mioepiteliali (Alison MR et al., 2009)
- **Rene:** il rene ha un basso rinnovamento cellulare (turnover) in condizioni normali, ma può rigenerare un epitelio tubulare dopo una lesione. La papilla renale è stata proposta come nicchia per le cellule staminali (Alison MR et al., 2009) .
- **Polmone:** è stato visto che non c'è solo una singola cellula staminale multipotente per l'intero organo ma ci sono differenti popolazioni di cellule staminali localizzate in diverse regioni del polmone (parte prossimale e parte distale) (Alison MR et al., 2009).
- **Sistema nervoso centrale:** vi sono presenti cellule staminali neurali. Durante lo sviluppo le cellule neuroepiteliali generano neuroni e glia (astrociti e oligodendrociti), mentre nel cervello adulto un piccolo numero di cellule staminali neuronali sono presenti in alcune regioni. La zona subventricolare del ventricolo laterale e del giro dentato dell'ippocampo sono le principali sedi della neurogenesi adulta (Alison MR et al., 2009).
- **Massa tumorale:** è composta da un gran numero di cellule capaci di proliferare solo in maniera limitata e da una rara popolazione di cellule in grado di proliferare a lungo e mantenere il tumore. Queste cellule sono state identificate come le cellule staminali del cancro (CSC). Pertanto il tumore può essere visto come un "organo anomalo", nel quale una piccola popolazione di cellule staminali, che in condizioni fisiologiche risultano essere quiescenti, perdono i normali meccanismi di regolazione che garantiscono un corretto *self-renewal* cellulare. Esse danno origine a cellule staminali

tumorali che contribuiscono alla crescita e alla progressione del tumore favorendo il processo di crescita, sviluppo e progressione del tumore (Bonnet D. et al., 1997).

#### **1.1.4 Le Cellule staminali mesenchimali (MSC)**

Tra le numerose tipologie di cellule staminali adulte, le cellule staminali mesenchimali (MSC, Mesenchymal Stem Cells) sono sicuramente tra le più studiate. Le MSC residenti nel compartimento stromale del midollo osseo furono identificate per la prima volta da Friedenstein (Friedenstein et al 1966) che riuscì a isolare dal midollo osseo di ratto cellule progenitrici in grado di differenziare verso la linea osteogenica; solo nel 1991 queste cellule furono definite "Cellule Staminali Mesenchimali" (Caplan 1991).

Il midollo osseo, in cui le MSC giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento del sistema di supporto stromale per le cellule ematopoietiche, rappresenta attualmente la fonte maggiormente utilizzata di MSC, tuttavia queste cellule sono state isolate da altri tessuti come il periostio (Nakahara et al 1990; Fukumoto et al 2003), le ossa trabecolari (N'th et al 2002; Sottile et al 2002; Tuli et al 2003), il tessuto adiposo (Gronthos et al 2001; Zuk et al 2002; Rodriguez et al 2005), il cervello (Cameron et al 1998; Gage 2000), la polpa dentale (Shi et al 2005), i muscoli scheletrici (Jankowski et al 2002) e la cute (Toma et al 2001). Il prelievo da midollo osseo presenta alcune problematiche che ne limitano l'impiego clinico su larga scala quali l'invasività, la ridotta quantità di tessuto prelevabile e la resa cellulare non molto elevata. Per questi motivi la possibilità di isolare MSC da siti alternativi appare particolarmente promettente per il superamento delle limitazioni connesse all'uso delle BMSC (Bone Marrow Stromal Cells).

Una fonte alternativa particolarmente valida per l'isolamento delle MSC è costituita dal tessuto adiposo sottocutaneo che può essere prelevato mediante lipoaspirazione (Zuk et al 2002; Gimble et al 2003); questo tessuto è facilmente accessibile e disponibile in grandi quantità. La separazione delle MSC dalle altre popolazioni cellulari residenti nel tessuto adiposo è una delle problematiche principali da affrontare e proprio per questo motivo sono stati condotti numerosi studi volti a identificare marcatori di superficie specifici delle cellule staminali mesenchimali; queste molecole di adesione, che giocano un ruolo fondamentale nell'interazione con la matrice extracellulare, probabilmente consentono il reclutamento delle cellule staminali al sito della lesione in modo che le MSC possano svolgere la loro funzione riparativa (Barry 2003). La capacità di migrare verso i tessuti danneggiati o i siti di infiammazione è una caratteristica fondamentale delle MSC che apre prospettive promettenti per i loro futuri impieghi in ambito clinico (Devine et al 2001); questa straordinaria abilità è stata

dimostrata in casi di frattura ossea (Devine et al 2002), ischemia cerebrale e infarto del miocardio (Saito et al 2002; Forrester et al 2003; Erbs S et al 2007). Studi effettuati per chiarire i meccanismi che regolano il processo di *homing* di MSC impiantate in presenza di un danno ischemico cerebrale hanno dimostrato che la chemochina MCP-1 funge da chemoattrattore reclutando le cellule al sito della lesione (Wang et al 2002); è stato inoltre dimostrato che in animali esposti a radiazioni si osservano la migrazione e l'espansione delle MSC sia a livello del midollo osseo che a livello della milza, eventi che non si osservano in animali non irradiati e che supportano la tesi che queste cellule siano reclutate specificamente al sito della lesione (Rombouts et al 2003). Le MSC isolate da midollo osseo e da tessuto adiposo possiedono un profilo di espressione praticamente identico per quanto riguarda geni tipici delle cellule staminali; entrambe le popolazioni cellulari condividono con le cellule staminali embrionali l'espressione di alcuni geni tra cui Pou5f1 (Oct4), UTF-1 e Nodal. L'espressione di UTF-1 e Nodal in cellule staminali adulte è stata dimostrata solo recentemente supportando l'idea di una stretta relazione tra le cellule staminali mesenchimali e quelle embrionali (Peroni et al 2008; Greco et al 2007). E' stato dimostrato che MSC isolate da midollo osseo e da tessuto adiposo mostrano un'espressione paragonabile di numerosi marcatori di superficie (Gronthos et al 2001; Lee et al 2004); le hASC ( *human Adipose-derived Stem Cells* ) esprimono CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD49d, CD54, CD90, CD105 e CD117 e a bassi livelli CD49c, CD49f e CD51 e sono caratterizzate dall'assenza di CD14, CD45 e CD133. Le MSC esprimono inoltre antigeni di superficie come Stro-1 e il complesso maggiore di istocompatibilità MHC di classe I (HLA-ABC), ma non quello di classe II (HLA-DR) che è assente anche in MSC differenziate (Le Blanc et al 2003). L'assenza di HLA-DR e la ridotta espressione di molecole co-stimolatorie spiegano la scarsa immunogenicità delle MSC e la ridotta incidenza di rigetto nei trapianti autologhi e eterologhi (Barry et al 2003; Majumdar et al 2003); inoltre le MSC possiedono la capacità di sopravvivere e differenziare in modelli di trapianto xenogenico (Wang Y et al.2007) e di down-regolare la proliferazione dei linfociti T (Di Nicola et al 2002) caratteristiche molto importanti in vista di un loro possibile impiego in trapianti allogenici. Uno studio recentissimo ha dimostrato che MSC, isolate da midollo osseo e selezionate in base all'espressione del marcatore Stro-1, co-trapiantate con cellule staminali ematopoietiche riducono l'incidenza della GvHD (Graft versus Host disease); potrebbe essere particolarmente utile, quindi, impiegare questa popolazione cellulare per sopprimere la reazione immunitaria del paziente in seguito a un trapianto allogenico (Nasef et al 2009). Un'importante caratteristica delle MSC, è la loro capacità di differenziare, se poste in opportune condizioni di crescita, nei tipi cellulari presenti nei tessuti di origine mesodermica quali

osso, cartilagine, tessuto adiposo, muscoli, cute e tendini attraverso il cosiddetto processo mesengenic (Caplan 1994; Prockop et al 1997).

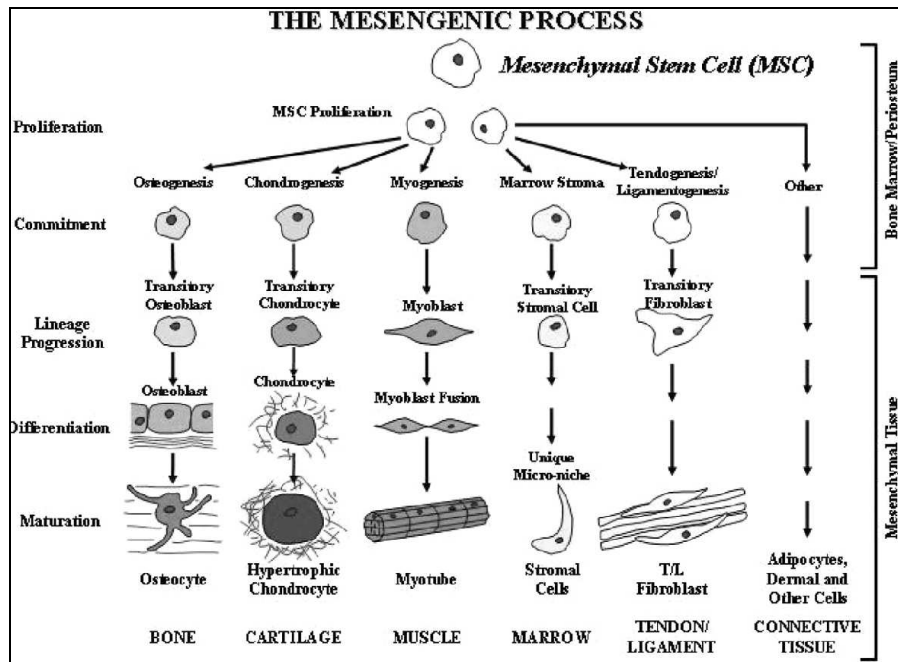


Figura 3: Processo mesengenic (Rios et al 2007)

Inizialmente si pensava che le MSC fossero in grado di differenziare esclusivamente verso linee cellulari della stessa derivazione embrionale del proprio tessuto di origine, ma negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato che queste cellule possiedono un elevato tasso di plasticità (Caplan 1991; Verfaillie 2002; Filip et al 2004) e sono capaci non solo di rigenerare i tessuti tipici del mesoderma, ma anche di transdifferenziare in cellule derivate dall'ectoderma, come i neuroni (Kingham et al 2007), o dall'endoderma, come gli epatociti e le cellule  $\beta$  delle isole pancreatiche (Jiang et al 2002; Baksh et al 2004; Chen et al 2004).

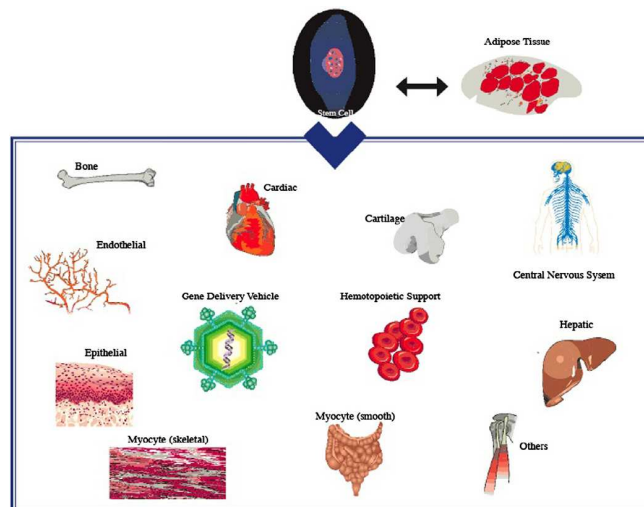


Figura 4 : Potenziale multidifferenziativo delle ASC (Morizane et al 2008)



Oltre ad un notevole potenziale differenziativo, le MSC possiedono altre importanti proprietà tra cui l'abilità di mantenere la propria capacità proliferativa e lo stato indifferenziato per numerose generazioni durante l'espansione *in vitro* (Bruder et al 1997). Molti ricercatori stanno attualmente lavorando per migliorare ancora di più l'efficienza sia dell' espansione che del differenziamento delle MSC *in vitro*; da questo punto di vista la crescita all'interno dei bioreattori costituisce una strategia particolarmente promettente che consente alle cellule di proliferare e differenziare in un ambiente dinamico altamente controllato in condizioni fisiologiche più simili a quelle dell'organismo. Uno studio molto recente propone un metodo di coltura delle MSC particolarmente innovativo in cui la superficie su cui crescono le cellule viene aumentata gradualmente durante la proliferazione cellulare; in questo modo la densità cellulare viene mantenuta costante e si previene l'inibizione della crescita mediata dal contatto cellula-cellula. Questo tipo di coltura consente di ottenere dopo 9 settimane di coltura un numero di MSC dieci volte superiore rispetto a quello che si ottiene mediante la coltura statica tradizionalmente usata (Majd et al 2009). Le MSC possiedono quindi numerose caratteristiche che le rendono candidate ideali per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale, tuttavia uno dei temi più controversi rimane la capacità di queste cellule di modulare la crescita tumorale. Alcuni studi supportano l'ipotesi che le MSC siano in grado di inibire la crescita tumorale: in particolare è stato dimostrato per la prima volta nel 1999 che le MSC coiniettate con cellule di melanoma B16 in un topo inibiscono la crescita del tumore (Maestroni et al 1999); questa osservazione è stata avvalorata da studi condotti in diversi modelli animali (Ohlsson et al 2003; Pisati et al 2007). Più recentemente è stato dimostrato che MSC umane sono in grado di esercitare una potente azione antitumorale attraverso il contatto diretto cellula-cellula in un modello sperimentale di sarcoma di Kaposi: l'effetto inibitorio dipende dalla capacità delle MSC di down-regolare nelle cellule tumorali l'attività della protein-chinasi Akt; questa scoperta indica che i tumori umani caratterizzati dalla deregolazione di Akt potrebbero essere target specifici delle proprietà antitumorigeniche delle MSC (Khakoo et al 2006). Altri studi invece hanno dimostrato che le MSC sono in grado di supportare la crescita tumorale (Zhu et al 2006; Gunn et al 2006); questa capacità potrebbe dipendere sia dall'effetto immunosoppressivo delle MSC che dalla loro abilità nel promuovere l'angiogenesi che è un evento chiave nello sviluppo del cancro e nel processo di metastatizzazione (Sun et al 2005). A supporto di questo lavoro, un altro studio ha inoltre dimostrato che cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo possono, in opportune condizioni di crescita, assumere caratteristiche simili a quelle dei CAF (*Carcinoma-Associated Fibroblasts*) sia dal punto di vista fenotipico che funzionale; queste cellule,

analogamente ai CAF, esprimono elevati livelli di SDF-1 e sono capaci di promuovere la crescita tumorale sia *in vitro* che in un modello *in vivo* in cui vengono coimpiantate insieme a cellule tumorali (Mishra et al 2008).

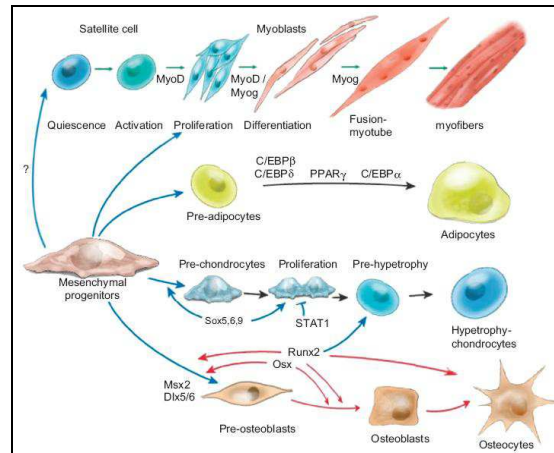
### **1.1.5 Potenziale differenziativo delle MSC**

Sia le cellule staminali embrionali che le cellule staminali mesenchimali sono in grado di differenziare verso linee cellulari di diversi tessuti e organi e, per questo motivo, rappresentano un supporto essenziale per la rigenerazione tissutale (Blau et al., 2001; Seaberg & van der Kooy, 2003; Shostak, 2006). Il processo differenziativo richiede la sincronizzazione di due eventi contrapposti tra loro quali la repressione e l'up-regolazione di geni che determinano rispettivamente il mantenimento dello stato di staminalità o il differenziamento verso una determinata linea cellulare (Zipori, 2004); questo processo è anche determinato da cambiamenti della struttura della cromatina che mediano il legame di diversi regolatori genici ai promotori tessuto-specifici. Durante lo sviluppo dell'apparato scheletrico, la formazione dell'osso e della cartilagine è determinata da progenitori mesenchimali (Benayahu et al., 2007; Pittenger et al., 1999); nell'adulto, il differenziamento di cellule staminali mesenchimali del midollo osseo verso la linea condrogenica e osteogenica, è regolato dalle proteine Sox, Runx2/Cbfa1 e Osterix/Osx, fattori trascrizionali che regolano l'espressione di diversi geni tessuto-specifici. Diversi studi hanno inoltre dimostrato che le BMSC sono in grado di differenziare anche verso la linea miogenica (mediante la presenza di fattori trascrizionali muscolo-specifici (MRF) quali: Myf5, MyoD, miogenina e MRF4) e adipogenica (Asakura, 2003; Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; LaBarge & Blau, 2002).

Alterazioni nel signaling a causa di malfunzionamenti nei meccanismi cellulari causati dall'invecchiamento dell'organismo o di una de-regolazione dei pathways metabolici, possono deviare le BMSC dal loro destino osteogenico e miogenico e indurre il loro differenziamento verso la linea adipogenica (Benayahu et al., 2000, 2007; Brack et al., 2007; Sekiya et al., 2004; Shefer et al., 2004).

L'attivazione o la repressione dei diversi processi differenziativi è dunque soggetta allo stato *on-off* di specifici set di geni determinato dall'interazione di fattori trascrizionali specifici con le loro sequenze regolatrici. Il grado di condensazione della cromatina riveste un ruolo di primaria importanza per il *commitment* delle cellule staminali (Benayahu et al., 2008), infatti, quando la cromatina si trova in uno stato altamente condensato, le sequenze regolatrici dei geni non sono accessibili al complesso trascrizionale e, per tale motivo, rimangono silenti.

Il destino delle cellule staminali è controllato pertanto da specifici segnali, presenti nella nicchia in cui le cellule risiedono, che influenzano i fattori responsabili del rimodellamento della cromatina (*chromatin-remodeling complexes*) regolando l'espressione genica (Benayahu et al., 2007-2008); tuttavia non è ancora stato chiarito quale sia il momento esatto in cui questi complessi vengono reclutati per permettere la trascrizione dei geni tessuto-specifici.



**Figura 5:** Schema del differenziamento miogenico, osteogenico, condrogenico e adipogenico di cellule MSC (Benayahu et al., 2008)

Il differenziamento condrogenico e osteogenico è regolato durante gli stadi precoci da due diversi pathways, Wnt/β-catenina e BMP (Gregory et al., 2005; Zelzer et al., 2001); nelle MSC Wnt/β-catenina attiva Runx2 inducendo il differenziamento osteogenico (Gaur et al., 2005; Krishnan et al., 2006), mentre BMP2 induce l'espressione di Nkx3.2 e Sox9 e reprime quella di Runx2 indirizzando le cellule verso la linea condrogenica.

I recettori degli ormoni steroidei partecipano al rimodellamento dello stato della cromatina agendo su specifici fattori che attivano o reprimono l'espressione di geni durante il differenziamento osteogenico. Anche l'acido retinoico e gli estrogeni giocano un ruolo importante nel differenziamento osteogenico delle MSC e nello sviluppo del tessuto scheletrico; infatti, CHD9 interagisce con il recettore dell'acido retinoico (RXR) che regola i fattori trascrizionali Sox9 e Runx2 (Weston et al., 2003).

La formazione di osso e cartilagine richiede dunque l'intervento di molteplici meccanismi molecolari. Lo studio degli eventi che controllano i fattori trascrizionali dei diversi pathway e delle modifiche a livello epigenetico coinvolte nel differenziamento delle cellule staminali mesenchimali, potrebbe permettere l'identificazione delle cause che determinano l'insorgenza di patologie a livello dell'apparato scheletrico e lo sviluppo di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche.

### 1.1.6 MSC e Invecchiamento

L'invecchiamento è l'insieme di tutti quei processi che portano ad una diminuzione dei meccanismi rigenerativi di un organismo multicellulare (Sames e Stolzing, 2005). Concettualmente esso può essere distinto dalla senescenza replicativa che è un arresto irreversibile della divisione cellulare (Campisi, 2000) ed è determinata dalla repressione di geni coinvolti nella progressione del ciclo e da un' up-regolazione degli inibitori del ciclo cellulare che causano un arresto irreversibile in fase G1 (Sethe et al., 2005).

La maggior parte delle cellule umane adulte compie 50-60 divisioni cellulari prima di entrare in senescenza; questa limitata capacità replicativa, detta "Hayflick limit" in nome del ricercatore che la studiò (Hayflick, 1965), è probabilmente determinata dalla perdita ciclica delle sequenze telomeriche ad ogni divisione cellulare (Valerie et al., 2008).

Le cellule staminali embrionali possiedono la capacità di auto-mantenersi (*self-renewal ability*) e, contrariamente alle cellule adulte, esprimono alti livelli di telomerasi (Zeng et al., 2007). Tuttavia, sia cellule ES umane che murine, quando coltivate *in vitro* per lungo tempo, acquisiscono alterazioni genetiche che ne limitano le potenzialità alla sola capacità di auto-mantenimento determinando, quindi, la perdita del loro potenziale differenziativo (Baker et al., 2007). E' stato comunque osservato che ES coltivate in condizioni di crescita che promuovono la capacità di auto-mantenimento ma impediscono il differenziamento cellulare, quando iniettate in blastocisti riacquisiscono la capacità differenziativa e sono in grado di partecipare al normale programma di sviluppo dei tre foglietti embrionali (Smith et al., 2001).

La capacità di *self-renewal* delle cellule staminali mesenchimali adulte è necessaria sia per il mantenimento dell'omeostasi di tessuti che necessitano giornalmente di un'alta produzione di cellule differenziate, per esempio il sistema ematopoietico e l'epitelio della pelle e dell'intestino, sia per i tessuti che non necessitano di un turnover cellulare così elevato, come SNC e fegato, dove intervengono nei meccanismi riparativi (Weissman, 2000). Tuttavia, in molti tessuti di mammifero, con l'avanzare dell'età dell'organismo, si osserva un declino di questa capacità rigenerativa causata, presumibilmente, da una perdita di funzionalità delle cellule staminali stesse e da una conseguente riduzione nella capacità di generare cellule progenitrici e differenziate, fattori che compromettono la vitalità di un tessuto o di un organo. Non è ancora del tutto chiaro se tale processo sia causato dall'invecchiamento cellulare, ma è tuttora valida l'ipotesi secondo cui un accumulo di cellule senescenti contribuisca all'invecchiamento; il processo di senescenza permetterebbe, probabilmente,

l'eliminazione di quelle cellule che presentano danni al DNA e che, per tale motivo, compromettono l'integrità dell'organismo (Sharpless et al., 2007). E' stato, inoltre, osservato che la deplezione di MSC contribuisce all'insorgenza di patologie degenerative di numerosi tessuti inclusi cervello, fegato, pelle ed ossa; una riduzione del numero e dell'efficienza delle MSC potrebbe quindi essere coinvolta nella degenerazione dei tessuti che si osserva durante l'invecchiamento (Rao & Mattson, 2001).

Normalmente le MSC *in vivo* rimangono in stato quiescente per prolungati periodi di tempo e, in risposta a specifici segnali, promuovono la rigenerazione e la riparazione dei tessuti danneggiati da traumi o patologie. Questo suggerisce che le cellule staminali mesenchimali regolino il loro ciclo cellulare in modo diverso rispetto ad altri tipi cellulari (Rubin, 2002). Le MSC sono in grado di espandersi notevolmente in coltura, ma non sono immortali e la senescenza cellulare *in vitro* è stata riportata in diversi studi (Digirolamo et al., 1999; Banfi et al., 2002) ed è dipendente dal numero di divisioni cellulari (von Zglinicki et al., 2005) e dal progressivo accorciamento dei telomeri (Bonab et al., 2006; Stenderup et al., 2003).

Diversi studi hanno investigato l'effetto dell'età del donatore sulla capacità proliferativa delle MSC dimostrando una riduzione di tale capacità in MSC isolate da donatori anziani (Baxter et al., 2004; Stenderup et al., 2003). Infatti, mentre le cellule isolate da donatori giovani hanno una vita cellulare di 30-40 divisioni, il potenziale proliferativo di cellule isolate da donatori anziani si riduce a 20. La capacità proliferativa delle MSC sembra quindi venir persa in maniera inversamente proporzionale all'età del donatore (Bellantuono et al., 2009).

E' stato dimostrato che MSC isolate da donatori anziani quindi con una bassa capacità proliferativa presentano un aumento delle dimensioni cellulari e telomeri più corti rispetto alle cellule isolate da donatori più giovani (Baxter et al., 2004; Stenderup et al., 2003; Stolzing et al., 2008; Guillot et al., 2007; Mareschi et al., 2006). Un altro fattore responsabile dell'insorgenza *in vitro* della senescenza cellulare delle MSC è la bassa attività della telomerasi (Wright et al., 2002), enzima che sintetizza le sequenze telomeriche mancanti. L'attività telomerasica è stata osservata in cellule staminali embrionali (Thomson et al., 1998), in cellule staminali adulte come le cellule staminali ematopoietiche (Chiu et al., 1996), in cellule staminali neuronali (Ostenfeld et al., 2000), in cellule staminali della pelle e delle cripte intestinali (Forsyth et al., 2002) e viene persa in seguito al differenziamento (Armstrong et al., 2000; Forsyth et al., 2002; Ravindranath et al., 1997). Al contrario, diversi studi hanno dimostrato che la telomerasi non è espressa in cellule MSC mantenute in coltura (Simonsen et al., 2002; Zimmerman et al., 2003): è possibile che, una sottopopolazione di MSC esprima tale

enzima *in vivo* e che, in seguito all'isolamento e alla crescita *in vitro*, l'espressione della telomerasi venga *down-regolata* (Bellantuono et al., 2009).

### **1.1.7 Le MSC come mediatori trofici**

Oltre alla risposta a stimoli tissutali e al successivo differenziamento le MSC sono anche in grado di sintetizzare un ampio spettro di fattori di crescita e citochine che hanno un profondo effetto sulle dinamiche cellulari locali. A livello del midollo osseo, infatti, non solo rappresentano un importante substrato per l'ancoraggio delle HSC, ma sono anche in grado di sostenere l'emopoiesi attraverso il rilascio di citochine ematopoietiche (Dexter et al. 1990; Majumdar et al. 1998).

Le capacità di superare la barriera emato-encefalica (BEE) (Kopen et al. 1999) e di migrare nella zona cerebrale lesa (Chen et al., 2001a e b) potrebbero permettere alle MSC di promuovere un recupero funzionale anche di aree danneggiate distinte dal tessuto di appartenenza, come appunto a livello del SNC. In particolare due studi di Chen e coll. (2003) e di Li e coll. (2005) ipotizzano che l'azione delle MSC si basi prevalentemente sulla prevenzione della completa degenerazione del tessuto lesa (in seguito ad ischemia ed aneurisma) piuttosto che sulla potenziale sostituzione delle cellule danneggiate (neuroni e astrociti) e sulla loro integrazione nei circuiti neurali. Tra gli effetti indotti da tali cellule staminali sono compresi, in generale, la riduzione dell'apoptosi, la promozione dell'angiogenesi, l'aumento dei livelli di espressione del fattore basale di crescita dei fibroblasti (bFGF) che stimola proliferazione, migrazione e differenziamento di vari tipi cellulari cerebrali (Gerdes et al., 1992) e la riduzione dello spessore cicatriziale, che rappresenta un rilevante impedimento alla rigenerazione assonale (Groves et al., 1993).

Si ritiene sempre più insistentemente che tale funzione sia riconducibile al rilascio di fattori solubili o bioattivi (fattori di crescita, citochine) indotto dall'interazione MSC-microambiente lesionato. Infatti è stato dimostrato che le MSC producono il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) (Majumdar et al. 1998; Villars et al. 2000), che è in grado di ridurre il danno cerebrale da ischemia, diminuendo il volume della regione infartuata e la formazione dell'edema. Inoltre, esse sono in grado di rilasciare, bFGF, BDNF e NGF (Labouyrie et al. 1999; Chen et al. 2002a e b), la cui secrezione viene incrementata, in cellule mantenute *in vitro*, in seguito a esposizione di un terreno condizionato dall'estratto cerebrale danneggiato (Chen et al 2002a).

Recentemente, è stata condotta un'analisi quantitativa dei livelli di espressione di neurotrofine in relazione agli effetti sulla sopravvivenza e sulla neuritogenesi di cellule di neuroblastoma e nervi periferici (Crigler et al. 2006). Da questi esperimenti è emerso

che i livelli di espressione dei trascritti di BDNF e NGF sono ristretti a specifiche sottopopolazioni, o sottoclone, di MSC e che tali livelli correlano con la capacità di promuovere sopravvivenza cellulare e neuritogenesi stessa. D'altro canto tali neurotrofine, da sole, non sono in grado di mediare tutti i potenziali effetti delle MSC; infatti l'analisi del loro "trascrittoma" ha evidenziato l'espressione di altre molecole che potrebbero essere coinvolte, tra le quali: fattori che inducono la crescita di neuriti, molecole che facilitano l'adesione di cellule neuronali, molecole che guidano lo sviluppo assonale e recettori per neurotrasmettitori (Crigler et al. 2006).

Un altro effetto mediato dai fattori trofici rilasciati dalle MSC potrebbe coinvolgere un potenziamento della proliferazione di cellule staminali e di progenitori neurali endogeni. A livello di due regioni cerebrali discrete, la zona subgranulare (SGZ) del giro dentato dell'ippocampo e la zona subventricolare (SVZ) del ventricolo laterale con la sua proiezione fino al bulbo olfattivo, è stata confermata una persistente neurogenesi anche nell'età adulta (Ming e Song, 2005). In aggiunta, è risultato che la sovraespressione di BDNF nella zona ventricolare di ratti adulti induce un reclutamento di progenitori endogeni a livello del bulbo olfattivo (Benraiss et al., 2001), mentre VEGF e bFGF stimolano la neurogenesi nell'ippocampo e nella SVZ (Jin et al., 2002b; Liu et al., 1994).

Più recentemente, uno studio di Kang e coll. (2003) ha suggerito che anche le cellule mesenchimali isolate da un'altra sorgente, quale il tessuto adiposo, mostrano il potenziale trofico sulle cellule neurali staminali (NSC) *in vitro*. Infine, è stato evidenziato che un possibile effetto del trattamento con MSC in topi lesionati a livello cerebrale possa coinvolgere il potenziamento della risposta degli astrociti reattivi a lungo termine; il maggior reclutamento e l'aumentata proliferazione di tali astrociti guiderebbe la rigenerazione assonale nella zona subventricolare (Li et al. 2005).

## 2. Cellule del sistema nervoso centrale

Nel sistema nervoso centrale esistono diversi tipi cellulari, i principali sono:

- cellule nervose (o neuroni) che costituiscono la principale fonte di messaggi trasmessi dal sistema nervoso
- cellule gliali (o glia) che sono gli elementi di sostegno.

### 2.1 Le cellule gliali

Le cellule gliali del sistema nervoso dei vertebrati si suddividono in due classi principali:

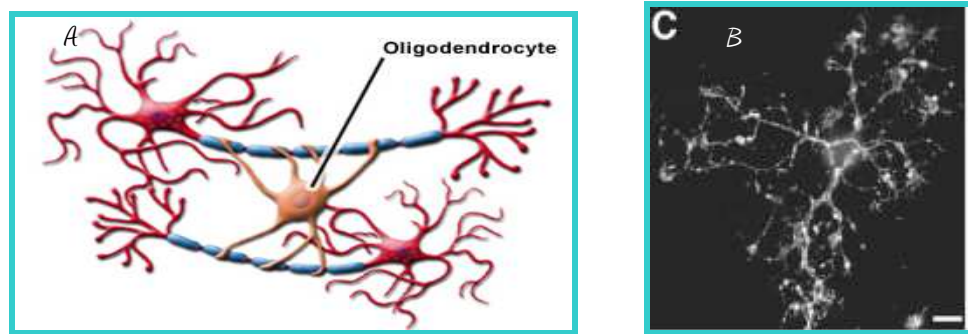
1. La **microglia** costituisce dal 5 al 20% della popolazione totale di cellule del SNC (Santambrogio et al., 2001); essa svolge il ruolo di prima e principale difesa immunitaria attiva nel SNC. La microglia regola e mantiene l'omeostasi del tessuto nervoso proteggendo i neuroni in caso di insulto. Le cellule della microglia si muovono all'interno del SNC: questa caratteristica permette loro di spostarsi per raggiungere e contrastare la presenza di agenti patogeni, detriti, placche e neuroni danneggiati. In seguito a lesioni, infezioni e disturbi la microglia interviene rapidamente per prevenire un danno potenzialmente fatale. Anche la velocità di reazione della microglia si deve alla sua plasticità strutturale e alla grande sensibilità anche ai più piccoli cambiamenti nell'omeostasi extracellulare di fattori quali, ad esempio, la concentrazione del potassio. Sono stati identificati due stati strutturali in cui si può trovare la microglia: *resting* e attivata. Il passaggio dalla forma *resting* a quella attivata, caratterizzato anche da un cambio morfologico da una forma ramificata ad una forma ameboide, si riscontra ogni qualvolta la microglia risponde ad uno stimolo di tipo infiammatorio. Oltre a svolgere il ruolo di componente cellulare immunocompetente del SNC, la microglia è in grado di interagire con le cellule neuronali comunicando con esse e influenzandone direttamente alcune funzioni sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Moriguchi et al., 2003). Quando si verifica un danno reversibile irreversibile a livello neuronale, la microglia acquisisce un fenotipo neurodegenerativo nei confronti nei neuroni ormai compromessi, per preservare l'integrità complessiva del tessuto nervoso. . In questi ultimi anni sono stati utilizzati numerosi modelli animali per dimostrare quale ruolo fondamentale svolge la microglia nello sviluppo del SNC; in questi modelli animali caratterizzati da una popolazione microgliale alterata, sono state successivamente riscontrate diverse pesanti alterazioni nel SNC maturo (Roumier et al., 2004). Ciò accade perché la



microglia apporta un contributo fondamentale per la sinaptogenesi e per il ripristino dopo un eventuale danno.

2. La macroglia invece è composta principalmente da tre tipi cellulari predominanti nel sistema nervoso: gli oligodendrociti, le cellule di Schwann e gli astrociti.

Gli oligodendrociti (fig. 5) e le cellule di Schwann sono cellule piccole fornite di un numero limitato di processi. Entrambi questi tipi cellulari svolgono l'importante funzione di isolare gli assoni formandovi attorno, con i loro processi, una guaina di mielina che li circonda concentricamente in strette spirali. Gli oligodendrociti, che sono presenti nel SNC possono avvolgersi attorno a numerosi tratti internodali (15 in media) mentre le cellule di Schwann del sistema nervoso periferico (SNP), al contrario, circondano ciascuna un unico tratto internodale di un solo assone. Anche la composizione chimica della mielina elaborata dagli oligodendrociti e dalle cellule di Schwann è alquanto diversa.



**Figura 6:** Morfologia dell'oligodendrocita

A: [http://sante-mediresource.sympatico.ca/ms\\_science.aspchannel.html](http://sante-mediresource.sympatico.ca/ms_science.aspchannel.html)

B: Fields and Stevens-Graham, 2002

Gli astrociti, che costituiscono il tipo più numeroso di cellule gliali, devono il proprio nome alla forma irregolare e vagamente stellare dei loro corpi cellulari. (fig. 6).

Esistono due classi di astrociti: astrociti *di tipo 1* e astrociti *di tipo 2*.

- gli astrociti di tipo 2 e gli oligodendrociti differenziano durante il periodo post-natale da un precursore comune.
- gli astrociti di tipo 1 invece differenziano durante lo sviluppo embrionale da un precursore cellulare diverso rispetto al precedente.

Raff et al. nel 2001 hanno osservato che lo sviluppo della cellula progenitrice degli astrociti di tipo 2 e degli oligodendrociti è controllato da segnali provenienti dagli astrociti di tipo 1. Infatti, quando tali cellule progenitrici vengono messe in coltura in assenza di astrociti di tipo 1 esse cessano di proliferare e differenziano

immediatamente, mentre in presenza di astrociti di tipo 1 continuano la loro proliferazione. Questo sembra che avvenga perché gli astrociti di tipo 1 secernono dei fattori fondamentali per la proliferazione di queste cellule progenitrici; uno di questi fattori è il PDGF.

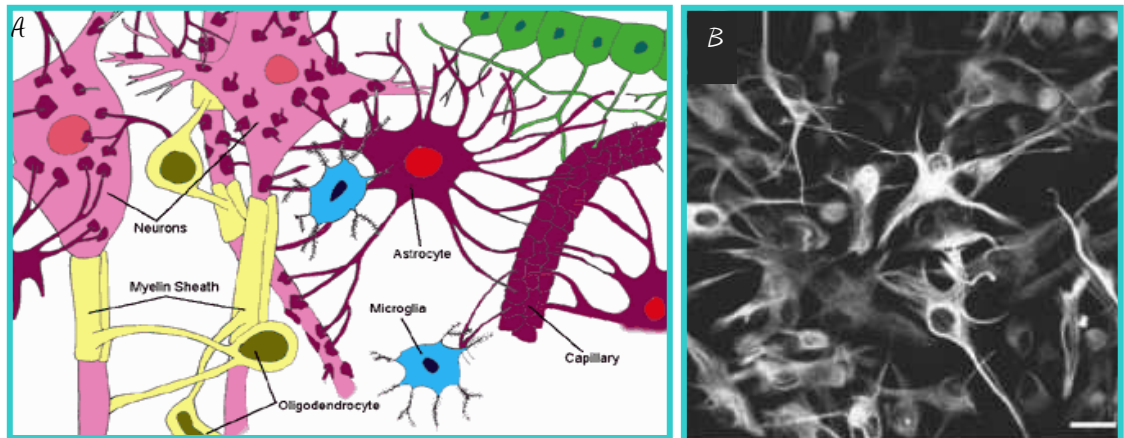
Anche la determinazione del differenziamento degli astrociti di tipo 2 rispetto agli oligodendrociti è regolata dagli astrociti di tipo 1. Le cellule progenitrici in colture mantenute in terreni privati del siero, infatti, differenziano in oligodendrociti mentre in presenza di proteine rilasciate dagli astrociti di tipo 1, come il fattore ciliare neurotrofico (CNTF), differenziano in astrociti di tipo 2 (Kandel et al., 1991).

### **2.1.1 Ruolo degli astrociti**

Gli astrociti hanno un ruolo fondamentale nella modulazione dell'attività neuronale sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche assumono un ruolo importante nello sviluppo e nell'attività cerebrale ma anche nelle patologie del sistema nervoso.

al Inizialmente, agli astrociti veniva riconosciuto solamente un ruolo di supporto strutturale nel SNC con la produzione di svariati fattori neurotrofici e di elementi nutritivi necessari al sostentamento dei neuroni. Oggi a queste cellule sono attribuite svariate funzioni modulatorie e vengono classificate in base alle forme, alla locazione e alla funzione che svolgono (Barres, 2008).

La principale funzione degli astrociti è rappresentata dalla loro capacità di mantenere costante la concentrazione extracellulare degli ioni potassio negli spazi intercellulari che separano i neuroni: in seguito alla depolarizzazione indotta dal potenziale d'azione, gli ioni potassio fuoriescono dalla cellula; una scarica di potenziali d'azione a frequenza elevata può determinare perciò un aumento della concentrazione extracellulare di potassio in grado di interferire con le proprietà di scarica dei neuroni vicini. In questi casi gli astrociti possono assumere l'eccesso di potassio per via della loro elevata permeabilità verso questi ioni e proteggere in tal modo i neuroni circostanti (Howe et al., 2008). Insieme alla concentrazione del potassio viene regolata finemente anche quella del sodio. Questi ioni sono prelevati dal microambiente e rilasciati nel torrente circolatorio. Questo meccanismo è necessario in quanto in seguito a intensa attività sinaptica si possono verificare squilibri nelle diverse specie ioniche nel microambiente. Se questa condizione non viene arginata e corretta si può sviluppare uno stato di depolarizzazione cronica neuronale. Mantenendo quindi la corretta omeostasi extracellulare, gli astrociti preservano la funzionalità elettrica dei neuroni (Shibuki et al., 1996).



**Figura 7:** Morfologia ed interazioni dell'astrocita all'interno del SNC.

A: <http://library.thinkquest.org/C0126536/main.phpcurrentchap=1currentsect=neuron.htm>

B: Fields and Stevens-Graham, 2002

Gli astrociti sono anche in grado di captare i neurotrasmettitori liberati dalle terminazioni sinaptiche, contribuendo così a regolare l'attività neuronale. Per esempio nel caso del glutammato, questo viene recuperato dallo spazio extra cellulare dagli astrociti, trasformato in glutammato, amminoacido non eccitatorio e rilasciato nello spazio extracellulare. La glutammato verrà recuperata dal neurone che la utilizzerà per la sintesi del glutammato (Bacci et al., 1995).

Oltre alle già citate funzioni, alle cellule astrogliali è attribuita una notevole importanza nel guidare la migrazione dei neuroni durante lo sviluppo del sistema nervoso (glia radiale) e nel regolare la formazione del contatto sinaptico (sinaptogenesi).

Il ruolo della glia nel promuovere la sinaptogenesi è stato suggerito da risultati ottenuti su colture primarie di cellule corticali mediante approcci elettrofisiologici (Pfrieger et al., 1997). È stata osservata una differente efficienza nella formazione di contatti sinaptici funzionali in colture di neuroni ippocampali cresciuti in presenza o in assenza di cellule gliali, con un aumento del numero di sinapsi in colture cresciute a diretto contatto con le cellule gliali.

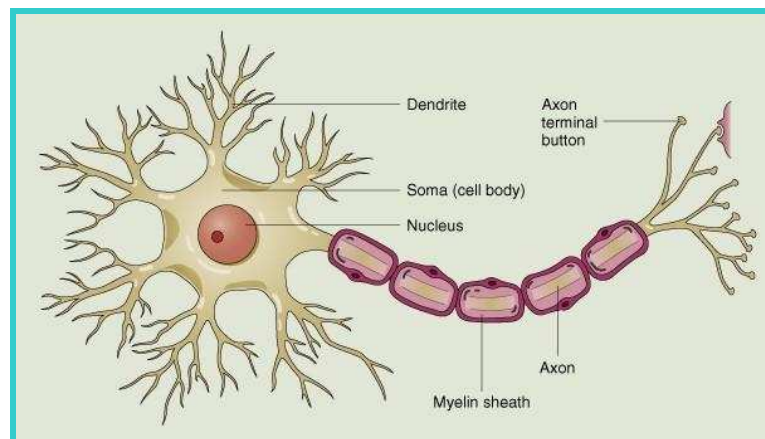
## **2.2 Le cellule neuronali (I Neuroni)**

Il neurone è l'unità elementare strutturale e funzionale del SNC (fig.7). Il sistema nervoso centrale contiene un numero molto elevato di neuroni (all'incirca  $10^{11}$ ) classificabili in differenti tipi in base alla natura del segnale che ricevono o che generano, ma quasi tutti riconducibili ad un modello strutturale generale.

Essi infatti sono caratterizzati da:

- un corpo cellulare, detto soma
- dendriti
- assone

I dendriti ricevono segnali a livello dei contatti sinaptici e li propagano in direzione centripeta (verso il soma). A differenza dell' assone i dendriti non sono dei buoni conduttori dei segnali nervosi i quali tendono a diminuire di intensità nel corso della propagazione. L'assone conduce invece il segnale in direzione centrifuga. È un ottimo conduttore grazie alla possibilità di generare il potenziale d'azione, ha un diametro uniforme e non contiene ribosomi. La parte finale dell' assone è un'espansione detta bottone terminale. Attraverso i bottoni terminali un assone può prendere contatto con i dendriti o il corpo cellulare di altri neuroni affinché l'impulso nervoso venga trasmesso ed elaborato lungo un circuito neuronale. La struttura del neurone può quindi essere semplificata rappresentandola tramite un modello che lo suddivide in quattro parti funzionali: un elemento di ingresso (o recettivo) e/o di elaborazione (dendriti e soma), uno d'innescò (cono di emergenza), uno di conduzione a distanza (l'assone) e un elemento di uscita o secretorio (il terminale sinaptico) (Kandel; Blackmore e Letourneau, 2006).



**Figura 8:** Domini strutturali del neurone <http://www.kensbiorefs.com/humphy.html>

### **2.2.1 Stadi di sviluppo di Neuroni in coltura**

Piastrando su vetrino neuroni embrionali a bassa densità, nel 1988 Dotti nel laboratorio di Banker (Dotti et al., 1988) ha identificato la sequenza morfologica di eventi responsabili della trasformazione dei neuroni ippocampali in cellule polarizzate e funzionalmente mature. Tale sviluppo può essere suddiviso in 5 fasi fondamentali:

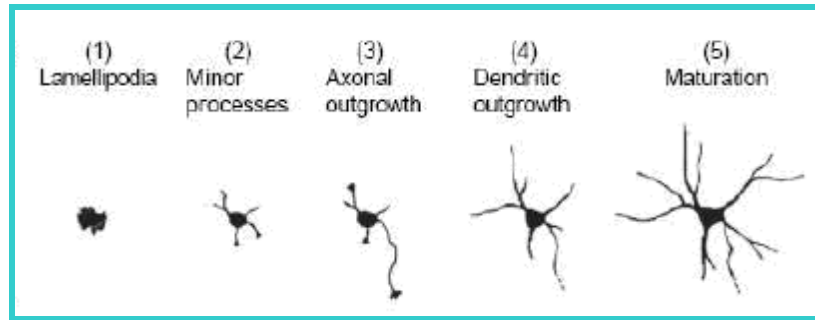
1) *formazione di lamellipodi (stage 1)*: le cellule, quando messe in coltura, in seguito alla dissociazione, sono fondamentalmente sferiche, prive di processi e richiedono qualche ora per aderire al substrato (Banker et al., 1977); il primo cambiamento morfologico è rappresentato dalla comparsa di strutture appiattite intorno alla circonferenza del corpo cellulare definite lamellipodi. Tali strutture non sono state ritrovate *in vivo* quindi la loro comparsa in coltura potrebbe essere un adattamento alla crescita su un substrato artificiale e bidimensionale.

2) *sviluppo di processi minori (stage 2)*: durante questa fase i lamellipodi si trasformano in corti e distinti processi che vengono definiti processi minori. Essi appaiono cilindrici in sezioni trasversali e a livello delle loro terminazioni sviluppano dei coni di crescita.

3) *formazione e sviluppo dell'assone (stage 3)*: dopo la comparsa dei processi minori, uno di questi inizia a crescere con una velocità che risulta 5-10 volte maggiore rispetto agli altri: tale processo è quello che diventerà poi l'assone. Da questo momento il neurone si può definire polarizzato. L'assone è dotato di numerose e sottili protrusioni per tutta la sua lunghezza denominate filopodi e possiede alla sua estremità un prominente cono di crescita. Quasi tutti i processi minori possiedono, appena emessi, la capacità di diventare un assone e solo quando viene stabilita l'identità definitiva assonale, i rimanenti prolungamenti perdono questa capacità.

4) *crescita dei dendriti (stage 4)*: anche i dendriti si sviluppano a partire dai processi minori, ma qualche giorno dopo l'assone, questo è stato confermato anche in studi effettuati *in vivo* (Nowarowski et al., 1979). I dendriti però crescono tutti contemporaneamente e più lentamente rispetto all'assone.

5) *maturazione di arborizzazioni assonali e dendritiche e formazione dei contatti sinaptici (stage 5)*: durante questa fase i processi assonali e dendritici dei diversi neuroni presenti sul vetrino crescono fino a formare una fitta rete di prolungamenti con la formazione di sinapsi funzionalmente attive. In questa fase vi è un cambiamento nel controllo dello sviluppo più che una semplice e qualitativa modificazione dell'organizzazione cellulare.



**Figura 9:** Stadi di sviluppo del neurone in coltura [Dotti et al. (1988)]

La polarizzazione sembra, perciò, essere un processo intrinseco dello sviluppo neuronale, che si basa sull'organizzazione interna della cellula stessa e si verifica apparentemente in assenza di segnali esterni.

### 2.2.2 La sinapsi

La comunicazione tra neuroni avviene attraverso le *sinapsi* che rappresentano giunzioni intercellulari asimmetriche, altamente specializzate e caratterizzate da una stretta apposizione tra la membrana plasmatica *presinaptica* e quella *postsinaptica*: le terminazioni assionali si espandono, formando rigonfiamenti definiti compartimenti presinaptici o *bottoni sinaptici*. Essi sono caratterizzati dalla presenza di *clusters* di vescicole contenenti neurotrasmettitori, definite *vescicole sinaptiche* (VS). Il compartimento postsinaptico, invece, si distingue per l'accumulo di recettori che legano specificatamente tali neurotrasmettitori, una volta rilasciati nello spazio intersinaptico. Il meccanismo di trasmissione del segnale fra neuroni, quindi, può essere così schematizzato: in seguito a stimolazione, le VS si fondono con specifiche regioni della membrana presinaptica (*zone attive*), rilasciano il loro contenuto nello spazio sinaptico e trasmettono la loro informazione, in seguito a interazione con gli specifici recettori, al compartimento postsinaptico.

Le sinapsi possono essere di due tipi:

- ◆ eccitatorie: caratterizzate dal rilascio di glutammato, acetilcolina (Ach) e monoammine (serotonina, adrenalina, noradrenalina, dopamina e istamina).
- ◆ inibitorie: caratterizzate dal rilascio di acido  $\gamma$ -amino butirrico (GABA) e glicina.

Una corretta regolazione della trasmissione dei segnali eccitatori ed inibitori è di fondamentale importanza per le funzioni vitali di ogni essere vivente. Anche nel modello *in vitro* caratterizzato da Bartlett e Banker sono presenti sia sinapsi inibitorie che eccitatorie anche se in percentuale differenti infatti la maggior parte dei neuroni

risulta essere glutamatergica, quindi eccitatori, mentre solo per l' 8-10% sono gabaergici, quindi inibitori. (Bartlett e Bunker, 1984)

Uno dei fattori maggiormente coinvolti nella formazione delle sinapsi è il *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) una delle principali neurotrofine sintetizzato e rilasciato anche dalle MSC (Crigler et al., 2006). Il BDNF è stato descritto come fattore chiave nella regolazione dello sviluppo di diversi sottotipi di interneuroni GABAergici (Marty et al., 1996, 2000; Huang et al., 1999; Rutherford et al., 2000; Jin et al., 2003; Kohara et al., 2003). In particolare, esso promuove la crescita e l'arborizzazione dendritica e la formazione delle spine inibitorie (Murphy et al., 1998; Jin et al., 2003; Sang e Tan, 2003). Anche gli astrociti sono in grado di modulare la sinaptogenesi inibitoria mediante un meccanismo indiretto neurotrofina/Trk-dipendenti (Elmariah et al., 2005).

### **2.2.3 I trasportatori vescicolari**

Affinché a livello della terminazione nervosa si verificano eventi sinaptici ripetitivi è necessario che avvengano processi fisiologici fondamentali quali il riciclo delle VS e il ripristino del contenuto di tali vescicole ad ogni ciclo. Quest'ultima attività viene compiuta da specifiche proteine della membrana vescicolare, che trasportano i neurotrasmettitori dal citoplasma neuronale al lume di tali organelli. Essa dipende dal gradiente elettrochimico di ioni  $H^+$ , generato dalla pompa protonica vacuolare (ATPasi) (Schuldiner et al., 1995), che accoppia l'idrolisi di ATP citoplasmatico al trasporto di ioni  $H^+$  all'interno delle vescicole. Pertanto, il trasporto attivo di neurotrasmettitori a livello delle VS consiste nello scambio di protoni luminali, precedentemente accumulati al loro interno, con neurotrasmettitori citoplasmatici.

I trasportatori responsabili dell'accumulo di neuromodulatori a livello delle VS appartengono a tre distinte famiglie:

- 1) la famiglia dei trasportatori specifici per acetilcolina (vACh) e per le monoammine (vMat), che riconoscono serotonina, adrenalina, noradrenalina, dopamina e istidina;
- 2) la famiglia di trasportatori ad alta affinità per il glutammato (vGlut);
- 3) la famiglia di trasportatori specifici per il GABA (vGat).

### **2.2.4 Trasportatori vescicolari del glutammato**

Fino ad oggi sono stati clonati tre distinti trasportatori vescicolari del glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio del CNS (Roberts et al., 1981): vGlut1 (Bellocchio et al., 2000), vGlut2 (Fremeau et al., 2001; Bai et al., 2001; Takamori et al.,

2001) e vGlut3 (Gras et al., 2002; Takamori et al., 2002; Fremeau et al., 2002; Schäfer et al., 2002). Essi sono stati inizialmente identificati come membri della famiglia dei trasportatori del fosfato inorganico dipendente da Na<sup>+</sup> (Ni et al., 1994, Aihara et al., 2000), ma è stata successivamente evidenziata l'elevata affinità e specificità per il glutammato.

I tre distinti trasportatori vescicolari del glutammato non dimostrano sostanziali differenze tra loro nelle caratteristiche di trasporto né dal punto di vista cinetico, né farmacologico e nemmeno nella specificità per il substrato (Bellocchio et al., 2000; Gras et al., 2002; Takamori et al., 2000; Takamori et al., 2001); inoltre possiedono una dipendenza bifasica dalle concentrazioni di Cl<sup>-</sup> (Bellocchio et al., 2000, Fremeau et al., 2001). Le differenze fondamentali per cui questi trasportatori differiscono sono i profili d'espressione nelle diverse aree cerebrali. Si è dimostrata, infatti, una localizzazione complementare nell'adulto di vGlut1 e vGlut2: il primo è distribuito prevalentemente a livello della corteccia cerebrale, cerebellare e dell'ippocampo, mentre il secondo soprattutto a livello del ponte, del talamo e del midollo spinale (Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Varoqui et al., 2002). Di notevole importanza è lo *switch* d'espressione da vGlut2 a vGlut1 che si verifica durante lo sviluppo postnatale nell'ippocampo, nel cervello e nel cervelletto di ratto. Il primo trasportatore viene espresso, infatti, ad alti livelli in età embrionale e alla nascita, mentre il secondo risulta quasi assente. vGlut1 subisce un drastico incremento dei livelli di espressione dopo la nascita, diventando l'isoforma predominante nelle regioni telencefaliche entro la seconda settimana postnatale.

A differenza degli altri due trasportatori sopra citati, vGlut3, è stato più frequentemente riscontrato in neuroni serotoninergici e colinergici (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Schäfer et al., 2002) e in terminali GABAergici (Fremeau et al., 2002); potrebbe, perciò, avere un ruolo unico nella trasmissione non convenzionale glutammatergica (Gras et al., 2002; Schäfer et al., 2002; Fremeau et al., 2002).

### **2.2.5 Trasportatore vescicolare del GABA**

Il trasportatore vescicolare del GABA, definito vGat, è stato clonato contemporaneamente in *C. elegans* (McIntire et al., 1997) e nel topo (Sagnè et al., 1997). Esso rappresenta il principale trasportatore di neurotrasmettitori inibitori a livello cerebrale poiché è in grado di legare anche la glicina, anche se con minore affinità rispetto al GABA (Sagnè et al., 1997; McIntire et al., 1997; Bedet et al., 2000). Non risulta ancora del tutto chiaro se esistano due distinti trasportatori vescicolari selettivi per i due neurotrasmettitori inibitori.



### **3 Terapia genica**

La terapia genica è una branca della medicina moderna che prevede di modificare geneticamente le cellule che poi verranno utilizzate per riacquisire la funzionalità eventualmente persa. La sfida principale della terapia genica nel campo dei trapianti è quella di sviluppare terapie, applicabili per un tempo limitato, in grado di indurre una accettazione permanente dell'organo.(Glazkova DV et. Al. 2011)

Le strategie della terapia genica sono duplici:

- *trasferimento diretto del gene nel paziente*: in questo caso il gene viene introdotto nel tessuto del paziente tramite il circolo sanguigno o all'interno di un liposoma o all'interno di altre microparticelle biologiche oppure, in alternativa, può essere impacchettato all'interno di virus ingegnerizzati resi quindi non tossici e non infettivi, come per esempio in adenovirus o retrovirus. In molti casi con questo tipo di trasferimento non si ottengono buoni risultati poichè il gene trasferito tende ad integrarsi in modo random all'interno del cromosoma dei pazienti e inoltre l'organo o il tessuto bersaglio non sono sempre facilmente accessibili.
- *trasferimento mediante cellule vive*: è una procedura molto complessa che si divide in tre passaggi:
  - 1\_le cellule dopo essere state prelevate dal paziente vengono isolate e fatte proliferare in laboratorio;
  - 2\_il gene viene introdotto all'interno della cellula mediante metodiche simili a quelle descritte per il trasferimento diretto del gene;
  - 3\_le cellule geneticamente modificate vengono iniettate nuovamente nel paziente.Questo secondo approccio permette di avere maggior precisione poichè le cellule possono essere manipolate più facilmente *in vitro* che *in vivo* e possono essere espanse sotto determinate condizioni in laboratorio prima di reimpiantarle nel paziente.

#### **3.1 Sistemi cellulari come veicoli per Terapia Genica**

Nonostante i successi ottenuti con la terapia genica, come per esempio nei pazienti con SCID Immunodeficienza combinata grave (SCID), malattia genetica in cui il sistema immunitario non si sviluppa, e pazienti con amaurosi congenita di Leber, gli sviluppi attualmente sono ancora limitati alla scelta del veicolo e del gene per evitare una risposta immunologica contro il vettore o il gene trapiantato (Bainbridge et al., 2008).

Le cellule staminali embrionali sono le candidate ideali per essere utilizzate come veicolo per la terapia genica poiché esse sono in grado di autoreplicarsi illimitatamente e di mantenere il loro potenziale differenziativo in tutti i tipi cellulari derivanti da tutti e tre i foglietti germinativi; inoltre sono facilmente manipolabili geneticamente. Queste caratteristiche associate alla loro rapida crescita, alla loro stabilità e alla loro abilità di maturare in tutti i tipi cellulari del corpo le rendono molto interessanti per applicazioni nel campo della terapia genica. Nonostante i risultati promettenti ottenuti mediante le mutazioni genetiche delle cellule staminali, esistono ancora delle questioni che ne limitano l'utilizzo. Infatti, nonostante le cellule staminali embrionali siano in grado di rimanere a lungo in coltura è stato osservato che possono accumulare delle mutazioni genetiche e cambi epigenetici che potrebbero danneggiare il paziente provocando per esempio la formazioni di tipo tumorali. In aggiunta, queste cellule staminali poiché non-autologhe possono attivare la risposta immunitaria del paziente provocando rigetto.

Anche le cellule ematopoietiche sono considerate un buon veicolo da utilizzare nella terapia genica (Aiuti et al., 2002). Le cellule ematopoietiche sono cellule relativamente rare e possono essere estratte dal midollo osseo oppure dal sangue periferico. Dopo la manipolazione *in vitro*, possono essere trapiantate nel paziente, anche in maniera autologa, mediante la loro iniezione all'interno del circolo sanguigno e a questo punto grazie alla loro capacità di migrare si localizzano nel midollo osseo dove saranno in grado di ripristinare la popolazione di cellule del sangue.

Recentemente è stato osservato che anche altri tipi di cellule staminali, come le cellule staminali mesenchimali (MSC) possono essere utilizzate come veicoli nella terapia genica. Esse sono capaci di formare tessuto cartilagineo, adiposo e osseo; recenti studi hanno dimostrato che, sotto determinate condizioni, queste cellule sono in grado di differenziare anche in linee cellulari derivanti dagli altri due foglietti germinativi (transdifferenziamento). Un limite nell'utilizzo di queste cellule è la difficoltà di mantenerne la staminalità durante la manipolazione *ex vivo*.

### **3.2 Terapia cellulare**

La terapia cellulare prevede l'utilizzo di cellule staminali per il riparo e la rigenerazione di diversi tessuti e organi danneggiati. I tessuti danneggiati possono essere rigenerati *in vivo* mediante il trapianto di cellule sane in grado di auto replicarsi (Gimble et al., 2007). Le cellule staminali ideali per le applicazioni in medicina rigenerativa devono avere specifiche caratteristiche: essere presenti in elevate quantità, essere di facile reperibilità con tecniche poco invasive, essere in grado di differenziare verso diverse linee cellulari in maniera riproducibile, poter essere trapiantate con efficacia e in modo sicuro sia in ospiti autologi che allogenici, e infine devono poter essere manipolate in

modo da soddisfare le linee guida di *Good Manufacturing Practices* (GMP) che sono un'insieme di regole, procedure e linee guida in base alle quali vengono prodotti i farmaci, i dispositivi medici, i prodotti per la diagnostica, i cibi e le sostanze farmacologicamente attive.

Per la terapia cellulare possono essere utilizzati diversi tipi di cellule, in particolare le cellule staminali maggiormente studiate in questo campo sono: le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali adulte (ASC).

Le ESC sono state isolate per la prima volta nel 1981 dal topo (Martin G. R., 1981) e nel 1998 dall'uomo (Thomson JA et al., 1998); esse sono capaci di mantenere lo stato indifferenziato illimitatamente e sono in grado di differenziare in tutti i tipi cellulari derivanti da tutti e tre i foglietti germinativi. L'utilizzo di queste cellule nelle applicazioni cliniche però è molto problematico poichè la loro estrazione e la loro manipolazione sono soggette a regolamentazioni di tipo etico che ne limitano l'utilizzo; inoltre possono essere tumorigeniche, quindi in grado di sviluppare teratomi, tetra carcinomi etc ... ed essendo una risorsa di cellule non autologa possono provocare reazioni immunitarie che possono portare al rigetto (Piscaglia et al., 2007). Le ESC possono anche derivare da embrioni morti derivanti dalla fecondazione *in vitro*, da biopsie embrionali (Chung et al., 2006) e dalla *Altered Nuclear Transfer* che consiste nel modificare geneticamente il nucleo della cellula somatica per poi trasferirlo in un ovocita, in modo da creare un embrione capace di svilupparsi in blastocita ma incapace di impiantarsi nel utero.(Campos DB. et al. 2010)

Una promettente alternativa per la terapia cellulare con cellule staminali è l'utilizzo di cellule staminali adulte, poiché sono facilmente reperibili, non sono soggette a restrizioni etiche e possono essere reimpiantate in maniera autologa annullando tutte quelle reazioni immunologiche legate al rigetto. Le ASC tendenzialmente sono tessuto specifiche, sono in grado di auto replicarsi e di differenziare in tipi cellulari del tessuto in cui risiedono. In particolare le cellule staminali mesenchimali (MSC) possiedono diverse caratteristiche che le rendono utilizzabili per la terapia cellulare, infatti non hanno alcun potenziale tumorigenico, sono facilmente reperibili con tecniche poco invasive e inoltre sono una sorgente autologa di cellule prelevabili dallo stesso paziente annullando il rischio di rigetto.

Fra i vari studi di terapia cellulare attualmente in sperimentazione clinica che vedono impiegate le cellule staminali, oltre all'ormai consolidata tecnica del trapianto autologo/allogeneico di cellule staminali ematopoietiche per il trattamento dei disordini linfoproliferativi, vi sono numerosi *trial* per la cura di patologie dermatologiche, come, ad esempio l'epidermolisi bullosa (Mavilio et al., 2006).

### **3.2.1 Promesse e problemi della terapia cellulare**

Nonostante l'utilizzo delle ASC nella terapia cellulare sia potenzialmente un'ottima soluzione per quanto riguarda il riparo tissutale in determinate patologie ad oggi è necessario ancora studiare a fondo alcuni punti critici come per esempio definire il meccanismo d'azione terapeutico; effettuare studi tossicologici ad ampio raggio per aumentare l'effettiva sicurezza delle cellule e caratterizzare per poi standardizzare la preparazione delle cellule utilizzate per la terapia (Timothy O'Brien et al., 2009)

La terapia cellulare ha un potenziale notevole per migliorare i sintomi di diverse malattie neurodegenerative. Essa può basarsi: sulla sostituzione di cellule danneggiate, come potrebbe essere nel caso del Morbo di Parkinson (Lees AJ et al. 2009) e della Malattia di Huntington (Stack EC et al., 2008); sul trapianto di cellule staminali nella zona danneggiata per arricchire l'ambiente, ad esempio di fattori neurotrofici rilasciati (Wilkins et al., 2009), potrebbe basarsi sull'introduzione di una cellula staminale con un gene che codifica un specifico fattore aumentando l'espressione e la secrezione di questi fattori (Rooney et al., 2009); oppure sull'uso delle cellule staminali per indurre neurogenesi. Infatti è stato osservato che le cellule staminali hanno la capacità di arricchire le nicchie delle cellule staminali neurali.

Candidate ideali per terapie cellulari per malattie neurodegenerative sono le cellule staminali mesenchimali. Queste cellule sono già ampiamente utilizzate per diversi trattamenti come per il lupus sistemico eritematoso (Sun L, et al., 2009) per il quale sono attualmente in corso prove cliniche, o per malattie neurodegenerative come l'ALS e sclerosi multipla (Riordan N et al., 2009; Liang J et al., 2009)

Ci sono diversi studi che affermano che le MSC potenzialmente sono in grado di acquisire un fenotipo neurale mediante un processo di trans-differenziamento. Il trans-differenziamento fu proposto per la prima volta da Kopen et al. quando trapiantando MSC nel cervello di un topo videro che le cellule che migravano esprimevano marcatori neuronali. Il differenziamento *in vitro* invece può essere indotto con l'esposizione di queste cellule a particolari citochine come EGF, FGF etc... (Barzilay R et al., 2008). Oltre a poter potenzialmente acquisire un fenotipo neuronale, le MSC sembrano avere anche una certa predisposizione nel poter assumere anche un fenotipo astrocitario, esprimendo un sistema per la conduzione di glutammato e incrementando la secrezione di fattori neurotrofici (Sadan O et al., 2009); per questo motivo sono considerate delle buone candidate per la cura del Morbo di Parkinson.

Un'altra caratteristica delle MSC è nella loro capacità di regolare le cellule immunitarie mediante la secrezione di citochine, infatti sono anche in grado di inibire la proliferazione linfocitaria *in vitro*. (Barzilay R, et al., 2009).

In sintesi questi studi hanno permesso di affermare che le MSC mediante effetti paracrini influenzano indirettamente le altre cellule, sia *in vitro* (Wilkins A, et al.2009) che *in vivo* (Li Y et al.2002). Le MSC sono anche in grado di aumentare e stimolare la neurogenesi migliorando così il meccanismo di riparazione. L'effetto neurogenico è associato alla secrezione di fattori neurotrofici da parte delle cellule trapiantate. In caso di ischemia è stato dimostrato che le MSC non solo promuovono la proliferazioni delle cellule neurali staminali ma anche la loro sopravvivenza e il loro differenziamento.(Alexanian AR et al., 2008).

Inoltre, la tendenza naturale a migrare delle MSC nei siti di lesioni neuronali ha una grande importanza nelle applicazioni cliniche, infatti, potrebbero essere sfruttate come veicoli per agenti anti tumorali in caso di tumori (Loebinger MR et al., 2009).

### **3.2.2 Stato dell'arte della terapia cellulare in modelli patologici**

#### Malattie cardiache

In molti pazienti che hanno subito un infarto miocardico (MI) le funzioni cardiache sono state ripristinate mediante modellamento del ventricolo sinistro con l'applicazione di terapie cellulari. Studiando questi casi clinici si è osservato anche un piccolo miglioramento delle funzioni cardiache. Nonostante i progressi dovuti allo studio delle potenzialità della terapia cellulare nelle malattie cardiovascolari, ancora oggi non sono chiari alcuni parametri abbastanza cruciali, come il tipo di cellula ottimale da utilizzare e il protocollo ottimale da utilizzare per iniettarle. La modesta efficacia dei risultati ottenuti probabilmente è correlata allo scarso numero di cellule trapiantate e allo scarso numero di cellule in grado di impiantarsi all'interno di un tessuto danneggiato *in vivo*. Futuri studi infatti saranno focalizzati su pazienti con zone d'infarto ampie e sulle metodiche per aumentare in numero di cellule che attecchiscono.(Deev RV et al 20011)

#### Malattie ossee

Undale et al (Undale et al.,2009) hanno studiato terapie cellulari per quanto riguarda il riparo dell'osso; in particolare sono stati considerati pazienti affetti da pseudoartrosi (Kadiyala S. et al., 1997), osteogenesi imperfetta (Panaroni C et al. 2009) e ipofosfatasia (Whyte MP, 2007). Contrariamente agli studi sulle patologie cardiovascolari in cui venivano usate popolazioni miste di cellule, in questi studi è stato usato un solo tipo cellulare, le cellule staminali mesenchimali. Le MSC possono essere facilmente espanso in coltura, hanno proprietà immunosoppressive (sopprimono il sistema immunitario dell'ospite modulando la risposta delle cellule T) e non sono

immunogene (perdono l'espressione del co-stimolatore molecolare). Tutti i pazienti coinvolti nello studio dopo circa 20 giorni dall'iniezione cellulare allogenica mostravano un aumento del contenuto minerale osseo rispetto ai valori previsti. Questi miglioramenti sono stati associati a un aumento nella velocità di crescita. Gli autori quindi hanno concluso che il trapianto di midollo osseo allogenico può portare ad attecchimento delle cellule staminali mesenchimali funzionali. Questo studio ha anche dimostrato che cellule staminali mesenchimali trapiantate nel midollo osseo possono migrare nei bambini affetti da OI e poi dar luogo a osteoblasti.

### Malattie muscolari

Le MSC sono in grado di differenziarsi in cellule muscolari se esposte a fattori specifici oppure se messe in co-coltura con cellule muscolari. L'aggiunta di una matrice moderatamente elastica *in vitro* favorisce la formazione del muscolo da parte delle MSC (Engler AJ et al., 2007). In alternativa le MSC possono essere usate come vettore per il gene mancante.

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia progressiva letale associata al cromosoma X causata da una mutazione nel gene della distrofina. Senza distrofina le fibre muscolari sono vulnerabili a danneggiamenti causati anche dalle normali attività quotidiane. Normalmente il muscolo è in grado di ripararsi grazie alla presenza di cellule staminali muscolari del muscolo stesso, le cellule satelliti, ma continui danneggiamenti compromettono questa capacità. La terapia cellulare sembra poter offrire una speranza a pazienti affetti da simili patologie degenerative muscolari, infatti una caratteristica chiave delle MSC è la loro abilità di migrare nella zona danneggiata, quindi una volta trapiantate in pazienti affetti da DMD sono in grado di raggiungere il tessuto muscolare in oggetto.

### Malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da disfunzioni associate alla perdita di cellule neuronali. Le varie patologie possono essere classificate in base alla loro localizzazione e al tipo di cellule coinvolte nella malattia, ad esempio, nel Morbo di Parkinson si ha la perdita della funzionalità di neuroni dopaminergici, invece nella sclerosi multipla si verifica una reazione autoimmune che porta alla demielinizzazione dell'assone con conseguente alterazione della trasmissione sinaptica e riduzione del numero di recettori funzionanti. Il sistema nervoso centrale, a differenza di altri tessuti, ha una limitata capacità di autoripararsi. Le cellule nervose mature mancano della capacità di rigenerarsi, sebbene nel cervello adulto esistano cellule neurali endogene;

tuttavia queste cellule staminali hanno una limitata capacità a generare nuovi neuroni funzionali in risposta a una lesione. Gli avanzamenti nella biologia delle cellule staminali hanno aperto nuove prospettive per la neurogenesi mediante attivazione delle cellule staminali neurali endogene, trapianto di cellule staminali espanse in vitro e della loro progenie neuronale o gliale differenziata. Le cellule staminali embrionali, per la loro capacità di fornire una fonte apparentemente illimitata di tipi cellulari specifici e per la possibilità di manipolazioni di ingegneria genetica, possono diventare una fonte cellulare e un sistema di trasporto biologico in una varietà di malattie neurodegenerative.

### **3.3 La medicina rigenerativa**

La medicina rigenerativa è un campo interdisciplinare di ricerca e applicazioni cliniche focalizzato sulla sostituzione e la rigenerazione di cellule, tessuti e organi per il ripristino di funzioni compromesse, causate da difetti congeniti, malattie, traumi o dall'invecchiamento (Greenwood HL et al., 2006); si pone pertanto come una potenziale alternativa terapeutica ai problemi legati ai trapianti che potrebbe rivoluzionarne modalità e tecniche. Questo settore innovativo di ricerca si è sviluppato sulla base di nuove eccitanti scoperte nel campo della biologia delle cellule staminali, caratterizzate dalla capacità di autorigenerarsi e differenziare in cellule specializzate in risposta ad appropriati segnali.

L'organismo risponde ai diversi danni esterni con una risposta che preserva l'organismo nella sua totalità ma, se necessario, danneggia l'organo colpito (Yannas IV, 2005). La prima soluzione clinica a questo problema fu identificata nel trapianto di organi. Il primo vero trapianto fu eseguito negli Stati Uniti nel 1954 dal il chirurgo Joseph E. Murray che eseguì un trapianto di rene (*ex-vivo*) da donatore consanguineo e geneticamente identico al ricevente (fratelli gemelli omozigoti). L'operazione ebbe successo grazie alla compatibilità del 100% dei soggetti (Papalois et al., 2003). Il grosso problema, ancora molto attuale, fu quello legato al rigetto di origine immunologica, ovvero il rifiuto da parte dell'organismo ospite di tessuti e organi estranei. Non disponendo ancora di farmaci immunosoppressori efficaci, le complicanze sviluppate durante la procedura determinarono l'insuccesso del trapianto.

Dopo i primi esperimenti di trapianti di rene (sempre più numerosi ed efficaci), seguirono nel 1963 a Denver (Colorado) il primo trapianto di fegato (Calne, 2003), a opera di Thomas Starzl e, nello stesso anno, anche il primo trapianto di polmone, eseguito da J.D. Hardy.

Tre anni dopo, nel 1966, il Prof. Lillhei eseguì con successo il primo trapianto di pancreas (Sutherland et al., 2003), ma il vero scalpore venne suscitato l'anno successivo, il 1967, quando Christiaan N. Barnard, chirurgo a Città del Capo nel Sud Africa, eseguì il primo trapianto di cuore (Kroshus T.J. et al., 2003).

Ulteriori passi avanti furono fatti nel 1968 con il trapianto di midollo osseo (McCann SR, 2003). Per la prima volta vennero trapiantate cellule e non organi, in particolare cellule staminali ematopoietiche vennero prelevate dal donatore e infuse nel ricevente.

La consanguineità è fondamentale per l'attecchimento dei trapianti, per cui non era possibile il trapianto di un organo tra persone estranee, che quindi non avevano un patrimonio genetico uguale. Nonostante i progressi, ancora oggi i trapianti sono una procedura terapeutica estremamente delicata, difficile e potenzialmente rischiosa per la vita del paziente a causa di diverse complicazioni che possono insorgere, quali rigetto nel caso dei trapianti di organi e *Graft Versus Host Disease* nel caso del trapianto di midollo osseo.

Il rigetto è la risposta biologica dell'organismo al trapianto di un organo estraneo. Esistono diverse forme di rigetto e si distinguono in base alla cronologia di comparsa e alla gravità:

a) *Rigetto iperacuto*: si presenta a poche ore dal trapianto ed è espressione di una precedente immunizzazione del ricevente nei confronti dell'organo trapiantato: l'unico trattamento possibile è quello di effettuare nuovamente il trapianto.

b) *Rigetto acuto*: è dovuto ad una eccessiva attivazione dei linfociti B che provoca il rilascio di anticorpi IgM ed IgG di produzione plasmacellulare; è classificato di tipo cellulare, se si presenta da pochi giorni fino ad un anno dal trapianto e se è provocato da una reazione immunitaria cellulo-mediata T-dipendente; o di tipo umorale se si presenta entro i primi 15 giorni dal trapianto.

c) *Rigetto cronico*: si presenta a partire dal sesto mese dopo trapianto e la sua incidenza aumenta col passare del tempo. Il rigetto cronico è responsabile del 36% di morte durante il primo anno dopo il trapianto ed è la causa del 60% dei trapianti secondari.

In seguito al trapianto di midollo osseo, è possibile che si verifichi una malattia infiammatoria, la GVHD (*Graft-Versus-Host Disease*), si tratta di un attacco da parte delle cellule del sistema immunitario del midollo osseo trapiantato contro i tessuti dell'organismo ricevente.

Clinicamente, la GVHD si distingue nella forma acuta e nella forma cronica: la forma acuta, o fulminante, si osserva nei primi 100 giorni dalla data del trapianto, si manifesta con la morte delle cellule epiteliali di cute, fegato e tratto gastrointestinale con sintomi correlati come diarrea, emorragia, ittero ed eruzioni cutanee. Una eccessiva



estensione della morte cellulare può diventare mortale per il paziente trapiantato. (Levine JE. et al 2012) La forma cronica, invece, decorre dopo i 100 giorni dalla data del trapianto, è caratterizzata da fibrosi e atrofia degli stessi organi colpiti anche dalla forma acuta, ma questa volta senza una evidente morte cellulare. Può diventare fatale se colpisce i polmoni causando obliterazione delle vie aeree. Si ipotizza che la forma cronica sia la risposta fibrotica dell'organismo ai danni causati dalla forma acuta, ma potrebbe anche rappresentare una risposta all'ischemia causata da danni vascolari. (Blazar B. et al. 2012) Ad oggi il campo della medicina rigenerativa è in continuo sviluppo oltre che in un continuo miglioramento per risolvere tutti quei problemi che portano ad applicazioni ancora troppo problematiche.

### **3.4 L' Ingegneria Tissutale**

L'ingegneria tissutale, è una branca della medicina rigenerativa nata per fornire un'alternativa alla rigenerazione di tessuti e organi persi o lesionati, evitando le complicazioni associate alle tradizionali procedure terapeutiche. (Atala A, 2007).

L'ingegneria tissutale si propone di riparare o rigenerare i tessuti danneggiati utilizzando dei costrutti ingegnerizzati, chirurgicamente impiantabili in grado di sostituire funzionalmente la porzione lesa e di integrarsi, alla fine del processo, con il tessuto ospite. L'obiettivo finale è pertanto la costituzione di un neo-tessuto derivato dalla combinazione di cellule e dell'utilizzo di "fattori bioattivi", come per esempio fattori di crescita, citochine, fattori chimici, cellule e materiali innovativi quali biomateriali e idrogeli.

L'ingegneria tissutale rappresenta un'alternativa alle tradizionali metodiche di trapianti di organi e tessuti portando ad una riduzione di tutti quei rischi correlati a questo tipo di operazioni, come il rigetto in seguito a reazioni di tipo immunologico.

Esistono due tipi di ingegneria tissutale:

- *ex-vivo*: prevede l'utilizzo di cellule che devono poter essere sottoposte a proliferazione, differenziate e seguire un adeguato processo di maturazione su opportune strutture (*scaffolds*) su cui vanno poi a svilupparsi, fino a formare un tessuto funzionante, attraverso la trasmissione di segnali cellula-cellula, la produzione di biomolecole e la formazione della matrice extracellulare (ECM).
- *in vivo* o *in situ*: quando invece è lo *scaffold*, opportunamente trattato, a dover richiamare e reclutare le cellule progenitrici *in vivo*, direttamente nel sito della lesione, in seguito all'eventuale somministrazione di fattori di crescita che incrementano la

proliferazione cellulare, l'espansione ed il loro differenziamento. La maturazione del neo-tessuto avviene quindi direttamente *in situ* (Arosarena O, 2005).

Oggetto di questo studio sarà la caratterizzazione dello sviluppo e della crescita di MSC piastrate su particolari scaffold di Titanio biocompatibile e opportunamente trattato per un potenziale utilizzo in ingegneria tissutale. Inoltre saranno caratterizzate anche MSC incapsulate all'interno di un particolare idrogelo studiato per facilitare l'iniezione cellulare *in vivo* per una migliore ricostruzione tissutale di una parte lesa.

L'alterazione *in vivo* ha lo scopo di aumentare o migliorare il processo naturale di riparazione cellulare; i maggiori campi di applicazione riguardano la rigenerazione di nervi periferici, pelle e cartilagine.

A seconda delle necessità e campi di applicazione, gli *scaffold* possono essere biodegradabili, con possibilità cioè di scomposizione in elementi semplici e rientro nel ciclo naturale, o biostabili con possibilità cioè di inserimento *in vivo*.

### **3.4.1 Speranze e Problemi dell'ingegneria tissutale**

Le tecniche di ingegneria tissutale prevedono una continua interazione delle cellule con particolari fattori di crescita e determinati biomateriali e se poste in condizioni di coltura dinamica come per esempio in bioreattori sono in grado di generare neo-tessuti bioingegnerizzati. La fonte cellulare più adeguata per questo tipo di processo, e quindi ideale per applicazioni in ingegneria tissutale, non deve essere immunoreattiva in modo da evitare un eventuale rigetto e deve avere un tasso di proliferazione controllato che permetta di escludere una eventuale tumorigenicità; devono essere disponibili in elevate quantità, possedere o essere in grado di acquisire un pattern di espressione proteica simile a quello del tessuto da rigenerare e infine devono avere un'adeguata capacità di integrazione con i tessuti circostanti. Inoltre i tessuti bioingegnerizzati devono possedere adeguate caratteristiche di meccanica funzionale, durata, resistenza e flessibilità.

Tutti questi presupposti, uniti ad altre numerose limitazioni come per esempio l'età del paziente e la scarsità delle cellule ottenute dal prelievo bioptico, che di conseguenza rende l'efficienza di espansione *in vitro* assai scarsa, rendono molto difficile una immediata applicabilità clinica.

Un'alternativa all'impiego di cellule differenziate autologhe potrebbe essere l'utilizzo di cellule ottenute da donatori animali (xenotrapianto), che sarebbero in grado di risolvere il problema della scarsa resa cellulare, tuttavia, l'immunogenicità di queste cellule, la possibilità di trasmissione di agenti patogeni e i problemi etici e sociali correlati hanno

bruscamente arrestato l'entusiasmo e gli sforzi della ricerca verso questa direzione (Heath CA et al., 2000).

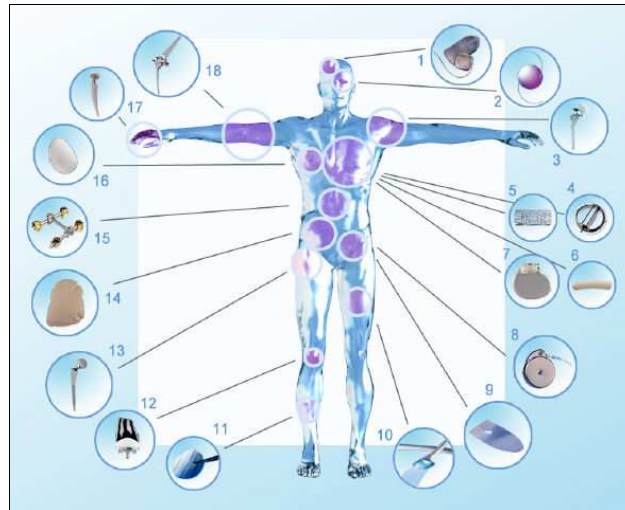
La possibilità di utilizzare cellule staminali a scopo rigenerativo è una concreta e valida soluzione ai problemi illustrati, in particolare le cellule staminali mesenchimali sono ottime candidate a svolgere questo ruolo poiché l'utilizzo di queste cellule non comporterebbe problematiche di tipo etico, che invece rappresentano un ostacolo per l'uso delle cellule staminali embrionali, e inoltre sarebbe possibile utilizzarle per auto-trapianti in tal modo invece si bypasserebbero tutte quelle problematiche legate al rigetto in seguito a reazioni di tipo immunologico.

### **3.4.2 Biomateriali**

Secondo la prima definizione ufficiale, un biomateriale è "una qualsiasi sostanza (diversa da un farmaco), o una combinazione di sostanze, di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata, per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema per trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo" (*Biomaterial Consensus Conference, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 1982*). Si tratta di una definizione molto generale, poi modificata in "un biomateriale è un materiale non vivente usato in un dispositivo biomedicale che interagisce con i sistemi biologici" (*First Consensus Conference on definitions in Biomaterials, Chester, UK, 1986*). Tale definizione non esamina la risposta dell'organismo ospite, ma sottolinea la presenza di interazioni tra biomateriale ed ambiente biologico. Infatti ogni materiale impiantato innesca una cascata di reazioni, che costituiscono la risposta dell'ospite e che possono eventualmente portare all'integrazione dell'impianto nell'organismo (Wataha J.C. et al., 2001).

Attualmente si considera biomateriale "un materiale che si intende interfacciare con i sistemi biologici allo scopo di valutare, monitorare, trattare, accrescere, sostituire o facilitare la rigenerazione di ogni tessuto, organo o funzione del corpo umano (ESB, *Satellite Consensus Conference, Sorrento, 2005*) (Tanzi M.C., 2005-2006).

I principali campi di applicazione dei biomateriali sono: sostituzione di parti mancanti o malate (protesi), assistenza nella guarigione (catetere), ripristino delle capacità funzionali (tutori esterni per lesioni articolari), correzione delle anomalie funzionali (tutore esterno per la cura della scoliosi), correzioni di anomalie estetiche (protesi mammarie) ed infine ausilio per diagnosi e terapie (calco dentale). Uno spettro di applicazioni sul corpo umano è osservabile dalla Figura 10:



**Figura 10:** Biomateriali: applicazioni sul corpo umano

In base all'interazione tra l'organismo e i biomateriali si può avere un'ulteriore classificazione di quest'ultimi come: biostabili, biodegradabili e bioattivi.

I materiali *biostabili* trovano applicazione nella progettazione e realizzazione di protesi permanenti, essi devono rimanere nel corpo del paziente il maggior tempo possibile e devono quindi preservare le loro proprietà e caratteristiche di funzionamento: fanno parte di questa categoria i materiali metallici, quelli ceramici, alcuni polimeri ed alcuni compositi.

I materiali *biodegradabili* hanno applicazione quando il tessuto ha sufficienti capacità di riparazione e necessita solamente di una sostituzione temporanea della parte lesa o di una guida per la crescita tissutale. Tali composti vengono degradati dal corpo durante la cicatrizzazione senza rilascio di prodotti tossici o nocivi.

I materiali *bioattivi* sono quelli in grado di stimolare, attraverso reazioni chimiche con l'ambiente circostante, la rigenerazione dei tessuti del sito dell'impianto e fanno parte di questo gruppo i biovetri (ossidi di silicio, sodio, calcio e fosforo) che, a contatto con l'ambiente fisiologico, si ricoprono di uno strato di idrossiapatite naturale (uno dei componenti principali delle ossa) garantendo ad esempio un'ottimale interazione con i tessuti ossei, i polimeri in cui vengono incorporate proteine o fattori di crescita ed infine le ceramiche di fosfato di calcio.

Un'ultima caratteristica fondamentale dei biomateriali è la compatibilità morfologica, funzionale e biologica. La compatibilità morfologica è legata alla forma ed alla massa della protesi da impiantare; la compatibilità funzionale fa riferimento al ruolo svolto dal dispositivo impiantato ed infine la compatibilità biologica è definita come la capacità di

un materiale di indurre, in un sistema vivente, una reazione favorevole alla sua presenza permettendone l'integrazione con l'organismo.

### **3.4.3 Scaffolds**

Gli *scaffold* provvedono all'architettura in cui matrice extracellulare, cellula-cellula e fattori di crescita interagendo generano cavità rigenerative. Per quanto riguarda la struttura, sono di fondamentale importanza l'elevata porosità e le cinetiche di rilascio di fattori di crescita durante la rigenerazione del tessuto. I materiali utilizzati devono essere stabili, non causare eccessive risposte immunitarie, possedere elevata biocompatibilità, scarsa tossicità ed erodibilità. D'altra parte devono però possedere appropriate caratteristiche meccaniche in grado di generare un'elevata area superficiale. In generale possono essere naturali o sintetici.

Nell'ingegneria dei tessuti uno *scaffold* deve rispondere a precisi requisiti:

- proprietà meccaniche uguali o paragonabili a quelle del tessuto nel sito di impiantazione;
- elevata biocompatibilità;
- mimetismo nei confronti della matrice extracellulare (ECM) e delle sostanze endogene che circondano le cellule;
- aderenza interfacciale riferita alla superficie dello *scaffold* visto che deve supportare l'adesione cellulare e la proliferazione;
- rapporto di degrado: lo spazio inizialmente occupato dallo *scaffold* stesso deve essere sostituito dal tessuto in crescita.

Se consideriamo invece il rilascio di principi attivi deve soddisfare le seguenti specifiche:

- capacità di caricamento;
- omogenea distribuzione del farmaco;
- affinità legante;
- cinetica di rilascio a profilo controllato;
- stabilità chimica.

### **3.4.4 Titanio come biomateriale: applicazioni in ambito biomedicale**

Il basso peso, la singolare resistenza alla corrosione possedute dal titanio e dalle leghe di titanio, sono alla base di un'ampia e diversificata gamma di applicazioni di successo che richiedono elevati livelli di prestazioni affidabili nella chirurgia e nella medicina, così come anche nell'industria aerospaziale, automobilistica, chimica, della generazione di corrente, estrattiva di gas e petrolio, sportiva e in altri maggiori campi applicativi.

Leggero, resistente e completamente bio-compatibile, il titanio è uno dei pochi materiali che risponde alle esigenze di sostituzione per impianto nel corpo umano.

Il titanio è completamente inerte e immune alla corrosione da parte dei fluidi corporei e dei tessuti, e per questo è completamente bio-compatibile; infatti la corrosione degli impianti metallici da parte dei fluidi corporei, dà luogo al rilascio di ioni metallici non richiesti, con possibile interferenza con le funzioni vitali.

La scelta del titanio per gli impianti è determinata da una serie di caratteristiche favorevoli che includono l'essere immune a corrosione, la bio-compatibilità, la resistenza, il basso modulo, la bassa densità e la capacità di congiungersi con il tessuto osseo e con altri tessuti (osteointegrazione). Le proprietà meccaniche e fisiche delle leghe di titanio si combinano a creare degli impianti che hanno un'alta tolleranza al danno. L'anatomia del corpo umano limita naturalmente la forma e i volumi possibili per gli impianti. Il basso modulo delle leghe di titanio se confrontate con l'acciaio, sono un fattore positivo nella riduzione del riassorbimento osseo. Due ulteriori parametri definiscono l'utilità della lega impiantabile, la sensibilità agli intagli, - il rapporto di resistenza alla trazione in condizioni di intaglio rispetto a quelle di non intaglio - e la resistenza alla propagazione di incrinature, o resistenza alla frattura. Il titanio dà ottimi risultati in entrambi i casi.

### **3.4.5 Idrogeli e matrici iniettabili per la crescita cellulare**

Per essere utilizzato in ingegneria dei tessuti un idrogelo deve funzionare da materiale di riempimento per gli spazi intratissutali e deve essere efficace come mezzo di rilascio. L' iniettabilità è una caratteristica che elimina la necessità di intervenire chirurgicamente garantendo una minor invasività e riducendo le complicazioni post operatorie per il paziente. Sfruttando questa proprietà si possono risolvere problemi quali l'adesione di cellule e il trasporto di molecole bioattive tramite una miscelazione precedente all'iniezione stessa. Le specifiche per un idrogelo sono in genere

dipendenti dall'utilizzo, ma ci sono delle proprietà generali che devono essere considerate sempre nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, tra queste c'è la biocompatibilità che si applica non solo al materiale ma anche a possibili composti derivati e ai prodotti di degrado, nel caso di materiali biodegradabili. Dato il loro utilizzo, prevalentemente come *carrier* per cellule, è molto importante tenere sotto controllo il processo di solidificazione, la porosità (visto che spazi vuoti nella struttura stessa sono necessari per garantire la crescita del tessuto) e la diffusione di nutrienti all'interno e rifiuti all'esterno. Notevole rilievo hanno anche la grandezza dei pori e l'interconnessione. Idealmente un idrogelo deve garantire e promuovere la proliferazione cellulare, la crescita e la differenziazione del tessuto: queste azioni possono essere accentuate con l'aggiunta di fattori di crescita e tramite funzionalizzazione con proteine o sequenze di peptidi specifici. Oltre a questo tipo di studio è necessario caratterizzare gli idrogeli anche dal punto di vista fisico considerando le proprietà meccaniche e la biodegradabilità per garantire l'integrità del tessuto specialmente nei primi stadi della crescita dello stesso. Il degrado è necessario che avvenga in un intervallo tale da garantire la formazione di nuovo tessuto che vada a sostituire il precedente: un meccanismo di degrado accelerato viene richiesto nel rilascio di agenti bioattivi e nella formazione o deposito di matrice extracellulare, per le altre applicazioni ne serve invece uno più lento in modo da mantenere proprietà meccaniche e strutturali a valori elevati per periodi più lunghi.

Caratteristica primaria per i materiali iniettabili è che non devono essere citotossici e ogni reazione di tipo esotermico che può raggiungere temperature capaci di causare necrosi termica dei tessuti circostanti deve essere monitorata e controllata. La ricerca effettuata in letteratura evidenzia due classi principali di riferimento per idrogeli iniettabili legati all'utilizzo nell'ingegneria dei tessuti:

1. polimerizzati e interconnessi *in situ* (tramite fotoiniziazione, termoiniziazione e iniziazione ionica);
2. sistemi termo-gel

In generale la categoria sopracitata dei "polimerizzati *in situ*" viene combinata con microparticelle con risultante aumento della porosità e della facilità di inserimento di principi attivi. Ad esempio questo avviene con l'aggiunta di microsfele di PLGA poly(lactic-co-glycolic acid), con conseguente formazione di composto utile nella iniettabilità.

L'interconnessione aumenta alcune proprietà meccaniche dell' idrogelo, qualità desiderabile nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti. Nel meccanismo di iniziazione con

attivazione termica un iniziatore crea radicali liberi reagendo con gruppi funzionali (spesso gruppi insaturi) dei monomeri o macromeri; questo sistema di iniziazione ha il vantaggio di poter essere attivato cambiando la temperatura e può essere utilizzato anche in aree con limitata penetrazione della luce. Nel caso di presenza di fotoiniziatori per garantire la biocompatibilità vengono testate luci di varie lunghezze d'onda ed oltre a questo parametro devono essere controllate anche la scelta e la concentrazione del fotoiniziatore, l'intensità della luce e la reattività delle interconnessioni. Un altro gruppo di idrogeli polimerizzati *in situ* utilizza interconnessioni di tipo ionico come innesco della gelificazione: ad esempio gli alginati sono derivati naturali dei polisaccaridi e le loro soluzioni acquose garantiscono una gelazione di tipo reversibile con interazioni con cationi bivalenti del tipo  $Ca^{2+}$  ed il loro utilizzo più comune è come matrice extracellulare. Attraverso il controllo delle concentrazioni di calcio e alginato, oltre a peso molecolare e composizione, si possono sintetizzare idrogeli in grado di supportare anche la crescita *in vitro* delle cellule. I sistemi a base di termogel, invece non richiedono stimoli da agenti chimici ulteriori poiché la loro gelificazione può essere programmata per avvenire ad una determinata temperatura e pertanto si può ottenere direttamente all'interno del corpo.

### **3.4.6 Prospettive future**

L'ingegneria dei tessuti ha fatto un rapido balzo in avanti negli ultimi anni e ora ne possiamo vedere i benefici in ambito chirurgico: ad esempio il trapianto di pelle è stata la prima terapia ad essere stata approvata come protocollo standard per pazienti umani. I ricercatori hanno raggiunto livelli di conoscenza molto elevata anche per quanto riguarda l'ingegneria tissutale legata a ossa, vasi, nervi, pancreas e reni (Vacanti e Langer 1999). Uno dei più grandi cambiamenti registrati in questo campo è dovuto al bisogno di avere strutture vascolari funzionali per tessuti più complessi e per organi. La vascolarizzazione dei costrutti artificiali risulta tuttora un problema molto complesso e non completamente risolto; fattori di crescita sono stati aggiunti per promuovere la vascolarizzazione attraverso l'ospite: sono state utilizzate delle co-culture ed è stata progettata una vascolarizzazione preliminare della struttura per agire come uno *scaffold* incline al trasporto di farmaci per formazione di tessuti complessi. Il potenziale delle cellule staminali rende questo approccio possibile ed ultimamente il nuovo obiettivo riguarda nuovi tessuti per trapianti. Queste nuove scoperte si affiancano a cambiamenti e miglioramenti necessari anche nell'ambito già discusso dei biomateriali. Gli studi futuri riguarderanno sicuramente cellule staminali ed altri tipi di cellule che potrebbero essere utilizzate in sistemi di coltura cellulare e in tessuto-reattori per sintetizzare prodotti in grado di essere utilizzati in medicina. Da una



prospettiva biologica: infiammazioni, risposta immunitaria, cicatrizzazione delle ferite sono ottimi campi su cui ricercare per poter effettuare miglioramenti.

In definitiva il futuro dei biomateriali è fortemente dipendente dalle conoscenze delle interazioni di cellule, molecole e tessuti con i materiali stessi: l'attenzione si deve focalizzare sullo studio e comprensione dei meccanismi di interazione tra nuove matrici e l'ambiente *in vivo* per consentire ulteriori progressi da un punto di vista terapeutico.

*SCOPO*  
*DELL'ELABORATO*

La cura delle malattie neurodegenerative rappresenta una delle principali sfide della medicina contemporanea. Poiché negli ultimi anni l'utilizzo di cellule staminali adulte, ed in particolare delle cellule staminali mesenchimali (MSC), sta destando notevole interesse all'interno della comunità scientifica come un valido sistema per terapie cellulari mirate al ripristino delle funzioni degenerate, si è sviluppato un progetto di ricerca finalizzato a sviluppare protocolli utili ad un futuro impiego clinico delle MSC. Lo studio consiste innanzitutto nella caratterizzazione delle cellule di partenza e nell'identificazione di un mezzo stabile, riproducibile e che rispetti le "buone norme" della GMP, in grado di indurre una corretta proliferazione alle MSC *in vitro* tale per cui esse non perdano il loro potenziale di staminalità; la seconda fase dello studio invece prevede la messa a punto di un protocollo che sia in grado di indurre il corretto transdifferenziamento delle MSC in cellule del sistema nervoso centrale; infine la terza parte dello studio prevede lo studio di fattibilità di un sistema *drug carrier* che permetta l'iniezione di queste cellule nella maniera più diretta ed efficace possibile.

Poiché è stato già dimostrato, mediante immunocistochemica e citometria a flusso, che vi è una forte similarità tra le MSC derivanti dal midollo osseo e quelle prelevate dal tessuto adiposo (Gimble J. et al., 2003) abbiamo deciso di utilizzare quelle isolate dal tessuto adiposo poiché la loro estrazione viene effettuata mediante un prelievo non invasivo, e poiché da un prelievo è possibile estrarre una quantità di cellule clinicamente rilevante da poter eventualmente sottoporre a differenziamento.

Lo studio è stato effettuato mediante caratterizzazione funzionale di diversi mezzi di coltura, abbiamo iniziato apportando modifiche mirate a mezzi già noti in letteratura per poi svilupparne uno proprietario (NZ4), che fosse in grado di indurre modificazioni funzionali delle MSC verso un fenotipo neuronale.

L'obiettivo è quello di completare la caratterizzazione *in vitro* del protocollo (attualmente in fase di valutazione di deposito brevettuale), in modo da poter poi procedere ad uno studio *in vivo* su uno specifico modello animale (ad esempio modello di ischemia).

***MATERIALI  
E  
METODI***

## **5.1 Estrazione delle MSC dal tessuto adiposo di ratto (rASC)**

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono state selezionate da tessuto adiposo prelevato da ratto femmina giovane di 4-6 mesi Sprague- Dawley.

La prima parte del procedimento può essere condotta anche in un ambiente non sterile e consiste nel sacrificare l'animale e rimuovere il tessuto adiposo dalle zone perirenale e inguinale evitando di prelevare dei vasi sanguigni presenti nel tessuto asportato. Successivamente, utilizzando strumenti sterili e sotto cappa a flusso laminare, si esegue una frammentazione meccanica del tessuto stesso che viene immerso in PBS (*Phosphate Buffered Saline*) contenente una concentrazione di antibiotici Penicillina e Streptomicina del 3%. Il tessuto frammentato viene in seguito lavato con PBS e centrifugato a 1200 g per 2 minuti e al termine dell'ultimo lavaggio si aspira il liquido e si valuta la quantità di tessuto adiposo che viene successivamente digerito enzimaticamente con 0.075% Collagenasi I; (p/v) a 37°C per 45 minuti in bagnetto termostato a velocità massima di agitazione. L'attività della Collagenasi I viene neutralizzata con terreno completo composto da *α-MEM* (Cambrex) addizionato del 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, Sigma), L-glutammina (Sigma) 2 mM, streptomicina 100 µg/ml, penicillina 100 U/ml e fungizone (Invitrogen) 250 µg/ml. Il tessuto adiposo digerito viene centrifugato a 260 g per 10 minuti e le MSC si depositano sul fondo della provetta (pellet) mentre la fase bianca superiore è costituita da tessuto adiposo non digerito. Il pellet viene risospeso in terreno completo e filtrato mediante una garza sterile in modo da eliminare gli eventuali residui di tessuto non digerito. Si effettua quindi un' ultima centrifugazione a 350 g per 4 minuti, si risospende il pellet e dopo aver contato le cellule si piastrano ad una densità predefinita di  $1 \times 10^5$  cellule per  $\text{cm}^2$ . A 2 giorni dall'isolamento, dopo aver verificato l'effettiva adesione delle cellule alla piastra, si effettuano 2 o 3 lavaggi con PBS per eliminare tutti i residui di globuli rossi e si effettua un cambio di terreno di coltura. (Kingham P.J. et al., 2007).

### **5.1.1 Mantenimento in coltura delle MSC**

Le cellule sono mantenute in coltura in un atmosfera umidificata ad una temperatura costante di 37°C in atmosfera umidificata, e con il 5% di CO<sub>2</sub> ed il terreno viene sostituito dopo 2 giorni.

Il mezzo di coltura completo è composto da *α-MEM* (Cambrex) addizionato del 10% (v/v) di siero fetale bovino, 2 mM L-glutammina, 100 µg/ml streptomicina, 100 U/ml penicillina e 250 µg/ml fungizone (Invitrogen).

Le cellule vengono poi lasciate in coltura per 7 giorni. Durante tale periodo, le MSC aderiscono sulla superficie della fiasca e quando raggiungono circa il 70% di confluenza subiscono un passaggio di tripsinizzazione (per evitare che crescano su più strati) e vengono suddivise in tre fiasche (passaggio 1); e così via il passaggio di tripsinizzazione viene effettuato ogni volta che le cellule raggiungono la confluenza.

L'aumento del numero di passaggi *in vitro* permette sia di ottenere colture più pure, eliminando le contaminazioni da parte delle componenti del sangue, sia di espandere la riserva di cellule.

## **5.2 Estrazione degli astrociti corticali e loro mantenimento in coltura**

Gli astrociti corticali vengono isolati dalla corteccia cerebrale di ratti neonati di 2 giorni (P2) in accordo con il metodo descritto da Booher e Sensenbrenner (1972), successivamente modificato da Kimelberg et al. (1978). Una volta sacrificati gli animali mediante recisione della testa, vengono estratti i cervelli e mantenuti nella soluzione fisiologica HBSS [(Hank's Balanced Salt Solution), soluzione salina fisiologica senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , contenente HEPES 10mM, una miscela degli antibiotici streptomina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e penicillina 100 U/ml (Gibco)] fredda. Mediante l'ausilio di un microscopio ottico e con un bisturi vengono tagliati i cervelli, in modo da eliminare il cervelletto e separare i due emisferi. Si prosegue poi alla fase di asportazione delle meningi ed all'isolamento delle corteccie cerebrali che poi vengono triturate con una lametta. Il materiale ottenuto viene incubato a 37°C per 15 min in HBSS contenente DNAsi (0.001% p/v) e tripsina (0.25% p/v) per digerire il tessuto. Se il tessuto non è completamente digerito questa operazione viene ripetuta due volte. Vengono recuperati i due soprannatanti e, previa inattivazione della tripsina con del siero, il tutto viene filtrato con una membrana di nylon con pori di 72  $\mu\text{m}$  di diametro, per rimuovere il tessuto rimasto eventualmente indissociato. La sospensione contenente le cellule, viene centrifugata per 10 min a 800 rpm a temperatura ambiente ed il pellet viene risospeso in *GLIAL MEDIUM* [Minimum Essenzial Medium (MEM, Gibco), 20% (v/v) di siero di vitello (FCS, Invitrogen), 0.6% di glucosio (p/v), e una miscela di antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 U/ml)].

Le cellule vengono dissociate meccanicamente mediante pipette pasteur di vetro e piastrate in fiasche sterili; quindi vengono mantenute in atmosfera umidificata, alla temperatura costante di 37°C e con il 5% di  $\text{CO}_2$  fino al raggiungimento del 60-70% della confluenza, che di norma si ottiene in una decina di giorni. Tali cellule richiedono il cambio del terreno, almeno una volta alla settimana.

### **5.2.1 Colture di microglia primaria**

Per ottenere la microglia primaria è necessario isolarla dalle colture di astrociti corticali. La microglia si presenta adesa sulla sommità dello strato di astrociti e per rimuoverla è necessario sottoporre le colture ad agitazione orbitale meccanica (orbital shaker) a temperatura ambiente per 30 minuti. La variazione del pH conseguente a questa condizione insieme allo stress meccanico causa il distacco della microglia che può quindi essere raccolta nel surnatante di coltura. La microglia viene pellettata centrifugando il terreno a 800 g per 10 minuti e risospesa in un mezzo di coltura contenente metà terreno gliale condizionato dagli astrociti e metà terreno gliale fresco.

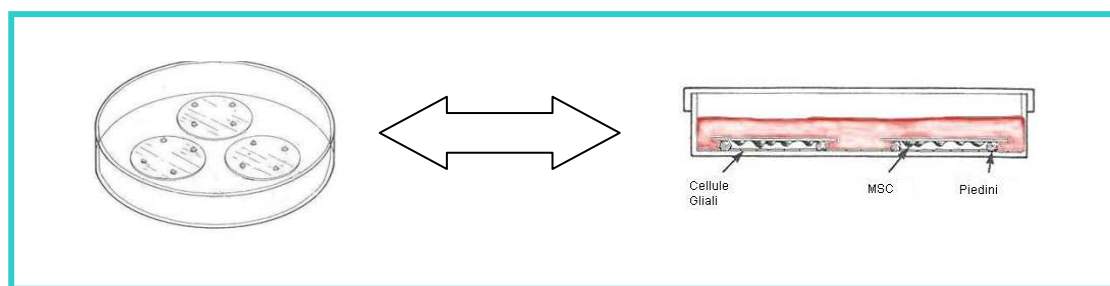
### **5.3 Colture di neuroni corticali e ippocampali**

Sono state utilizzate colture primarie di neuroni corticali e ippocampali di topo ottenuti da embrioni al diciottesimo giorno di gestazione (E18). Le colture primarie sono state preparate secondo il metodo descritto da Banker e Cowan (1977) e Bartlett e Bunker (1984). Dopo aver sacrificato gli animali, sono stati estratti i cervelli e sono stati dissezionati gli emisferi cerebrali. Si è proceduto quindi all'asportazione delle meningi e, successivamente, alla separazione degli ippocampi dalle cortecce. Sono stati sottoposti a due lavaggi in una soluzione di sali bilanciati di Hanks, HBSS (Invitrogen), a 4°C. In seguito, le cortecce e gli ippocampi isolati sono stati sottoposti a digestione con DNAsi 0,05mg/ml (solo per le cortecce) e 0,25% tripsina in HBSS per 15 minuti a 37°C. Cortecce ed ippocampi sono stati poi lavati per 3 volte (lavaggi da 5 minuti) e dissociati meccanicamente in HBSS mediante una pipetta Pasteur sterilizzata a fuoco. Le cellule dissociate sono state piastrate su vetrini coprioggetto precedentemente trattati con poli-L-lisina, in terreno di coltura Neurobasal (Invitrogen) supplementato di B27 (Brewer *et al.*, 1993); i neuroni corticali sono stati quindi piastrati a densità di 520000 cellule/petri, mentre per i neuroni ippocampali, ciascuna coppia di ippocampi è stata piastrata in una petri contenente due vetrini, pari ad una densità di circa 350000 cellule/petri. Le colture neuronali sono state mantenute in incubatore a 37°C in presenza di CO<sub>2</sub> al 5%. Queste cellule hanno richiesto un cambio di mezzo di nutrimento 3 giorni dopo la piastratura.

## 5.4 Le co-culture cellulari

Il termine co-cultura indica un sistema in cui due tipi cellulari differenti condividono lo stesso terreno di crescita. I sistemi di co-cultura “a sandwich” sono stati allestiti in base a quanto descritto da Banker e Cowan (1977) e da Bartlett e Banker (1984a) nei loro rispettivi lavori e in taluni casi parzialmente modificati. In questo caso, nelle co-culture i due tipi cellulari non si sono trovati a diretto contatto poiché i piedini di paraffina fungono da spaziatori. Con questo metodo, le cellule quindi, condividono lo stesso terreno di coltura, pur restando fisicamente separate, e la comunicazione è assicurata esclusivamente dall'eventuale rilascio nel terreno di sostanze diffusibili.

Tutti i tipi cellulari sono stati mantenuti a 37° C in atmosfera umidificata, con 5% di CO<sub>2</sub>.



**Figura 12:** Schema rappresentativo di una co-cultura “a sandwich” (Banker et al., 1977)

## 5.5 Differenziamento Cellulare

Le MSC sono state indotte a differenziare verso la linea osteogenica utilizzando uno specifico mezzo di coltura differenziativo la cui formulazione è stata ricavata dalla letteratura (Ioana A et al., 2006; Qu C et al., 2007; Tholpady SS et al., 2003). Questo medium contiene diverse concentrazioni di supplementi che, se opportunamente combinati, sono in grado di stimolare il differenziamento cellulare. Il differenziamento verso la linea osteogenica è stato condotto in monostrato seminando le cellule ad una densità di  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup>. Le cellule sono state mantenute in coltura (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) per diversi tempi, cambiando il medium ogni 2-3 giorni. Ai tempi stabiliti, le cellule in differenziamento sono state fotografate per documentare la modificazione morfologica, e quindi raccolte e utilizzate per l'allestimento dei test programmati.

Il mezzo di coltura per le cellule di controllo è composto da: α-MEM, 10% FBS, 100 U/ml Penicillina, 100 µg/ml Streptomicina, 2 mM Glutamina; mentre il mezzo di coltura per indurre alle MSC il differenziamento osteogenico è composto da: α-MEM, 10%



FBS, 100 U/ml Penicillina, 100 µg/ml Streptomina, 2 mM, 0.15 mM Ascorbato-2-P, 0.01 µM Desametasone (10<sup>-8</sup>), 10 mM β-glicerofosfato, 10 nM Colecalciferolo

## 5.6 Dosaggio Proteico

Le cellule sono state lisate in condizioni non denaturanti utilizzando come tampone di lisi il detergente Triton X-100 allo 0,1% (T8787, Sigma-Aldrich) in H<sub>2</sub>O deionizzata al fine di favorire lo shock osmotico, la lisi cellulare e non alterare le proprietà biochimiche della fosfatasi alcalina che dovrebbe essere dosata. Per la valutazione della fosfatasi alcalina, le cellule sono state piastrate in multiwell da 12 alla densità di 3 - 4X10<sup>4</sup> cellule e mantenute in coltura per un periodo di tempo che varia dai 7 ai 21 giorni. Al termine dell'esperimento, le cellule sono state lavate con PBS e successivamente è stato aggiunto il buffer di lisi (60 µl per pozzetto). Utilizzando uno *scraper*, le cellule sono state staccate e raccolte in tubo da 1,5 ml. La lisi è stata effettuata ponendo le cellule in ghiaccio per 30 minuti e vortexando ogni 10 minuti circa. Al termine dell'incubazione sono stati effettuati 3 cicli rapidi di congelamento/scongelo con ghiaccio secco e un bagnetto pre-riscaldato a 37°C per favorire ulteriormente la rottura della membrana cellulare. Infine i campioni sono stati centrifugati a 14000 g per 15 minuti (a 4°C) e i supernatanti trasferiti in provette nuove e congelati a -20°C fino al loro utilizzo.

La concentrazione degli estratti cellulari grezzi è stata determinata mediante dosaggio proteico con il "BCATM Protein Assay Kit" (23227, Pierce – Rockford, IL, USA); questo saggio colorimetrico sfrutta la capacità del sale sodico dell'acido bicinonico (BCA) di complessarsi con il Cu<sup>1+</sup> presente in soluzione e cambiare quindi colore in risposta a crescenti concentrazioni di proteine. La presenza in soluzione del Cu<sup>1+</sup> è infatti dovuta alla riduzione del Cu<sup>2+</sup> operata da alcuni residui amminoacidici in ambiente alcalino.

La rilevazione del saggio è stata effettuata tramite la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 550-570 nm.

In ogni pozzetto sono stati aliquotati 3 µl di lisato cellulare (ogni campione dosato in duplicato per calcolare una variabilità statistica) ai quali sono stati aggiunti 200 µl di soluzione substrato ottenuta mescolando i due reagenti (CuSO<sub>4</sub> e un tampone alcalino contenente l'acido bicinonico) secondo le specifiche indicate dal kit. La piastra è stata lasciata in incubazione a 37°C per 30 minuti per permettere alla reazione di avvenire e sviluppare il colore. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati letti misurando l'assorbanza a 550 nm con il microplate reader Wallac VictorII-1420. Le concentrazioni proteiche dei campioni sono state ricavate interpolando il dato di assorbanza ottenuto su una retta di taratura di BSA (Albumina di Siero Bovino) a concentrazioni note (range 125 µg/ml – 2 mg/ml).

## 5.7 Quantificazione dell'attività enzimatica della Fosfatasi Alcalina

Le fosfatasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi di un gruppo fosfato da esteri monofosfati; in particolare le fosfatasi alcaline (ALP) (isoenzimi presenti in fegato, osso, intestino e placenta) hanno una massima attività a pH 10,5 circa.

L'attività della fosfatasi alcalina viene saggiata sui lisati cellulari utilizzando il metodo fotometrico che sfrutta la reazione di idrolisi del gruppo fosfato del composto incolore p-nitrofenolfosfato (pNPP) dando come prodotto p-nitrofenolo (pNP) di caratteristico colore giallo con picco di assorbanza a 405 nm.



**Figura 11:** Reazione catalizzata dalla Fosfatasi Alcalina su pNPP a dare pNP

Gli esperimenti di dosaggio sono stati eseguiti con piccole modifiche rispetto al metodo descritto in letteratura (Lowry OH et al., 1957; Bodo et al., 2002) per essere applicabili in piastre da 96 pozzetti.

Per ogni pozzetto sono stati aliquotati 8-20  $\mu$ l di lisato in relazione alla specie di provenienza delle cellule (ogni campione dosato in duplicato per calcolare una variabilità statistica) ai quali sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di soluzione substrato a pH 10,5 contenente 10 mM pNPP (71768, Fluka BioChemika) diluito nel tampone 100 mM dietanolamina (31589, Fluka) / 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O. I campioni sono stati lasciati in incubazione per il tempo necessario affinché si sviluppi la reazione. Al termine del periodo di incubazione la reazione è stata bloccata con 50  $\mu$ l di NaOH 3N e i campioni letti misurando l'assorbanza a 405 nm con il microplate reader Wallac VictorII-1420.

I valori di assorbanza dei campioni sono stati interpolati con una curva standard a concentrazioni note di pNP (1048, Sigma-Aldrich) al fine di valutare la concentrazione proteica dell'enzima presente nel campione analizzato. L'attività enzimatica è stata calcolata in U, dove 1U è la quantità di enzima necessario per idrolizzare 1  $\mu$ mole di pNPP secondo la formula:

$$U = \mu\text{M}/\text{min} \cdot 1000 \longrightarrow \text{nM}/\text{min}$$

I valori di attività fosfataseica sono stati poi normalizzati con i valori ottenuti dal dosaggio proteico ed è stato poi valutato l'incremento dell'attività di fosfatasi alcalina dei campioni trattati rispetto ai controlli.

## **5.8 Valutazione della deposizione di matrice extracellulare calcificata**

Il colorante Alizarin Red-S (AR-S), un derivato dell'antrachinone, viene usato per evidenziare la presenza di calcio in preparati istologici. L'AR-S forma un complesso stabile con il calcio attraverso un processo chelante mediato dal gruppo acido sulfonico o dai gruppi ossidrilici, formando dei depositi di colore rosso intenso birifrangenti.

Per valutare la presenza di depositi di calcio mediante questa colorazione, le cellule sono state seminate alla concentrazione di  $1 - 3 \times 10^4$ /pozzetto e mantenute in coltura in medium differenziativo per 14-21 giorni cambiando il terreno ogni 2 giorni. Al termine della coltura, è stato effettuato un lavaggio della piastra con PBS, cui è seguita la fissazione di 1 ora con Etanolo 70% freddo (-20°C). Quindi è stato eseguito un lavaggio veloce con acqua deionizzata, cui è seguita immediatamente la colorazione con una soluzione 40 mM Alizarin Red-S a pH 4.1 (05600, Fluka) per 15 minuti. Al termine della colorazione, sono stati effettuati diversi lavaggi con acqua deionizzata per eliminare il colorante in eccesso.

È stata quindi eseguita l'estrazione della colorazione (Gregory CA et al., 2004; Stanford CM et al., 1995) utilizzando una soluzione al 10% (w/v) di cloruro di cetilpiridinio (CPC - C0732, Sigma-Aldrich) in tampone Na-fosfato 10 mM (pH 7.0) per 15 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'estrazione, 100-200 µl di soluzione sono stati trasferiti in una piastra multiwell da 96 pozzetti e letti misurando l'assorbanza a 550 nm con il microplate reader Wallac VictorII-1420. I dati sono stati poi analizzati valutando l'incremento della deposizione del calcio dei campioni trattati rispetto ai non trattati.

## **5.9 Immunofluorescenza**

Dopo aver sottoposto le colture cellulari alle opportune condizioni sperimentali, le cellule adese ai vetrini coprioggetto vengono fissate con paraformaldeide al 4% (p/v) e saccarosio al 4% (p/v), sciolti in tampone fosfato sodico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 0.12 M, pH 7.4, per 25 minuti a temperatura ambiente. Scaduto il tempo di deposizione, la paraformaldeide viene rimossa eseguendo 3 lavaggi da 10 min con PBS (Sigma).

Per l'analisi di immunofluorescenza, i vetrini vengono lavati tre volte con PBS a bassa concentrazione salina (LS-PBS: NaCl 150 mM, tampone fosfato 10 mM, pH 7.5), e di seguito tre lavaggi con PBS ad alta concentrazione salina (HS-PBS: NaCl 500 mM, tampone fosfato 20 mM, pH 7.4).

Successivamente i campioni vengono incubati a temperatura ambiente per 30 minuti in Gelatin Dilution Buffer (GDB, 0.2% (p/v) gelatina, 0.3% (p/v) Triton X-100, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , NaCl 0.45 M), una soluzione che, grazie alla presenza del detergente Triton, consente di permeabilizzare le membrane cellulari e, grazie alle proteine della gelatina, assicura la saturazione dei siti aspecifici.

Dopo la permeabilizzazione con GDB, i vetrini vengono incubati per 2 ore a temperatura ambiente con gli anticorpi primari diluiti in GDB alla concentrazione opportuna. Al termine dell'incubazione vengono effettuati tre lavaggi con HS-PBS al fine di eliminare l'eccesso di anticorpi non legati o legati a siti aspecifici. Segue un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari coniugati a specifici fluorofori, diluiti in GDB.

Al termine delle incubazioni con gli anticorpi, vengono eseguiti lavaggi con HS-PBS e con LS-PBS, a cui segue un'incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente con DAPI 1 $\mu\text{M}$  (4-6-diamidino-2-fenilindolo, Invitrogen) per evidenziare i nuclei delle cellule. Infine, dopo alcuni lavaggi con LS-PBS e un lavaggio con tampone sodio fosfato 5mM, i vetrini vengono montati su portaoggetti con una soluzione di montaggio (Mowiol, Sigma). Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza invertito Leica CTR4000, collegato ad un computer dotato di un software per le analisi delle immagini, e mediante microscopio confocale Leica SPE o Leica SP5.

### **5.10 Analisi della morte cellulare**

Per calcolare la percentuale di cellule morte è stata effettuata una marcatura *in vivo* con il Propidio Ioduro (PI) e una marcatura con il DAPI dopo il fissaggio delle cellule. Il Propidio Ioduro è un colorante generalmente utilizzato per identificare cellule che stanno andando in contro ad un processo di apoptosi o necrosi; esso infatti è in grado di penetrare all'interno dei nuclei delle cellule attraverso una membrana plasmatica danneggiata. Il DAPI invece è un colorante che è in grado di formare complessi fluorescenti con il dsDNA quindi è comunemente utilizzato per marcare i nuclei di tutte le cellule, sia di quelle vive che di quelle morte.

Le cellule sono state incubate per 10 minuti al buio e a 37°C con PI (20  $\mu\text{g/ml}$ ) diluito in PBS, successivamente dopo un lavaggio veloce con PBS sono state fissate in Paraformaldeide al 4% e saccarosio al 4% ed infine è stata effettuata la colorazione con DAPI.

Mediante l'utilizzo del microscopio a Fluorescenza (Leica Ctr4000) sono state prese immagini di fluorescenza; è stato quindi effettuato il conteggio delle cellule marcate con

propidio ioduro (cellule morte) e di quelle marcate con DAPI (cellule totali) mediante il programma Image J ed è stata calcolata la percentuale di cellule morte sul loro totale.

### **5.11 Attività metabolica cellulare: saggio con l'Alamar Blue™**

Tale saggio utilizza l'Alamar Blue™ (un indicatore redox vitale rilevabile sia in fluorescenza sia in assorbanza) e permette di quantificare il livello di metabolismo ossidativo cellulare attraverso la riduzione chimica di tale indicatore addizionato al mezzo di coltura. L'aspetto positivo di questa procedura sperimentale consiste nella possibilità, al termine della misura, di rimuovere l'Alamar Blue™ e di proseguire la coltivazione delle cellule sui campioni dopo ogni tempo di saggio prescelto. Per tale motivo questo indicatore viene quindi definito un "colorante vitale" (O'Brien J., et al 2000).

Le specifiche concentrazioni e la natura dei componenti dei vari mezzi di coltura sono attualmente oggetto di studio di fattibilità per la deposizione di specifici brevetti e pertanto non possono essere condivise. Ai fini dello studio di questa tesi vengono qui riportati alcuni dei principali componenti dei mezzi di coltura

### **5.12 Estrazione di RNA totale**

Il protocollo utilizzato nell'estrazione dell' RNA totale prevedeva l'utilizzo di 1 ml di *Trizol Reagent*, che è composto da una miscela di fenolo isotiocianato e cloroformio (Invitrogen), per  $10^6$  cellule circa. Dopo aver lasciato agire per qualche secondo il composto, con l'aiuto di uno *scraper*, sono stati raccolti i complessi nucleoproteici dissociati. Una volta trasferito il materiale in tubo sono stati aggiunti 200  $\mu$ L di cloroformio per ml di *Trizol* impiegato. Dopo aver agitato vorticosamente per 15 secondi il campione è stato incubato per 3 minuti a temperatura ambiente e successivamente è stata effettuata una prima centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4 °C. Dopo la centrifugazione la miscela appariva separata in tre fasi: una fase organica rosacea apolare (strato inferiore, fenolo-cloroformio), un'interfase, ed una fase acquosa superiore incolore. L' RNA, rimasto esclusivamente nella fase acquosa, è stato trasferito in un nuovo tubo. Alla fase acquosa sono stati aggiunti 0,2 ml di isopropanolo per ml di *Trizol* utilizzato, per permettere la precipitazione dell'RNA. I campioni sono stati quindi incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e in seguito centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4 °C così da far depositare il pellet di RNA. Dopo aver rimosso velocemente il supernatante per inversione su della carta assorbente, il pellet è stato lavato dai sali con etanolo al 75% (1 ml per ogni ml di *Trizol* utilizzato) e

successivamente centrifugato nuovamente a 7500 g per 5 minuti a 4 °C. Dopo aver velocemente eliminato il supernatante il pellet è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente e successivamente si risospeso in H<sub>2</sub>O DEPC (soluzione acquosa contenente dietilpirocarbonato) che permette di inibire le RNAsi.

Per determinare la concentrazione e la qualità dell' RNA estratto è stato utilizzato uno strumento dedicato, il *Nanodrop 1000 spectrophometer* (Thermo scientific) capace di determinare la concentrazione di RNA presente nel campione mediante assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 e 280 nm utilizzando micro volumi.

### 5.12.1 *Trattamento con DNase*

Al fine di ottenere un campione più pulito da contaminazioni di DNA è stato effettuato un trattamento con DNase utilizzando un kit (RQ1 *RNase-Free DNase* promega) che contiene la DNasi 1 (endonucleasi) che è in grado di degradare il singolo *strand* e il *double strand* di DNA. Il protocollo prevede di prendere 3µg di campione a cui aggiungere 1,5 µl di RQ1 *RNase-Free DNase* 10X Reaction Buffer (400mM Tris-HCL pH 7.9, 100mM MgSO<sub>4</sub> and 10 mM CaCl<sub>2</sub>), 3µl di RQ1 *RNase-Free DNase* (1µl/1µg) e acqua DEPC fino ad arrivare ad un volume finale di 15µl che viene incubato a 37°C per 30 min. Quindi è stato aggiunto 1µl di *RQ1 DNase stop Solution* (20mM EGTA, pH 8.0) per terminare la reazione e il campione è stato incubato a 65 °C per 10 min per disattivare la DNasi.

### 5.12.2 *PCR*

Per ottenere cDNA da RNA è stato utilizzato il kit dedicato (*SuperScript III First-Strand Synthesis System* for RT-PCR Invitrogen). E' stato utilizzato 1µg di RNA precedentemente trattato con DNasi.

E' stato aggiunto un primo Mix composto da 1µl di 50µM oligo(dT), 1µl 10mM dNTP mix e acqua DEPC fino ad un volume di 10µl. Il tutto è stato incubato a 65 °C per 5 minuti, ed è stato messo in ghiaccio per circa un minuto. Successivamente sono stati aggiunti 10 µl di un altro mix (cDNA Synthesis mix) composto da 10X RT buffer 2µl, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4µl, 0,1 DTT 2µl, RNaseOUT (40U/µl) 1µl, SuperScript III RT (200 U/µl) 1µl. Si incubava a 50 °C per 50 min, a 85 °C per 5 min. Infine è stato aggiunto 1µl di RNase H ed è stato incubato tutto per 20 min a 37°C .

Una volta ottenuto il cDNA questo è stato amplificato utilizzando il Kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen).

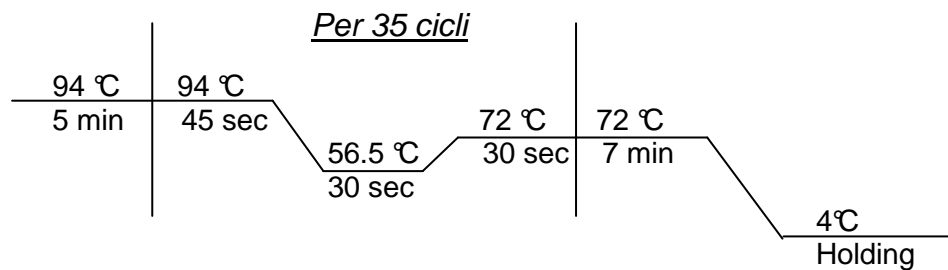
Ad ogni campione è stato aggiunto un mix composto da: 30,3 µl di acqua DEPC, 5µl di 10X PCR buffer minus Mg<sup>++</sup>, 1,5µl di 50mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl di 10mM dNTP mix, 1µl di *primer* senso (10µM), 1µl di *primer* antisenso (10µM), 10µl di cDNA e 0.2µl di *taq* DNA polimerasi in un volume finale di 50µl. E' stata quindi effettuata l'amplificazione con l'utilizzo del termociclatore (Applied Biosystems 2720). Il programma e le temperature utilizzate sono state variate a seconda della *Taq* utilizzata e a seconda dei frammenti da amplificare e quindi dai *primers* utilizzati.

Primer utilizzati:

	Primer sense	Primer antisense
$\beta$ actina	TGACGGGGTCACCCACTGTGCCCATCTA	CTAGAAGCTTGCGGTGGACGATGGAGGG
Nestin	ACCCGGTACAGGAGTCTGTG	AATCCCCATCTACCCCACTC
Doublecortin	TCGCTCAAGTGACCAACAAG	TGCCACTCTCTGAGATCCT
Snap25	AGGACGCAGACATGCGTAATGAACTGGAGG	GTTGGAGTCAGCCTTCTCCATGATCCTGTC

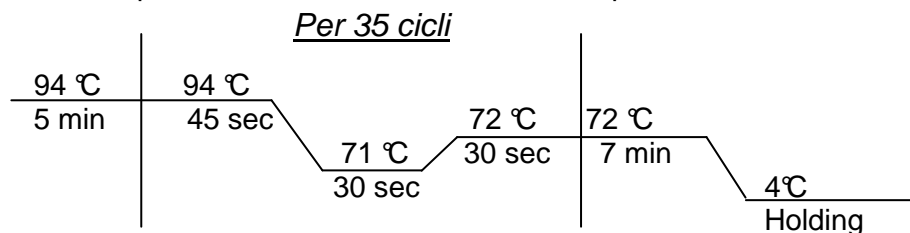
Condizioni utilizzate:

Per i *primers* della  $\beta$ III tubulina, della Nestina e di Double Cortin è stato possibile utilizzare uno stesso programma.



Il *primer* della  $\beta$ -actina che si utilizza come controllo interno per verificare che siano state caricate le stesse quantità di cDNA per ogni campione, è stato disegnato in maniera tale per cui è in grado di amplificare a diverse temperature e numeri di cicli.

Per il primer di Snap25 invece è stato utilizzato un altro programma:



I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi orizzontale utilizzando un gel all' 1,5% di agarosio in tampone TBE (Tris borato 45 mM, EDTA 1 mM a pH 8).

Infine, le fotografie del gel sono state ottenute esponendo il gel ai raggi UV emessi da un transilluminatore (Versadoc 4000 MP, imaging system, Biorad) e sono state acquisite mediante il software *Quantity One*.

### **5.12.3 Disegno primers**

I *primers* utilizzati per l'analisi dell'espressione di cDNA dei geni d'interesse ottenuti tramite retrotrascrizione di mRNA sono stati disegnati mediante l'utilizzo di un programma on-line specifico: *Primer3*. La sequenza in formato fasta richiesta dal programma è stata ricavata mediante un database virtuale sul sito *NCBI*. Per ottenere dei *primers* con un' elevata percentuale d' affinità per la sequenza d' interesse è stato deciso di considerare una lunghezza compresa tra le 300 e le 500 bp.

Per dimostrare l' affidabilità dei *primers* disegnati, è stato effettuato un confronto con gli stessi *primers* disegnati con un altro programma on-line: *Blast*

### **5.13 Misure di elettrofisiologia mediante la tecnica del patch-clamp**

Per le misurazioni elettrofisiologiche è stata utilizzata la tecnica del *patch-clamp* in configurazione *whole-cell*.

Questa tecnica consiste nel creare una zona di strettissima aderenza tra la membrana cellulare e la parete di un microelettrodo extracellulare di vetro (diametro della punta di ~ 1µm), riempito con una soluzione salina conduttiva. Tale aderenza che si ottiene avvicinando il microelettrodo alla membrana della cellula permette, operando una delicata suzione, di formare il cosiddetto sigillo. L'altissima resistenza (dell'ordine di 1-2 GΩ) del sigillo, permette un ottimo isolamento elettrico del tassello di membrana (*patch*), trattenuto nella punta del microelettrodo, dall'ambiente extracellulare. Questa configurazione della cellula è detta *cell-attached*, cioè a cellula attaccata, che permette di registrare flussi ionici di un singolo canale o di un piccolo numero di canali in condizioni fisiologiche. Rompendo il *patch*, si raggiunge la configurazione *whole-cell*, cioè a cellula intera in cui la soluzione presente all'interno della pipetta è posta in comunicazione diretta con il citoplasma della cellula ed è possibile misurare contemporaneamente l'insieme delle correnti che attraversano l'intera membrana,



ottenendo informazioni su tutta la popolazione di canali ionici attivi della cellula in esame.

La tecnica del *whole-cell* ci ha permesso di registrare potenziali di riposo delle cellule in esame, passando dalla modalità *voltage-clamp* alla modalità  $I=0$  che permette di misurare il potenziale interno della cellula (potenziale di riposo).

Per le registrazioni sono state utilizzate soluzioni interne per riempire le micro pipette, e soluzioni extracellulari per la perfusione esterna alla cellula.

La soluzione interna standard contenuta nei microelettrodi è composta da: 10 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Hepes, 130 mM Kgluc, 1 mM EGTA, pH 7.4.

La soluzione extracellulare fisiologica standard contiene: 125 mM NaCl, 5mM KCl, 1.2 mM  $MgSO_4$ , 1.2 mM  $KH_2PO_4$ , 25 mM Hepes, 6 mM Glu, 2 mM  $CaCl_2$ .

### **5.14 Registrazioni di imaging per il calcio su singola cellula**

L' *imaging* per il calcio permette di misurare le variazioni di calcio intracellulare grazie all' utilizzo dell'indicatore fluorescente per il calcio Fura-2 (Molecular Probes). Le caratteristiche spettrali del Fura-2 rappresentano un importante strumento per l'analisi quantitativa delle concentrazioni di calcio intracellulari. L'indicatore fluorescente è in grado di tradurre le variazioni di calcio in variazioni di intensità di fluorescenza.

Il Fura-2 possiede due differenti picchi di emissione dopo eccitazione alle lunghezze d'onda di 340nm e di 380nm. In seguito al legame del Fura-2 con lo ione calcio si verifica una modificazione d'intensità d'emissione nei due picchi. In particolare ad alte concentrazioni di calcio intracellulari il fluorocromo emette l'intensità massima di fluorescenza una volta eccitato alla lunghezza d'onda di 340 nm e la minima intensità a 380nm.

La misura delle variazioni di calcio citoplasmatico viene ottenuta in seguito al rapporto tra l'emissione di fluorescenza alla lunghezza d'onda di 340nm rispetto all'emissione a 380nm. Ciò permette di monitorare i livelli di calcio all'interno della superficie cellulare escludendo le variazioni di segnale dovute ai differenti volumi delle cellule. L'indicatore Fura-2 può essere presente in due forme: una forma esterea presente a livello extracellulare e una forma de-esterificata a livello intracellulare. La de-esterificazione del tracciante, una volta penetrata la membrana cellulare, comporta il mantenimento del Fura-2 così da permettere l'analisi delle variazioni di concentrazione dello ione all'interno della cellula. Per poter analizzare le variazioni di calcio intracellulare, le cellule vengono caricate per 45-60 min a 37° C con la forma esterea, permeabile alle membrane, dell'indicatore per il calcio Fura-2 ad una concentrazione di 1 mM in soluzione Krebs-Ringer-Hepes (KRH: 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM  $MgSO_4$ , 2 mM

CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosio, 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4) contenente BSA 1%. Dopo aver lavato le cellule, queste vengono trasferite su una camera di registrazione montata su un microscopio invertito (Laica CTR6000) equipaggiato di un'unità di *calcium imaging*. Come sorgente di luce per le registrazioni si utilizza un sistema di illuminazione Polychrome V (Till Photonics). Le immagini in fluorescenza sono acquisite, digitalizzate ed integrate in tempo reale da un software di immagini (Imagin Workbench 6) in grado di fornire in pseudocolori il rapporto fra le immagini a 340/380 nm. Gli esperimenti vengono condotti a temperatura ambiente (20-25°C).

### **5.15 Analisi di quantizzazione mediante software di elaborazione grafica**

Con Image J, il dato numerico utilizzato per la quantizzazione viene estratto dall'immagine mediante una funzione di calcolo presente nel programma. Affinché il programma analizzi correttamente l'immagine è stato necessario eseguire alcune operazioni che permettessero al programma di distinguere e quindi contare gli elementi presenti sulle immagini. Nel nostro caso è stata effettuata la conta dei nuclei cellulari e l'espressione di specifici marcatori di differenziamento verso la linea neuronale.

Su tutte le immagini da analizzare è stato necessario regolare il livello di intensità di fluorescenza in modo da stabilire un livello del segnale tale che fosse lontano dalla saturazione e privo di segnale di fondo; queste operazioni hanno permesso di delineare nel miglior modo possibile il segnale che la funzione del programma ha acquisito poi come "positivo".

Per ottenere una migliore accuratezza nella conta degli elementi di interesse è stata introdotta anche un soglia delle dimensioni degli "oggetti" da contare tramite l'applicazione della funzione di "conta".

Ottenute le quantità numeriche di ogni singola immagine analizzata si è proceduto nel confrontare quelle di interesse.

### **5.16 Preparazione dei campioni di Titanio**

I trattamenti commerciali replicati sui dischi di titanio seguono le indicazioni di un lavoro precedente svolto presso il Dipartimento di Chimica, Materiali ed Ingegneria Chimica "Giulio Natta" del Politecnico di Milano. Dopo aver effettuato le modifiche superficiali, sono stati confrontati i parametri di rugosità e la morfologia superficiale dei campioni ottenuti con quelli ricavati nello studio precedente per dischi analoghi al fine di valutarne la comparabilità.

### **5.16.1 Realizzazione delle superfici BioRough™**

I dischi sono stati trattati inizialmente in idrossido di sodio 1M e perossido di idrogeno al 2% (v/v) per 10 minuti a 80° C, successivamente è stato eseguito un passaggio in acido ossalico 1M a 80° C per 60 minuti. Tale soluzione è stata mescolata manualmente con una bacchetta di vetro, in modo che il trattamento sui dischi risultasse uniforme; infine è stato effettuato un risciacquo in acqua distillata.

### **5.16.2 Morfologia cellulare: analisi con microscopia elettronica a scansione**

Il microscopio elettronico a scansione consente di osservare la morfologia cellulare, di evidenziare differenze nella densità cellulare e di verificare se lo stato di attacco e di adesione è soddisfacente; dopo tale analisi si è perciò in grado di valutare qualitativamente se il materiale risulta idoneo per la colonizzazione cellulare, oltre ad evidenziare eventuali effetti citotossici. Le analisi sono state compiute a tre differenti tempi di saggio, in modo da avere dati qualitativi relativamente alla colonizzazione cellulare delle superfici ed allo stato di salute delle cellule.

### **5.17 Pre-trattamento dei vetrini copri- oggetto**

La crescita delle cellule in coltura, oltre che su petri, Flask in plastica e su vetro può avvenire su vetrini opportunamente funzionalizzati per essere permissivi alla crescita cellulare. Tale trattamento è necessario per permettere un'adeguata adesione, crescita e sopravvivenza delle cellule. A tale scopo i vetrini sono stati sottoposti ad alcuni lavaggi con acqua deionizzata prima di essere immersi in acido nitrico (HNO<sub>3</sub>) al 65%, per almeno 48 ore a temperatura ambiente. In seguito a tale trattamento, che ha lo scopo di pulire le superfici da eventuali tracce di polvere o grasso e di attivarne la superficie mediante legami OH, i vetrini hanno subito ripetuti lavaggi con acqua deionizzata al fine di rimuovere l'acido nitrico in eccesso. Successivamente è stata eseguita una fase di sterilizzazione, compiuta in stufa a 180°C per 5 ore.

Da questo punto in poi qualsiasi operazione è stata condotta in ambiente sterile. I vetrini copri-oggetto sono stati disposti in capsule Petri monouso. A questo punto i vetrini sono stati considerati pronti per l'uso, nel caso in cui invece, a seconda delle caratteristiche delle cellule, dovesse essere necessario come per i neuroni un ulteriore trattamento con Poli-L-isina essi vengono incubati per una notte a temperatura ambiente in tampone borato (0.1 M, pH 8.5) contenente poli-L-isina alla

concentrazione di 1mg/ml o 0,5mg/ml. Il giorno seguente la poli-L-lisina in eccesso viene rimossa attraverso lavaggi in acqua sterile.

### **5.18 Analisi statistiche**

Le analisi statistiche (Student's t-test) sono state effettuate utilizzando il programma *Origin* (v.8). I dati sono stati espressi con media±deviazione standard e le differenze sono state considerate statisticamente significative quando  $p < 0,05$ .

### **5.19 Anticorpi**

Gli anticorpi primari utilizzati per immunofluorescenza sono i seguenti:

- Anticorpo monoclonale diretto contro una proteina fibrillare delle cellule gliali GFAP (glial fibrillary acidic protein, Sigma), diluizione d'utilizzo 1:400
- Anticorpo monoclonale diretto contro la  $\beta$ III-tubulina (Promega), 1:500
- Anticorpo monoclonale diretto contro la SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25, Sternberger), diluizione di utilizzo 1:300
- Anticorpo policlonale diretto contro la SINAPTOFISINA (o P38, Sinaptic Sistem), diluizione di utilizzo 1:100
- Anticorpo monoclonale diretto contro VAMP2 (sinaptobrevin2, Sinaptic sistem), diluizione di utilizzo 1:100
- Anticorpo monoclonale diretto contro SINAPTOTAGMINA (o Syt, Sinaptic sistem), diluizione di utilizzo 1:50
- Anticorpo monoclonale diretto contro NESTIN (Chemicon), diluizione di utilizzo 1:100
- Anticorpo policlonale diretto contro IB4, diluizione di utilizzo 1:100
- Anticorpo monoclonale diretto contro MAP-2 (proteina associata ai microtubuli 2, Immunological sciences), diluizione di utilizzo 1:500
- Anticorpo policlonale diretto contro OLIG-2 (Oligodendrocyte transcription factor 2, Millipore), diluizione di utilizzo 1:500
- Anticorpo policlonale diretto contro DCX (doublecortin, Cell Signaling), diluizione di utilizzo 1:200

Gli anticorpi secondari utilizzati sono:

- Anticorpo realizzato in capra diretto contro IgG di coniglio coniugato al fluoroforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).
- Anticorpo realizzato in capra diretto contro IgG di topo coniugato al fluoroforo Alexa Fluor 594 (Molecular Probes).

- Anticorpo realizzato in capra diretto contro IgG di coniglio coniugato al fluoroforo Alexa Fluor 594 (Molecular Probes).
- Anticorpo realizzato in capra diretto contro IgG di topo coniugato al fluoroforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).

Inoltre è stata utilizzata la Falloidina, una tossina che si lega in maniera specifica al citoscheletro actinico, direttamente coniugata al fluoroforo Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) e IB4 che è un marcatore microgliale, direttamente coniugata al fluoroforo Alexa Fluor 488.

# ***RISULTATI***

## **6.1 Caratterizzazione delle MSC**

Dopo essere state isolate da tessuto adiposo di ratto, le MSC sono state seminate in apposite fiasche e il mezzo di coltura è stato rinnovato ogni 2 o 3 giorni al fine di rimuovere le cellule rimaste in sospensione; quindi dopo 3 passaggi in coltura, sono state opportunamente caratterizzate tramite analisi fenotipiche con l'utilizzo di combinazioni di anticorpi monoclonali diretti contro marcatori di superficie noti, espressi anche dalle MSC coltivate *in vitro*.

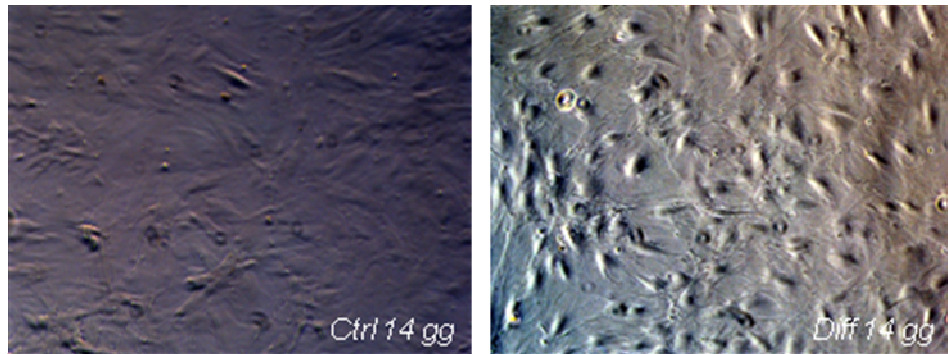
I pannelli di marcatori utilizzati fino a questo momento per identificare le MSC includono esclusivamente recettori per alcune citochine (tra le quali IL-1, 3, 4, 6 e 7) e recettori per proteine della matrice extracellulare (ICAM 1 e 2, VCAM1, integrine  $\alpha$  - 1, 2 e 3, integrine  $\beta$  1, 2, 3 e 4 e Thy-1).

In alternativa la caratterizzazione può essere effettuata dal punto di vista morfologico, immunofenotipico e per la loro capacità differenziativa; infatti le MSC sotto adeguato stimolo differenziativo in coltura sono in grado di differenziare in osteoblasti, adipociti e condrociti; per la loro caratterizzazione è stato deciso di indurre loro il differenziamento osteoblastico.

### **6.1.1 Differenziamento Osteoblastico**

### **6.1.2 Morfologia**

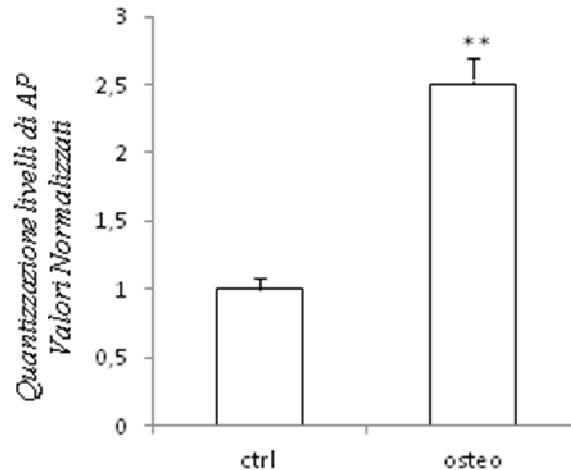
Le cellule MSC sono state mantenute in medium differenziativo, composto da  $\alpha$ -MEM, 10% di FBS, 100 U/ml Pennicillina, 100 U/ml Streptomina, 2mM L-Glutamina, 0,15 mM Ascorbato-2-P, 0,01  $\mu$ M Desametasone e 10 mM  $\beta$ -glicerolfosfato (Ioana A. et al., 2006) per 7, 14 e 21 giorni per poi essere analizzate sia dal punto di vista morfologico, sia per la determinazione di specifici marcatori differenziativi quali la produzione di fosfatasi alcalina, l'espressione di osteopontina e la deposizione di matrice extracellulare calcificata. Le cellule, in coltura in mezzo induttivo, dopo 14 giorni hanno assunto una morfologia nettamente differente da quella delle cellule cresciute in mezzo di controllo (Figura 1): le cellule in differenziamento, hanno perso la caratteristica morfologia allungata simil-fibroblastoide (Baksh D. et al., 2004) delle cellule staminali mesenchimali, con una disposizione abbastanza omogenea, assumendo una morfologia più tondeggiante.



**Figura 1:** foto in campo chiaro. A: MSC mantenute in condizioni di controllo per 14 giorni; B: MSC mantenute in terreno di differenziamento osteoblastico per 14 giorni. 40X

### 6.1.3 Attività dell'enzima Fosfatasi Alcalina e produzione di matrice calcificata

L'attività fosfatase, tipicamente presente nelle cellule del tessuto osseo, è stata valutata, in lisati di cellule MSC isolate dopo 14 giorni di differenziamento. È stato possibile osservare come, a 14 giorni, le MSC sottoposte a differenziamento, mostrino un incremento di attività fosfatase doppio rispetto alle MSC mantenute in condizioni di controllo. ( $100 \pm 0,25$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ )



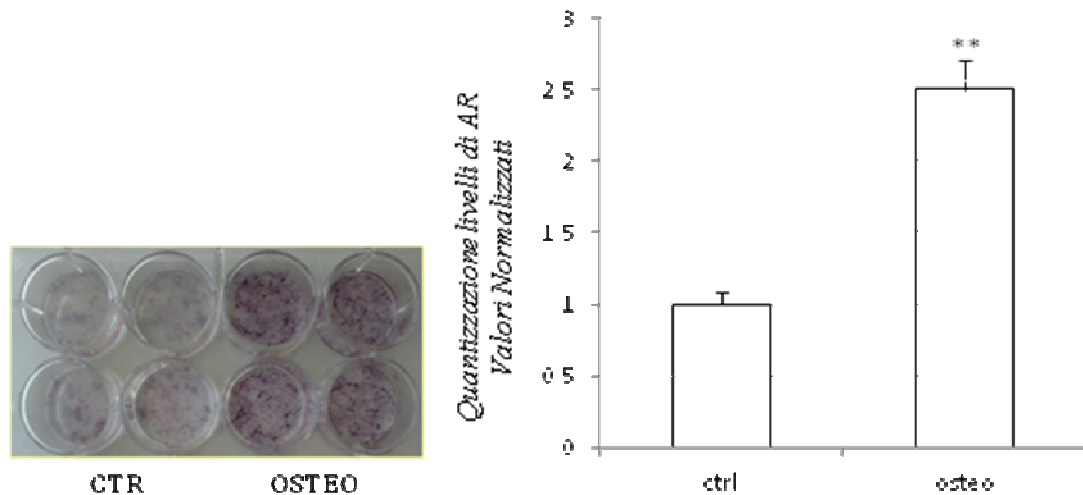
**Figura 2: Analisi quantitativa dell'attività fosfatase di cellule MSC differenziate in osteoblasti**

Attività fosfatase standardizzata per mg di proteine di cellule MSC non differenziate (CTRL) e differenziate

verso la linea osteoblastica (OSTEO) determinata a 14 giorni. Le medie  $\pm$  deviazione standard sono rappresentate (\*  $p < 0,05$  Student's T-test).



Inoltre è stato quantificato il livello di deposizione della matrice calcificata delle MSC sottoposte a differenziamento per 21 giorni mediante colorazione con Alizarin Red-S, che si lega in maniera specifica ai depositi di calcio che si formano, e successiva estrazione (Figura 3): nelle MSC differenziate si sono osservati livelli di calcio ben più elevati rispetto a quelli osservati nelle MSC mantenute in condizioni di controllo, con un incremento medio di circa il doppio ( $100 \pm 0,21$ ,  $n=5$ ,  $p<0,05$ ).

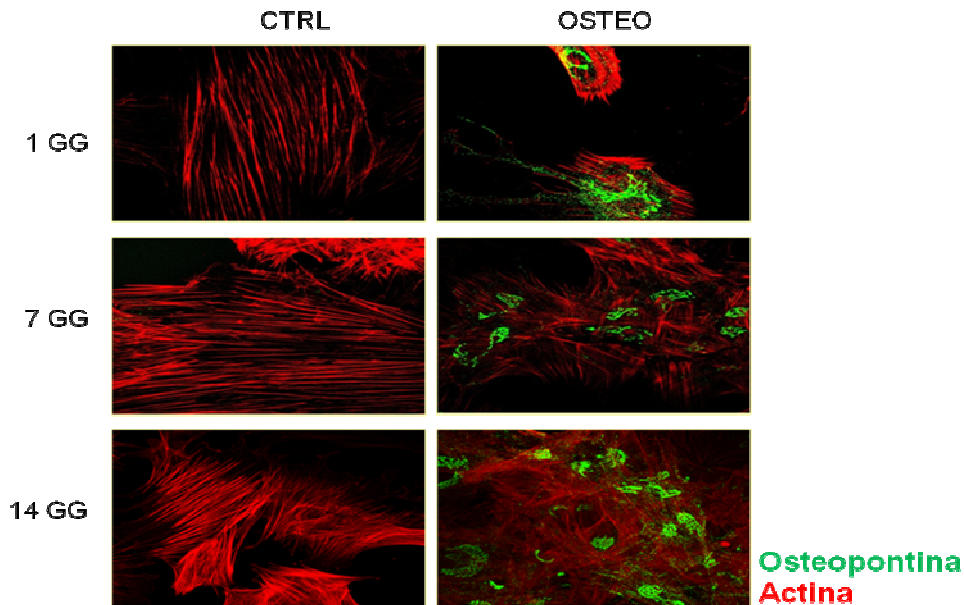


**Figura 3. Valutazione qualitativa e quantitativa della deposizione di matrice calcificata da parte di cellule MSC differenziate verso la linea osteoblastica.**

Colorazione con Alizarin Red S di MSC coltivate per 21 giorni in terreno non induttivo. Il grafico rappresenta le medie dei valori di assorbanza a 550 nm  $\pm$  deviazione standard.

Esperimenti di immunocitochimica hanno permesso di evidenziare l'espressione di una proteina espressa specificamente nel tessuto osseo come l'osteopontina (OPN).

Le MSC differenziate per 7, 14 e 21 giorni, hanno espresso livelli elevati di proteina tessuto specifica OPN (Fig4), mentre le cellule non differenziate non hanno mostrato alcuna espressione di questa proteina. L'OPN non è risultata omogeneamente espressa in tutte le cellule, suggerendo che le MSC non siano tutte allo stesso stadio di differenziamento.

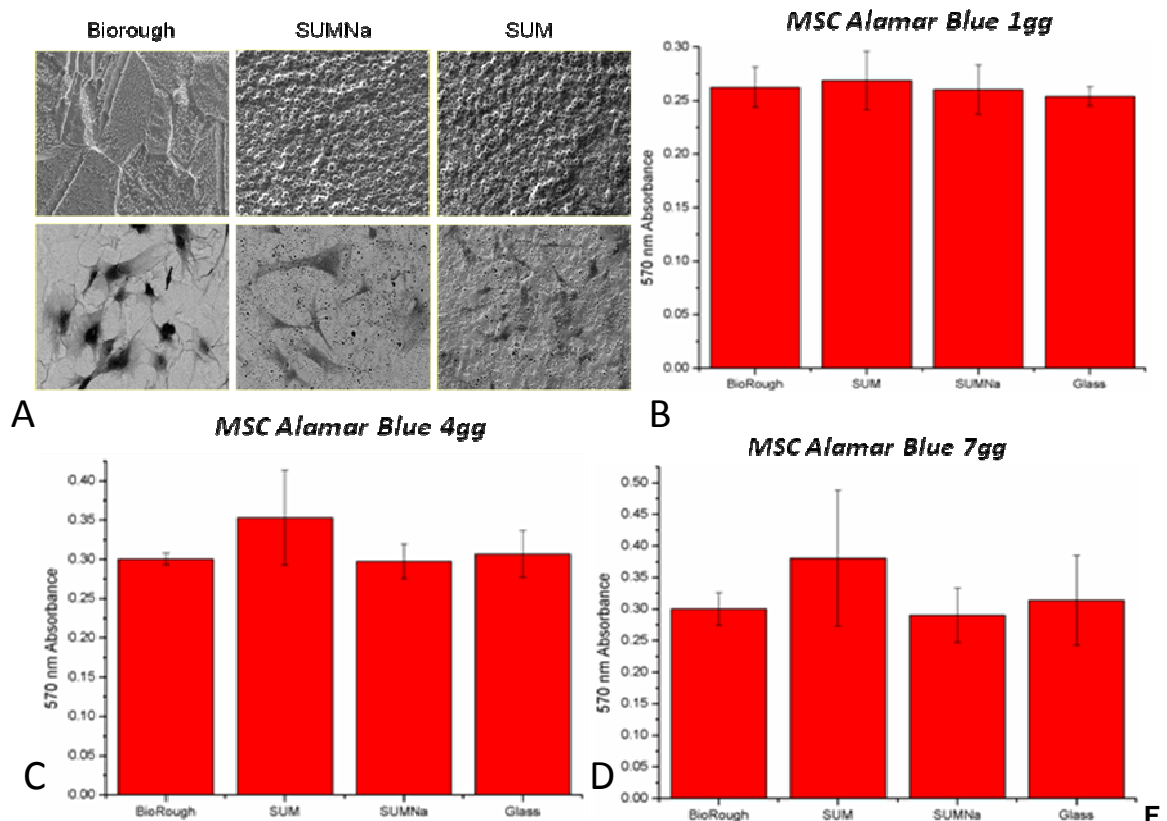


**Figura 4: Espressione di osteopontina (OPN) e di actina (ACT) in cellule MSC differenziate e non differenziate**

Esperimenti di immunofluorescenza con cellule MSC coltivate per 1, 7 e 14 giorni in medium controllo (CTRL) e in terreno differenziativo (OSTEO). (Tutte le immagini a 40X).

## 6.2 Interazioni MSC-Biomateriali

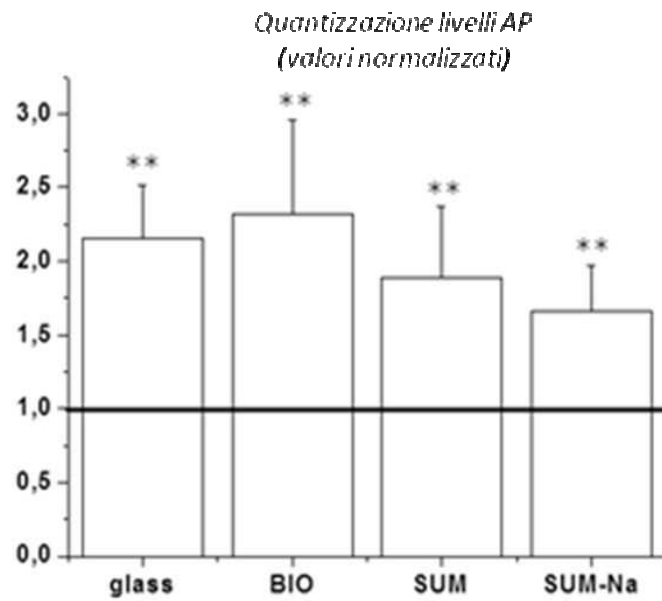
Al fine di poter valutare le potenzialità delle MSC nell'ambito della rigenerazione ossea in caso di lesioni, sono stati effettuati studi di citocompatibilità tra cellule e biomateriali di titanio opportunamente processato. Quindi dopo aver sottoposto gli scaffold di Titanio, quali BioRough, SUM e SUMNa a trattamenti di tipo chimico-fisico ed elettrochimici in modo da renderli biocompatibili e antibatterici, sulla loro superficie sono state seminate le MSC allo stato indifferenziato. I biomateriali testati non hanno prodotto effetti citotossici. Infatti, le cellule MSC, hanno aderito alla superficie di tutti e tre i biomateriali, colonizzandola; da studi di vitalità cellulare effettuati mediante il saggio Alamar Blue non è stata osservata alcuna differenza rispetto a cellule mantenute in coltura in condizioni di controllo su vetro.



**figura 5:** (A) foto della superficie dei Titani differentemente trattati (in alto), MSC piastrate sui titani (in basso); (B) Saggio dell'Alamar Blue per valutare la crescita cellulare sui tre diversi titani rispetto alla situazione di controllo su vetro dopo 1 gg in coltura; (C) Saggio dell'Alamar Blue per valutare la crescita cellulare sui tre diversi titani rispetto alla situazione di controllo su vetro dopo 4 gg in coltura; (D) Saggio dell'Alamar Blue per valutare la crescita cellulare sui tre diversi titani rispetto alla situazione di controllo su vetro dopo 1 gg in coltura.

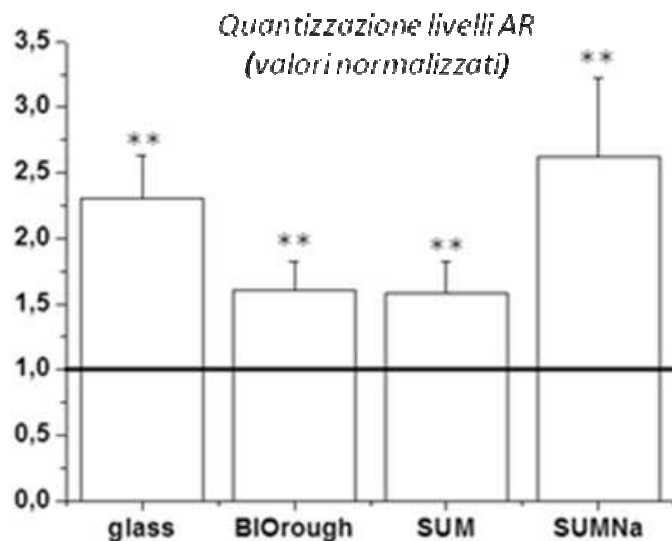
Per apprezzare il potere osteoinduttivo dei biomateriali, le cellule sono state fatte crescere sulla loro superficie sia in terreno differenziativo che in terreno di controllo, valutandone l'attività di fosfatasi alcalina e il calcio prodotto.

Le cellule MSC seminate su BioRough, SUM e SUMNa, così come quelle seminate su vetro hanno presentato elevati livelli di attività di fosfatasi alcalina dopo 14 giorni di differenziamento. Le MSC coltivate in medium osteogenico, anche in presenza di biomateriale, hanno mostrato una superiore attività fosfatasica rispetto a cellule indifferenziate.



**Figura 6:** Quantizzazione dei livelli di attività dell'enzima fosfatasi alcalina delle cellule sottoposte a differenziamento osteoblastico su vetro e sui 3 substrati di Titanio.

L'analisi quantitativa dei livelli di deposizione di calcio di cellule MSC coltivate in medium osteogenico, sui tre supporti, ha dimostrato che i livelli di deposizione di matrice calcificata risultano significativamente superiori rispetto a quelli prodotti da cellule indifferenziate.



**Figura 7:** Quantizzazione dei depositi di Calcio delle cellule sottoposte a differenziamento osteoblastico su vetro e sui 3 substrati di Titanio.

---

### **6.3 Identificazione di un protocollo per lo sviluppo di un mezzo di coltura per le proliferazione delle MSC in condizioni GMP**

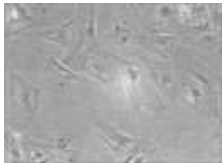
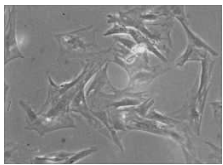
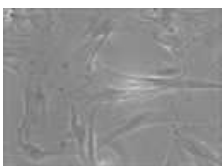
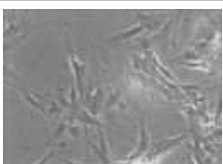





Le GMP (*Good Manufacturing Practices*) sono un insieme di regole, procedure e linee guida in base alle quali vengono prodotti farmaci, dispositivi medici, prodotti per la diagnostica e sostanze farmacologicamente attive. Nell'ambito della ricerca biotecnologica è particolarmente rilevante rispettare l'applicazione dei seguenti punti delle linee guida GMP:

- Non utilizzare sostanze derivanti da animali (siero)
- Non utilizzare citochine poiché alterano la crescita cellulare
- Possibile utilizzo di tutto ciò che è considerato *GMP grade*, quindi di tutto ciò che è prodotto sinteticamente (proteine, vitamine etc ...)
- L'utilizzo di sieri e citochine è ammesso solo a patto che nel periodo che precede il passaggio in clinica esse siano totalmente eliminate, mantenendo le cellule in un mezzo senza tali fattori, questo però comporta che prima di applicazioni in clinica sono necessarie analisi che dimostrino che tali fattori siano assenti.

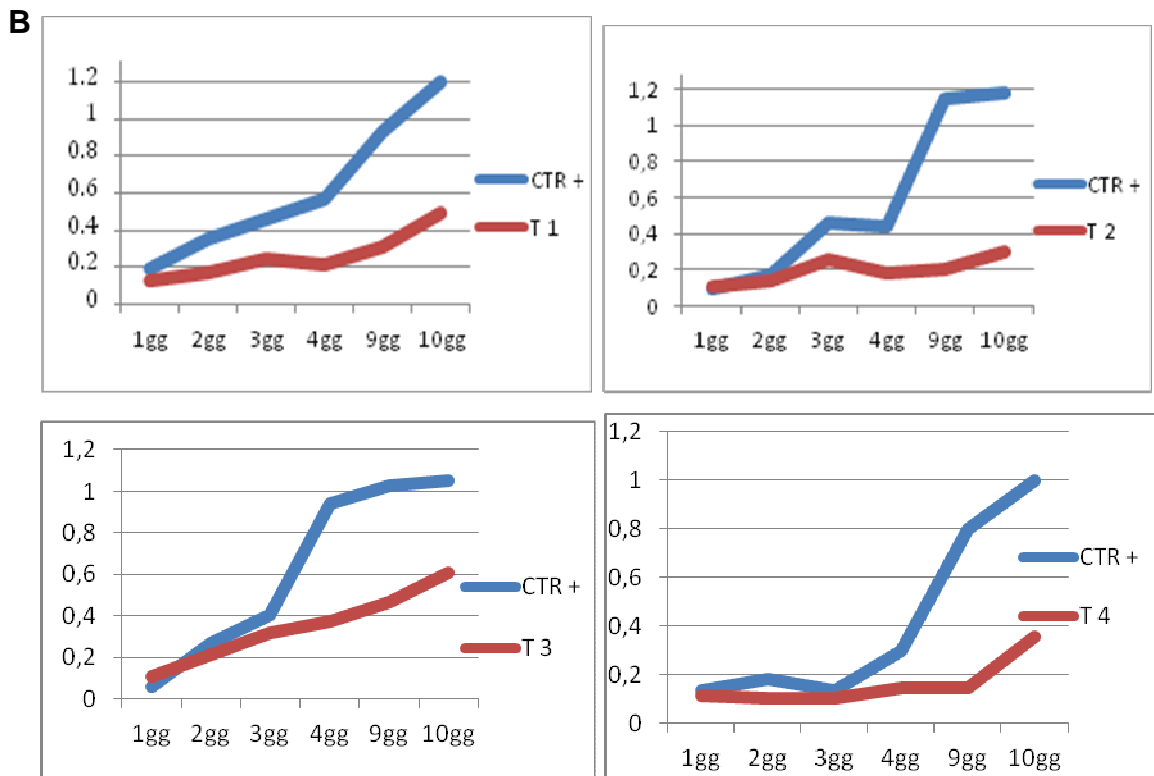
Quindi sono state effettuate una serie di prove per sviluppare un mezzo che favorisse la proliferazione cellulare e che rispettasse queste norme.

Per valutare se i mezzi sviluppati favorissero o meno la crescita cellulare, sono state realizzate delle curve di crescita per diversi giorni in coltura.

A

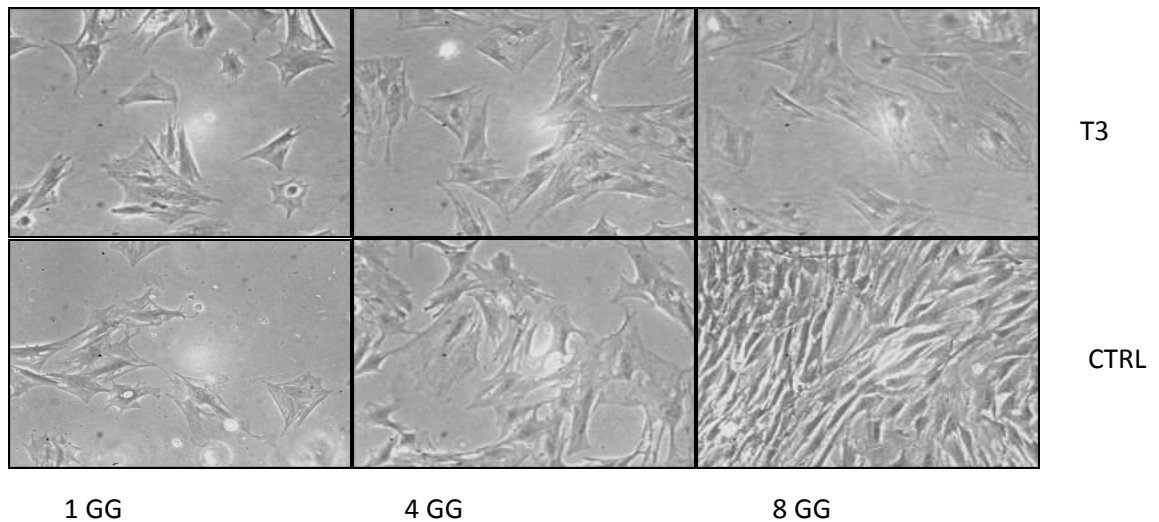
Codice mezzo	Caratteristiche principali *	Risultato	Immagine rappresentativa
T1	$\alpha$ -MEM/Glucosio/HBSS/ PenStrep/L-Glut	Cellule in buono stato di salute, proliferazione discreta	
T2	$\alpha$ -MEM/Piruvato/Glutamax/Glucosio	Cellule in buono stato di salute, proliferazione bassa	
T3	$\alpha$ MEM/EGF/Putrescina/Glucosio/Insulina	Cellule in buono stato di salute, proliferazione buona	
T4	$\alpha$ MEM/Putrescina/Glucosio/L-Cisteina	Cellule in buono stato di salute, proliferazione discreta	
T5	$\alpha$ MEM/EGF/Glutamax/Glucosio/Insulina	Cellule in stato di sofferenza, proliferazione assente.	
T6	$\alpha$ MEM/EGF/EGF/Glucosio/Insulina	Cellule in stato di sofferenza, proliferazione assente.	
T7	$\alpha$ MEM/EGF/Putrescina/Piruvato/Insulina/Vit D3/Glutamax	Cellule in buono stato di salute, proliferazione bassissima	
T8	$\alpha$ MEM/EGF/Putrescina/Glucosio/Glutamax	Cellule in stato di sofferenza, proliferazione assente.	
T9	$\alpha$ MEM/EGF/Putrescina/Glucosio/Insulina/Vit D3/Glutamax/insulina	Cellule in stato di sofferenza, proliferazione assente.	

\* Le specifiche concentrazioni e la natura dei componenti dei vari mezzi di coltura sono attualmente oggetto di studio di fattibilità per la deposizione di specifici brevetti e pertanto non possono essere condivise. Ai fini dello studio di questa tesi vengono qui riportati alcuni dei principali componenti dei mezzi di coltura



**Figura 8: (A)** tabella riassuntiva dei terreni testati  
**(B)** grafici rappresentativi di curve di crescita di 4 terreni testati sulle MSC.

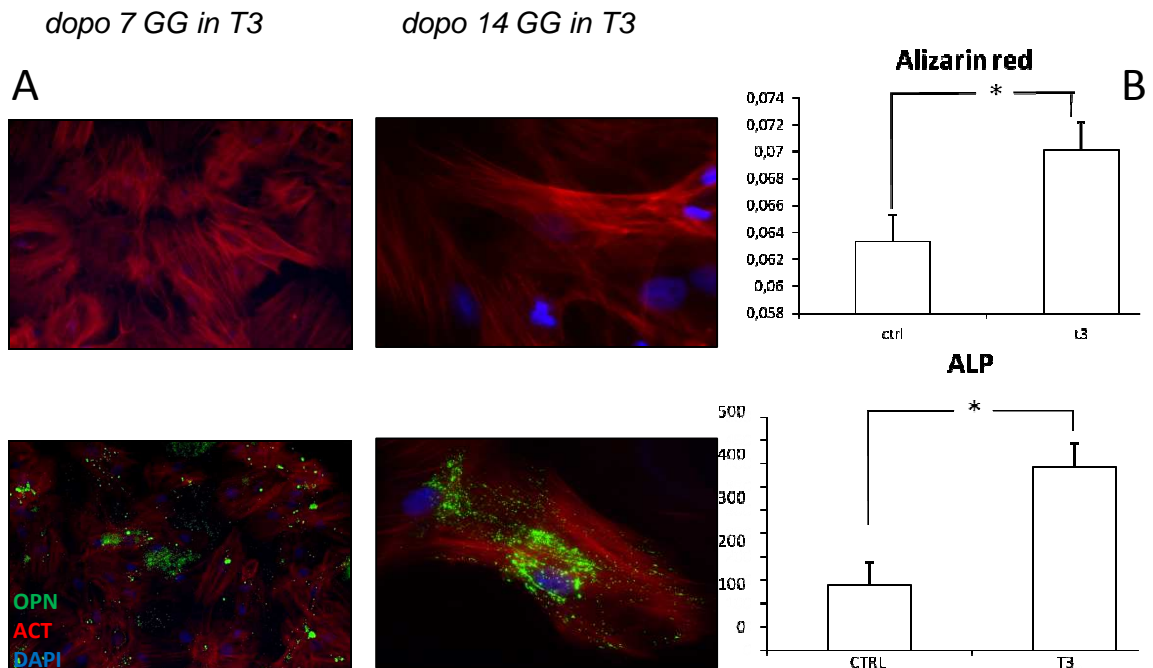
Osservando tutte le curve di crescita si evince che il mezzo più promettente potrebbe essere il T3 poiché è quello che si avvicina maggiormente ai livelli di crescita delle cellule in condizioni di controllo.



**Figura 9:** foto rappresentative di MSC mantenute in mezzo T3 (in alto) a 3 diversi tempi di coltura; MSC mantenute in condizioni di controllo a 3 diversi tempi di coltura.

### 6.3.1 Caratterizzazione delle MSC mantenute in mezzo T3

Poiché nelle cellule mantenute nel mezzo T3 si osservava una crescita più simile a quella delle cellule in condizioni di controllo e quindi in presenza di siero si è deciso di caratterizzarle in maniera più approfondita, inducendo il differenziamento osteoblastico per valutare se le MSC fossero ancora in grado di differenziarsi e quindi di mantenere la loro caratteristica di staminalità.



**Figura 10:** foto rappresentative di MSC mateneue in mezzo T3 per 7 e 14 giorni e sottoposte a differenziamento osteoblastico(in basso), mantenute in mezzo T3 (in basso). (B) Grafici di quantizzazione dei depositi di calcio (in alto) e dell'enzima fosfatasi alcalina (in basso).

Analisi morfologiche di immunocitochimica hanno evidenziato che dopo aver indotto il differenziamento osteoblastico con un marcatore specifico per l'osteopontina e dai saggi di Alizarin Red e Fosfatasi Alcalina, le cellule mantenute per 7 giorni e per 14 giorni a contatto con il mezzo T3 risultano essere ancora in grado di differenziare mantenendo quindi il loro potenziale di staminalità.

Il mezzo T3 ha mostrato il miglior indice di proliferazione e ha dimostrato non alterare la staminalità delle MSC, risultando essere un buon candidato per la proliferazione delle MSC e per il loro mantenimento in coltura in condizioni di GMP.



## **6.4 Transdifferenziamento delle MSC**

Esistono diverse evidenze che le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono in grado di transdifferenziare acquisendo un fenotipo differente da quello delle cellule del tessuto di appartenenza, se sottoposte a determinati stimoli. Il midollo osseo attualmente rappresenta la principale fonte di MSC, ma l'invasività del prelievo e la scarsa resa cellulare sono limiti che rendono queste cellule difficilmente utilizzabili per applicazioni di tipo clinico. Vari studi, (Gronthos et al., 2001; De Ugarte et al., 2003) hanno dimostrato che le MSC derivanti da altri tessuti sono comparabili, questo ha permesso di identificare in particolare le MSC isolate dal tessuto adiposo come una valida alternativa alle MSC estratte dal midollo osseo. Infatti è possibile estrarre il tessuto adiposo con un prelievo poco invasivo ottenendo un elevato numero di cellule; inoltre a differenza delle MSC estratte dal midollo osseo, le MSC isolate dal tessuto adiposo non diminuiscono la loro capacità differenziativa con l'età (de Girolamo et al. 2009).

Abbiamo quindi voluto identificare un protocollo per indurre il trans differenziamento delle MSC isolate dal tessuto adiposo in cellule del sistema nervoso centrale.

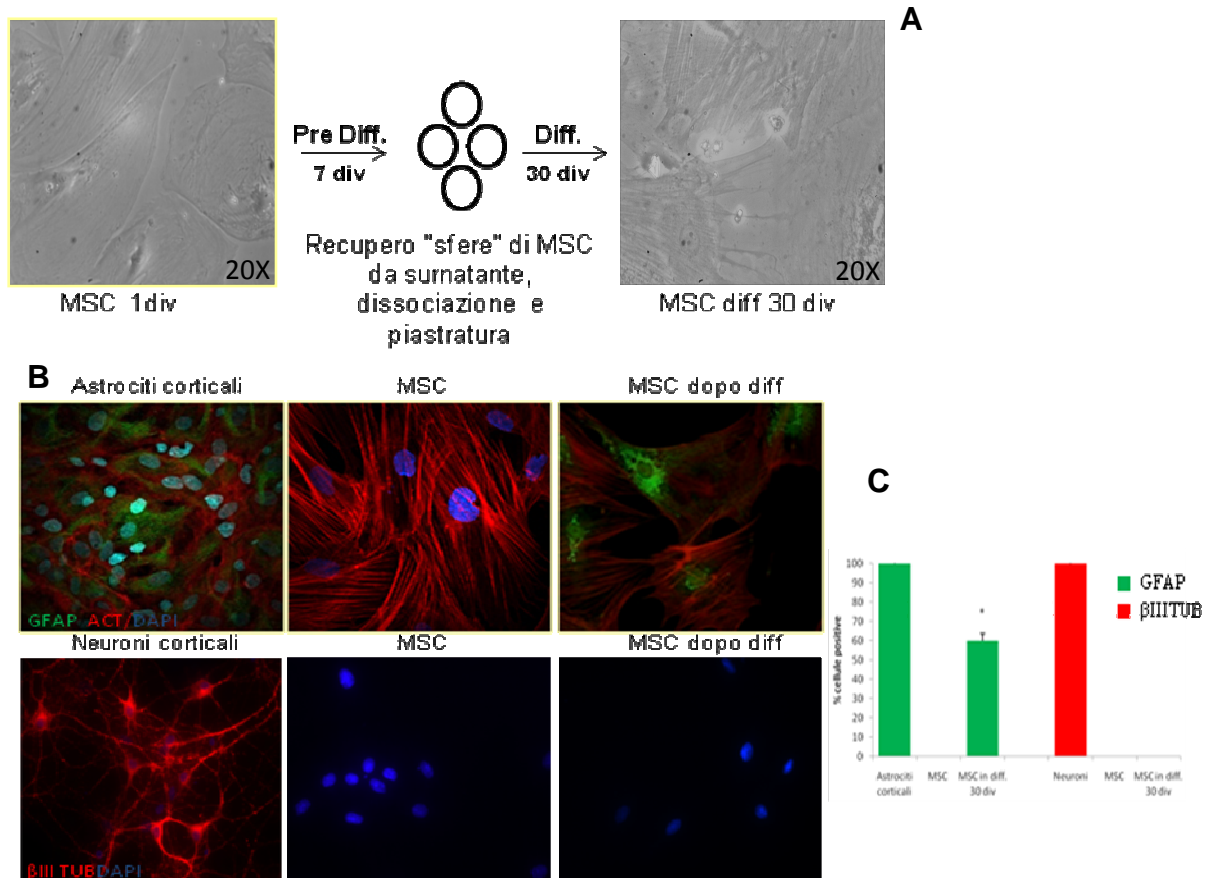
### **6.4.1 Trans-differenziamento delle MSC mediante formazione di sfere**

Per l'identificazione di un protocollo di differenziamento delle MSC in cellule del SNC inizialmente è stata valutata la replicabilità di altri protocolli già presenti in letteratura che inducessero il transdifferenziamento di cellule staminali, di origine differente dal tessuto adiposo, verso un fenotipo neuronale. A tale scopo, è stato valutato, con opportune modifiche, il mezzo differenziativo proposto per il transdifferenziamento delle cellule staminali mesenchimali umane estratte da tessuto adiposo proposto da Anghileri e collaboratori (Anghileri et al. 2007).

Le MSC (ad elevato passaggio in coltura >P8) sono state piastrate in fiasca (T75) e mantenute alla temperatura costante di 37°C e con il 5% di CO<sub>2</sub> fino al raggiungimento del 60-70% di confluenza; quindi, le cellule sono state tripsinizzate, piastrate in una capsula petri p100 ad una densità di 10.000 cells/cm<sup>2</sup> e mantenute in coltura per una settimana in un terreno privo di siero ma arricchito di bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) e hEGF (*human Epithelial Growth Factor*). In presenza di questi fattori le MSC sono in grado di formare aggregati fluttuanti di cellule (sfere) in 2-6 gg. Le sfere vengono quindi prelevate, centrifugate a 800 rpm, dissociate tramite pipetta pasteur e

piastrate su vetrini precedentemente trattati con poly-L-ysina (Sigma- Aldrich, Italia) ad una densità di 2000 cellule/cm<sup>2</sup> e mantenute in un mezzo di coltura composto da αMEM, FBS (siero fetale bovino), BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) e RA (all-trans acido retinico) per 30 giorni sostituendolo ogni 4-5gg.

Osservando le cellule mediante microscopia in campo chiaro abbiamo osservato che le MSC mantenute in terreno differenziativo per 30 gg, mostravano un cambiamento morfologico, passando da una morfologia piatta e larga, simile a quella dei fibroblasti in coltura, ad una morfologia tipica delle colture *in vitro* di tipo astro gliale (Fig. 11A).



**Figura 11:** **A:** Cellule MSC isolate dal tessuto adiposo di ratto (passaggio >8) piastrate in assenza di siero per 7 gg per permettere la formazione di sfere. Le sfere vengono dissociate e seminate su vetrini polilisinati per 30 gg. **B(pannello superiore):** Colorazione immunocitochimica mediante anticorpi diretti contro -*Glial Fibrillar Acidic Protein* (GFAP) in verde e actina (ACT) in rosso, di astrociti corticali primari di ratto cresciuti in terreno controllo, MSC cresciute in terreno controllo e MSC cresciute in terreno di differenziamento per 30 gg. **(pannello inferiore)** Colorazione mediante anticorpi diretti contro βIII Tubulina (rosso) di neuroni corticali cresciuti in terreno controllo, MSC cresciute in terreno controllo, MSC mantenute in terreno differenziativo per 30 gg. Il DAPI colora i nuclei (blu). Ingrandimento 40X **C:** Quantizzazione del numero di cellule GFAP positive (verde) o βIII tubulina (rossa) Dati espressi come media±SD, \*P<0,05.

Per poter meglio caratterizzare la natura di questi cambi morfologici, le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% e colorate mediante immunocitochimica con marcatori specifici del sistema nervoso centrale. Le cellule sono state colorate con un anticorpo policlonale diretto contro la GFAP (*Glial Fibrillar Acidic Protein*) (Fig.11B),

che è espressa in modo specifico dagli astrociti e con un anticorpo monoclonale diretto contro la  $\beta$ III tubulina che è una isoforma neurone-specifica della tubulina (Fig.11B), proteina del citoscheletro.

Le immagini successivamente quantificate mediante la conta delle cellule analizzando diversi campi hanno mostrato che oltre il 60% ( $60\pm 3,74$ ,  $n= 4$  campi,  $p<0,05$ ) delle cellule sottoposte a differenziamento erano GFAP positive, ma negative per la Beta III tubulina (Fig. 11C).

Questo protocollo però ha molti limiti uno dei quali è la scarsa quantità di cellule che si ottengono da sottoporre in differenziamento; infatti per poter ottenere una quantità di sfere, che sia accettabile, da sottoporre a differenziamento è necessario partire da una quantità di cellule troppo elevata. Inoltre la tempistica necessaria per l'ottenimento delle sfere da sottoporre a differenziamento è troppo lunga infatti è necessario che passino almeno 30 giorni, questo rende il protocollo non conforme alle norme delle GMP aumentano i rischi di eventuali cross contaminazioni.

#### **6.4.2 *Trans-differenziamento delle MSC mediante co-cultura con colture primarie di astrociti corticali***

Per migliorare l'efficienza di questo protocollo di differenziamento, le MSC sottoposte a differenziamento sono state messe in co-cultura con astrociti corticali di ratto. La scelta del tipo cellulare da mettere in co-cultura è stata fatta sulla base di dati in letteratura che suggeriscono che gli astrociti, oltre a dare un supporto meccanico passivo per la crescita dei neuroni, possono influire sull'estensione dei neuriti, mediante rilascio di citochine, proteasi e fattori di crescita e neurotrofici, e sullo sviluppo del neurone mediante il rilascio di sostanze mediato da meccanismi calcio-dipendenti (Volterra et al., 2005).

Il sistema di co-cultura che abbiamo utilizzato (Bartlett e Banker 1984) è un sistema in cui i due tipi cellulari non sono a contatto, ma condividono lo stesso terreno di crescita. In tal modo l'interazione tra le due popolazioni cellulari è mediata dal rilascio di fattori all'interno del terreno che condividono.

In particolare, le cellule derivanti dalle sfere di MSC sono state piastrate su vetrini copri oggetto trattati con poly-L-lisina e provvisti di piedini spaziatori di paraffina. Le cellule sono state mantenute nel mezzo di differenziamento per 7 giorni. Successivamente, i vetrini sono stati capovolti sul monostrato di astrociti con il lato su cui sono state piastrate le cellule rivolto verso gli astrociti in modo da permettere una comunicazione intercellulare mediata da fattori solubili fra le due colture cellulari. Sono state prese in

considerazione due condizioni sperimentali: nella prima, la co-coltura è stata mantenuta nel terreno di crescita solitamente utilizzato per le colture di astrociti corticali (Glial Cortex Medium); nell'altra, la co-coltura è stata mantenuta nel terreno di differenziamento (Fig. 12A).

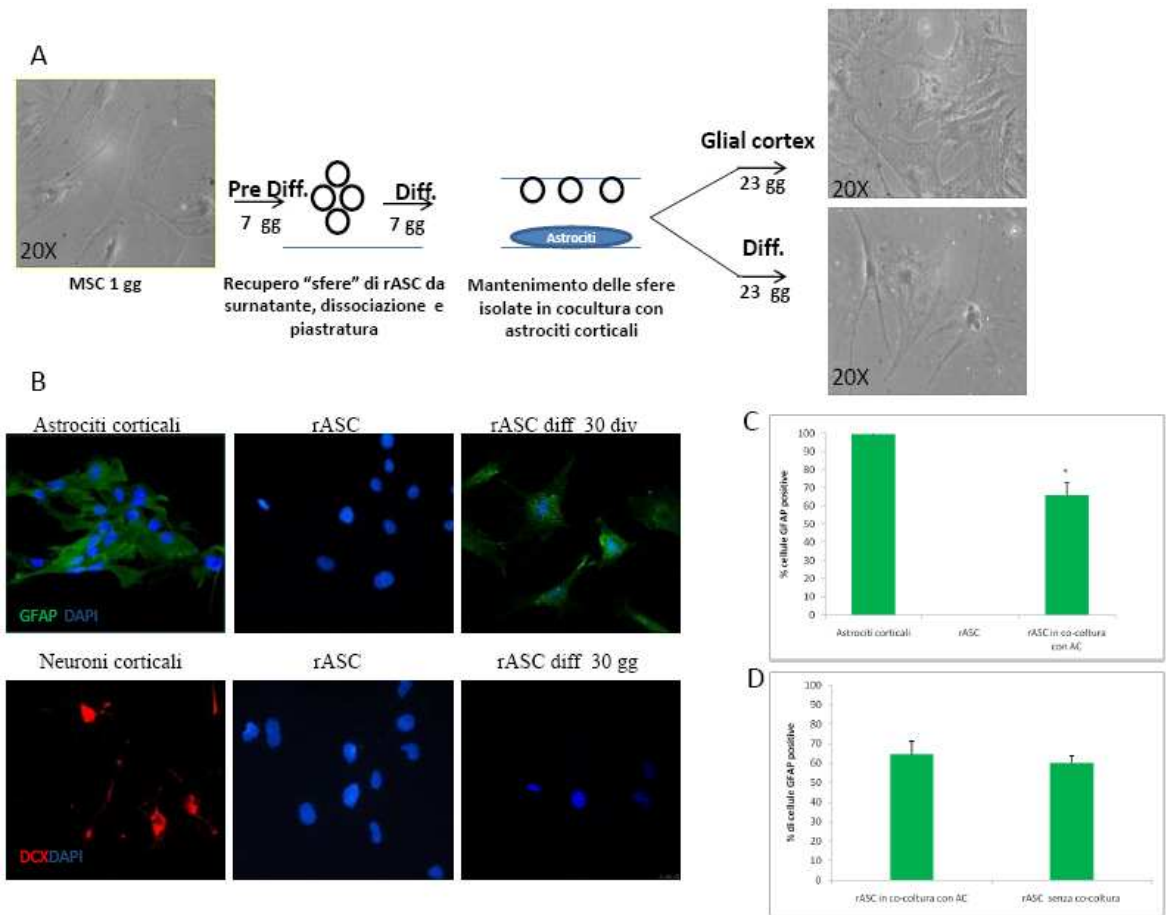
Osservando le cellule al microscopio si è visto che le cellule mantenute in terreno differenziativo subivano una evidente variazione morfologica, mentre le cellule nella seconda condizione sembravano riacquistare la morfologia originaria (Fig. 12A). Una delle ipotesi formulate è che l'elevata percentuale di siero presente nel mezzo di coltura degli astrociti interferisca con il differenziamento, inducendo le MSC a comportarsi come nella loro condizione basale.

Le cellule sottoposte a differenziamento sono state quindi fissate e, mediante tecniche di immunocitochimica, colorate con anticorpi specifici per GFAP (Fig.12B), e DCX (*DoubleCortin*), una proteina associata ai microtubuli espressa nei neuroni immaturi durante le prime fasi di sviluppo (Fig. 12B). Dall'analisi quantitativa è emerso che circa il 65% ( $64,5 \pm 6,2$ ,  $n= 5$ ,  $p < 0,05$ ) delle cellule erano positive per la GFAP mentre non è stata osservata alcuna positività per DCX (Fig 12C)

Le cellule, inoltre non erano positive neppure alla marcatura con Beta III tubulina, MAP-2 e olig2 (dati non mostrati).

Confrontando le cellule sottoposte a differenziamento in co-coltura con quelle differenziate in assenza di co-coltura non abbiamo notato un incremento significativo della percentuale di cellule differenziate (Fig.12D) quindi il trattamento delle MSC con un mezzo condizionato dalla presenza di cellule gliali non favorisce un aumento di efficienza del differenziamento.

Successivamente è stata allestita una co-coltura di MSC sottoposte a differenziamento in presenza di astrociti corticali a contatto con microglia primaria, per valutare se la presenza di cellule immunocompetenti residenti del sistema nervoso centrale potesse in qualche modo favorire la manifestazione del fenotipo neuronale (Fujimura J. et al 2005; Butovsky O. et al. 2005). La stessa co-coltura è stata replicata aggiungendo al terreno di coltura *IFN- $\gamma$*  (*Interferone- $\gamma$* ), una citochina in grado di indurre il rilascio da parte della microglia di fattori neurotrofici (Butovshy et al., 2005). In entrambi i casi l'osservazione qualitativa non ha mostrato particolari miglioramenti dell'efficienza di differenziamento (Dati non mostrati).

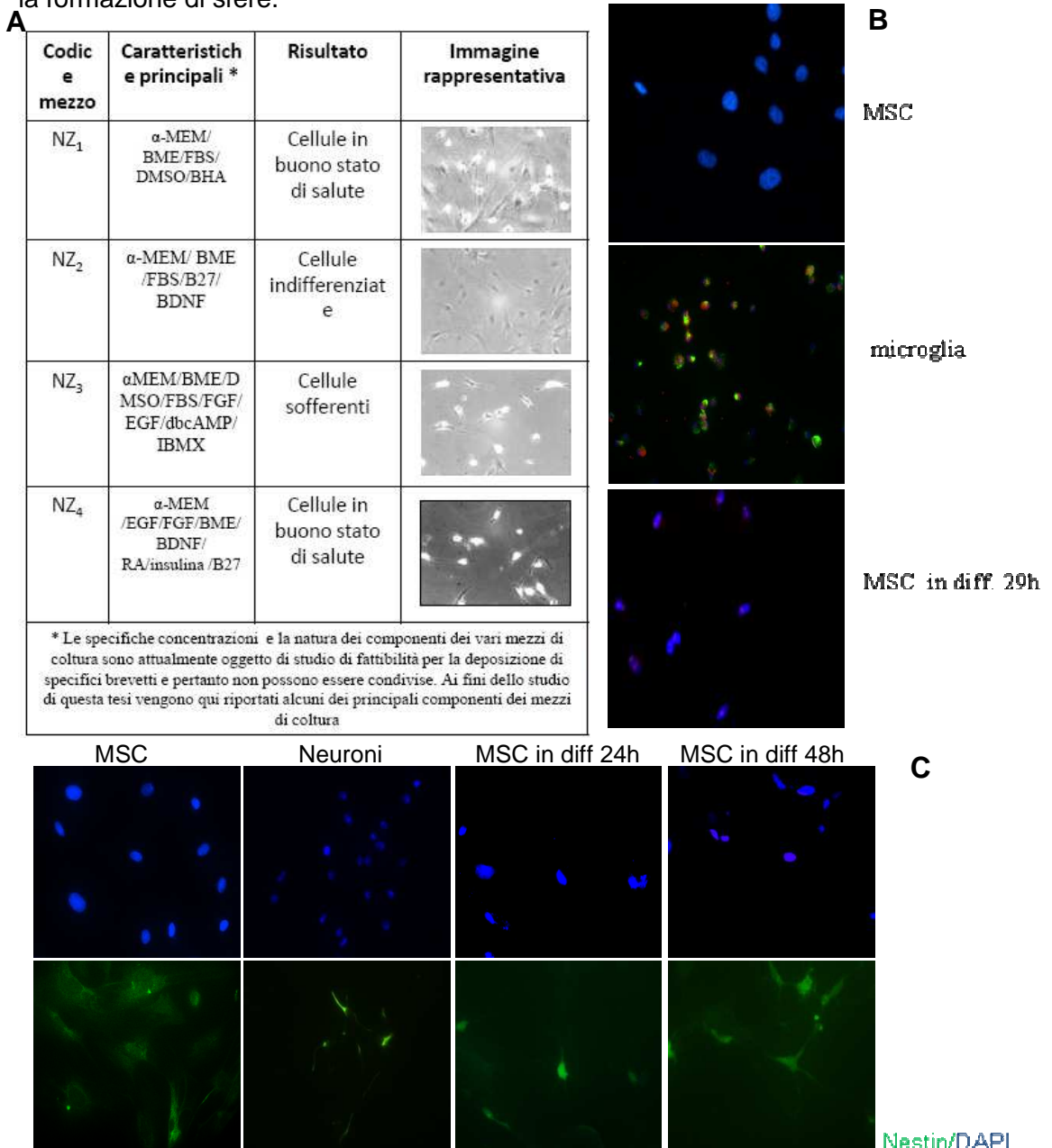


**Figura 12:** **A:** Cellule MSC isolate dal tessuto adiposo di ratto (passaggio >8) piastrate in assenza di siero per 7 gg per permettere la formazione di sfere. Le sfere sono state recuperate e piastrate, dopo dissociazione, su vetrini polilisinati e provvisti di piedini spaziatori di paraffina. Esse sono state mantenute in coltura nel mezzo differenziativo per 7 gg, quindi trasferite in co-cultura con astrociti corticali primari di ratto (AC) e successivamente mantenute in co-cultura per 23 gg con due diversi protocolli sperimentali: sfere MSC/AC in terreno astrocitario e sfere MSC/AC in terreno differenziativo. **B: (pannello superiore)** Colorazione immunocitochimica mediante anticorpi specifici per GFAP (verde) e ACT (rossa) di astrociti corticali cresciuti in terreno controllo, MSC cresciute in terreno di controllo e di sfere di MSC/astrociti corticali cresciute in terreno di differenziamento per 30 gg. **(pannello inferiore)** Colorazione mediante anticorpi diretti contro double cortin (rosso) di neuroni corticali cresciuti in terreno controllo, MSC cresciute in terreno di controllo, e sfere di MSC/AC cresciute in terreno di differenziamento per 30 gg. I nuclei sono colorati con DAPI (blu). Ingrandimento 40X. **C:** Quantizzazione della percentuale di cellule GFAP positive confrontando le MSC differenziate in co-cultura con le MSC indifferenziate (CTR-) e con astrociti corticali (CTR+); Dati espressi come media $\pm$ SD, \*P<0,05. **D:** Quantizzazione della percentuale di cellule GFAP positive: confronto tra MSC in differenziamento senza co-cultura con MSC in differenziamento con co-cultura. Dati espressi come media $\pm$ SD, \*P<0,05.

Per quanto interessante, questa procedura sperimentale di co-cultura ha manifestato significative carenze e limiti procedurali, come ad esempio una bassa disponibilità di cellule utilizzabili e una tempistica di trattamento troppo lunga per essere applicata in clinica.

### 6.4.3 Caratterizzazione di un mezzo proprietario per il differenziamento delle MSC in cellule del sistema nervoso centrale

Per superare i limiti sopra descritti si è deciso di studiare protocolli alternativi di differenziamento; si è deciso quindi di procedere con l'identificazione di un protocollo in grado di indurre un differenziamento diretto delle MSC in coltura, che non richiedesse la formazione di sfere.



**Figura 13 A:** Tabella riassuntiva dei diversi mezzi di coltura utilizzati per il differenziamento. **B:** Colorazione immunocitochimica con anticorpi specifici per Ib4 (verde) e olig2 (rosso) di MSC indifferenziate, microglia, MSC sottoposte a differenziamento NZ1 per 29 h. Ingrandimento 40x. **C:** Colorazione immunocitochimica mediante anticorpo per la Nestina (verde) di MSC indifferenziate, neuroni 2 div e di MSC a diversi tempi (24h, 48h) in coltura nel terreno differenziativo. Ingrandimento 40x

Il *primo* mezzo di differenziamento preso in considerazione (NZ1) è stato ottenuto apportando opportune modifiche al mezzo di coltura precedentemente sviluppato da Kang et al. nel 2006 per il differenziamento di cellule staminali mesenchimali umane isolate dal sangue del cordone ombelicale.

Una volta raggiunta una confluenza di circa il 70-80%, le MSC sono state piastrate su vetrini poli-L-lisinati ad una densità di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> e tenute in coltura con un primo mezzo di pre-differenziamento (pre DIFF) composto da:  $\alpha$ -MEM, BME ( $\beta$ -mercaptoetanol) e FBS per 24h, successivamente questo mezzo è stato sostituito con un mezzo di differenziamento (DIFF) composto da:  $\alpha$ -MEM, DMSO (dimetilsolforide) e BHA (*butylated hydroxyanisole*) per 5h (Fig. 13A).

Osservando le cellule mediante microscopio in campo chiaro è stato subito evidente il cambiamento morfologico delle cellule già durante le prime ore di trattamento (Fig. 13A). Le cellule infatti avevano assunto la morfologia tipica delle cellule microgliali, con corpi cellulari piccoli e tondi e con ramificazioni.

Quindi si è deciso di approfondire la caratterizzazione di queste cellule differenziate mediante colorazioni immunocitochimiche con anticorpi specifici sia delle cellule microgliali quale *ib4* sia degli oligodendrociti quale *olig2* (precursori oligodendrogliali) (Fig. 13B) In entrambi i casi le cellule non hanno mostrato alcuna positività per questi marcatori. I successivi tentativi di miglioramento del protocollo non hanno sortito gli effetti sperati. Infatti si è visto anche che le cellule sottoposte al trattamento con questo mezzo per più di 24h andavano incontro a necrosi; per questo motivo il protocollo di differenziamento è stato opportunamente cambiato.

Il *secondo* mezzo di differenziamento preso in considerazione (NZ2) (Egusa et al. 2005) era stato utilizzato su cellule staminali mesenchimali derivanti da midollo osseo per il trans differenziamento verso un fenotipo neuronale. Questo protocollo prevedeva che le MSC, una volta a confluenza, venissero tripsinizzate e piastrate su vetrini poli-L-lisinati ad una densità di 20.000 cellule/cm<sup>2</sup>, in un mezzo di coltura composto da  $\alpha$ -MEM, BME e FBS per 24h sostituito poi da un mezzo di differenziamento contenente  $\alpha$ -MEM, B27 (invitrogen) e BDNF per 10 giorni (Fig. 13A)

Osservando le cellule mediante microscopio a campo chiaro non è stato osservato alcun cambiamento morfologico significativo (Fig. 13A). Dopo aver apportato sensibili modifiche a questo protocollo, come il tempo di esposizione al mezzo di differenziamento e l'aumento delle concentrazioni dei fattori al suo interno senza ottenere alcun risultato interessante, si è deciso di non proseguire oltre nella caratterizzazione cellulare.

Il *terzo* mezzo di differenziamento preso in considerazione (NZ3) è stato invece sviluppato da Kang et al. nel 2009 e utilizzavano cellule mesenchimali staminali di

midollo osseo per l'induzione del fenotipo neurale. Questo protocollo, parzialmente modificato, prevedeva che, per indurre un fenotipo *neuronal-like*, le MSC venissero piastrate su vetrini poli-L-lisinati ad una densità di 20.000 cellule/cm<sup>2</sup> e mantenute in un mezzo di coltura composto da  $\alpha$ -MEM, BME e DMSO per 5 h. Il protocollo prevedeva anche che poi il terreno venisse sostituito da un secondo mezzo composto da:  $\alpha$ -MEM, FBS, FGF, EGF, dbcAMP (*dibutyryl cyclic AMP*) e IBMX (*isobutylmethylxanthine*) per 14 giorni (Fig. 13A)

Osservando le cellule sottoposte a differenziamento tramite microscopia in campo chiaro abbiamo visto un cambiamento morfologico evidente ma anche una generale sofferenza delle cellule in coltura. I successivi saggi di immunocitochimica con marcatori specifici neuronali hanno mostrato una totale negatività sia di marcatori neuronali specifici per stadi precoci (DCX) di sviluppo sia per quelli più tardivi, (Beta III tubulina) (dati non mostrati).

Analizzando quanto ottenuto da tutti e tre i protocolli testati abbiamo dedotto che non vi è alcuna riproducibilità dei protocolli già noti in letteratura usando MSC isolate dal tessuto adiposo di ratto. Inoltre la presenza di siero e di agenti chimici nelle composizioni del mezzo non li rende utilizzabili per studi clinici poiché l'implementazione di protocolli di terapia rigenerativa prevede l'applicazione di procedure e materiali conformi alle normative GMP (*Good Manufacturing Practices*).

Per questo motivo il processo di transdifferenziamento neurale da parte delle MSC ottenuto con fattori chimici, è già stato messo in discussione. Recentemente alcuni lavori, hanno dimostrato che sia il cambio morfologico che quello fenotipo osservati potrebbero essere solo una conseguenza di alterazioni da parte del citoscheletro e che una esposizione prolungata a fattori chimici potrebbe risultare mortale per le cellule (Barnabè et al., 2009).

Di conseguenza si è deciso di sviluppare un mezzo proprietario (NZ4) ideato in laboratorio sfruttando le conoscenze acquisite dalla letteratura e dall'esperienza pratica precedentemente descritta.

Il protocollo del mezzo proprietario NZ4 prevede di piastare le MSC ad un passaggio in coltura basso (P4) su vetrini poli-L-lisinati (0,5mg/ml) ad una densità di 20.000 cellule/cm<sup>2</sup> nel mezzo di controllo ( $\alpha$ -MEM, FBS) per 24h; in seguito il mezzo deve essere sostituito con un mezzo composto da  $\alpha$ -MEM, EGF e BME per 24h. Una volta trascorse le 24h il mezzo è stato sostituito con un nuovo mezzo composto da Neurobasal (GIBCO), BDNF, RA, dbcAMP, insulina e B27 per 3-5 gg.

La prima cosa che abbiamo osservato in campo chiaro è stato il cambio di morfologia che le cellule avevano subito, infatti esse erano passate da avere una forma piatta e



larga ad assumere un corpo cellulare rotondo con processi ben sviluppati dopo solo 24h nel terreno di differenziamento (Fig. 13A).

Poiché è noto che le MSC in grado di esprimere nestina (marcatore dei precursori delle cellule neuronali) sono in grado di differenziare verso un fenotipo neuronale (Wislet-Gendebien et al., 2005) è stata valutata la sua espressione da parte delle cellule sottoposte a differenziamento.(Fig. 13C). Le nostre cellule sono risultate essere positive per questo marcatore a diversi tempi di mantenimento in mezzo differenziativo sia dopo 24h che dopo 48h e 72h.

Alla luce di questi promettenti risultati preliminari su colture differenziate si è deciso di approfondire la caratterizzazione di queste cellule sottoposte a differenziamento.

Inizialmente è stata condotta una caratterizzazione mediante colorazioni di immunofluorescenza per valutare l'eventuale espressione di proteine presenti durante gli stadi più precoci dello sviluppo neuronale, quali DoubleCortin (DCX) che è una proteina associata ai microtubuli espressa in maniera specifica dai precursori neuronali e dai neuroni immaturi, e  $\beta 3$  tubulina che è un elemento dei microtubuli espresso esclusivamente nei neuroni tanto da essere considerato uno dei principali identificatori dei neuroni all'interno del SNC (Fig.14A); da parte delle cellule sottoposte a differenziamento per 24h, 48h e 72h. Le MSC esposte al mezzo di differenziamento NZ4 per 48h e 72h, contrariamente a quelle non sottoposte ad alcun trattamento di differenziamento, hanno mostrato positività per la Sinaptotagmina (SYT) che è una proteina integrale della membrana delle vescicole sinaptiche che interagisce in modo  $Ca^{2+}$ -specifico con proteine presenti nella membrana presinaptica favorendo l'ancoraggio delle vescicole alla membrana stessa, VAMP2 che è una proteina associata alle vescicole di membrana, Sinaptofisina che viene riconosciuta come una delle principali proteine che intervengono a livello delle vescicole sinaptiche p38 (Fig. 14B, 15A).

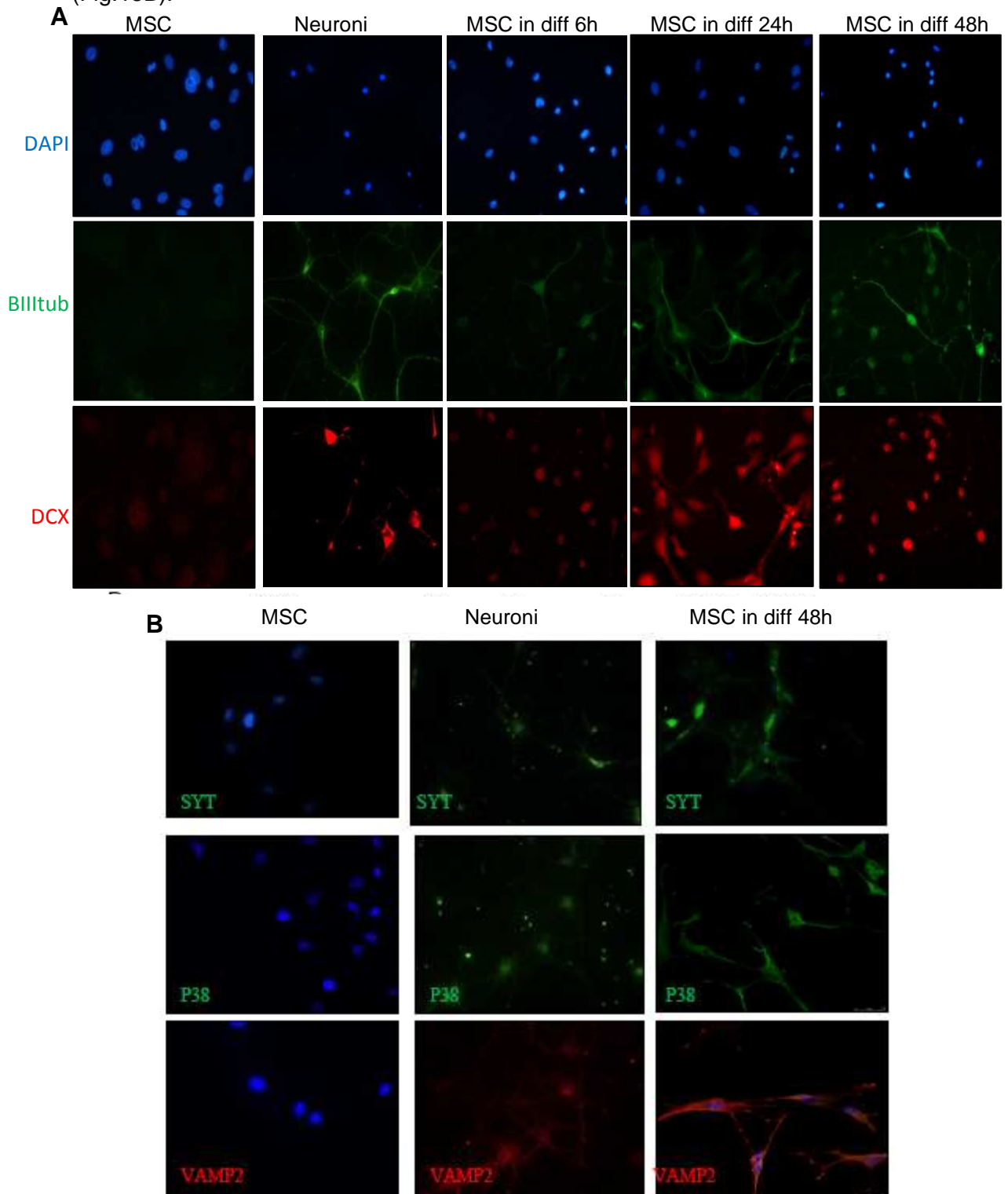
La positività a questi marcatori da parte delle MSC sottoposte a differenziamento è un dato molto interessante poiché si tratta di proteine specifiche neuronali e alcune di loro sono legate al trasporto delle vescicole sinaptiche presenti unicamente a livello del CNS.

Le MSC sottoposte al trattamento di differenziamento fino a 48h non hanno mostrato positività per SNAP25 cosa che invece sembrava essere presente nelle MSC in differenziamento per 72h.

Inoltre in seguito a quantizzazione è risultato che le percentuali di cellule che esprimevano i marcatori specifici neuronali da parte di cellule in differenziamento per 72h erano: *DCX*:  $47 \pm 2.5$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ;  *$\beta III Tub$* :  $37 \pm 4$ ,  $n=5$ ; *P38*:  $47 \pm 6,2$ ,  $n=3$ ,  $p < 0,05$ ;

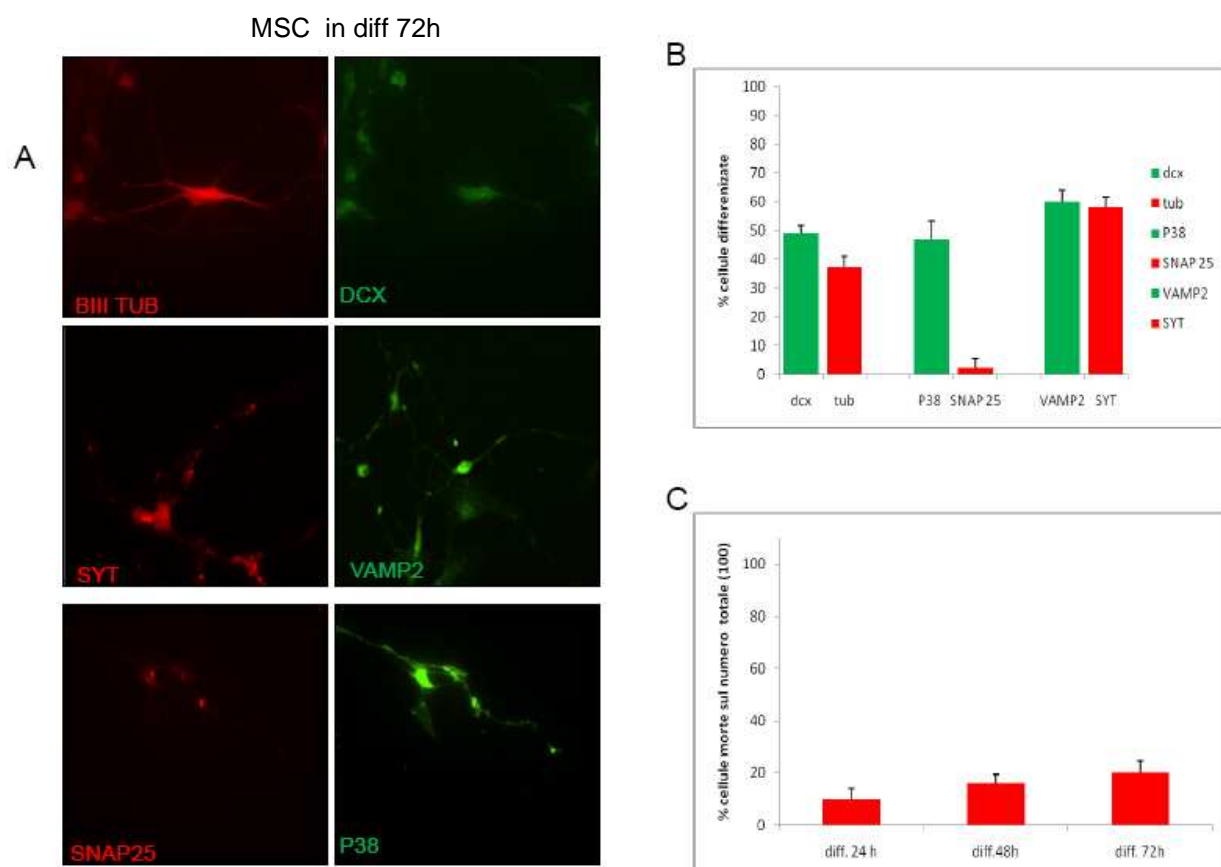
*SNAP25*:  $2 \pm 3,4$ ,  $n=3$ ; *VAMP2*:  $60 \pm 4,04$ ,  $n= 3$ ,  $p<0,05$  e *SYT*:  $58 \pm 3,5$ ,  $n=3$ ,  $p<0,05$ .

(Fig.15B).



**Figura 14:A:** Colorazione di immunofluorescenza mediante anticorpi diretti contro double cortin DCX (rossa) e BIIIItubulina (verde) di MSC indifferenziate, di neuroni corticali e di MSC in terreno di differenziamento (NZ4) a diversi tempi in coltura (6h, 24h, 48h. Ingrandimento 40x. **B:** Colorazione di immunofluorescenzaa mediante anticorpi diretti contro SYT e sinaptotagmina (verde), VAMP2(rossa) e P38 o sinaptofisina (verde) di MSC indifferenziate, di neuroni e di MSC mantenute in terreno di differenziamento (NZ4) per 48h. Ingrandimento 40x

In seguito alla caratterizzazione dell'espressione temporale di proteine specifiche dei diversi stadi di maturazione neuronale, abbiamo condotto una quantizzazione della percentuale di vitalità delle MSC sottoposte a differenziamento, questa valutazione è stata effettuata mediante la quantizzazione del rapporto fra i coloranti DAPI/PI; il DAPI si lega infatti a tutti i nuclei cellulari, mentre il PI (Propidio Ioduro) colora solamente i nuclei delle cellule che stanno subendo o che hanno già subito il processo di morte. Da questa analisi è emerso che circa l' 80% ( $11,6 \pm 4,6$ ,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ) delle cellule sottoposte a differenziamento per 72h rimangono vitali, questo ci ha indicato che il protocollo non è particolarmente dannoso per le cellule (Fig 15C).



**Figura 15:** **A:** Colorazione immunohistochemica di MSC mantenute in terreno di differenziamento per 72 h. (**pannello superiore**) DCX (verde) e BIIITUBULINA(rosso); (**pannello centrale**) SYT (rosso) e VAMP2 (verde); (**pannello inferiore**) SNAP25 (rosso) e P38 (verde). Ingrandimento 40X. **B:** Quantizzazione della percentuale di cellule positive ai vari marcatori testati. Il grafico evidenzia la percentuale di cellule  $\beta$ IIITubulina, DCX, P38, SNAP25, VAMP2, SYT delle MSC in differenziamento per 72h. Dati espressi come media $\pm$ SD. **C:** Quantizzazione indicante la percentuale di cellule morte. Marcatura DAPI/PI. Dati espressi come media $\pm$ SD, \* $P < 0,05$

In seguito si è proceduto con una caratterizzazione delle MSC sottoposte a differenziamento nel mezzo NZ4 mediante la valutazione dell'espressione di specifici geni dello sviluppo neuronale ai diversi stadi di differenziamento.

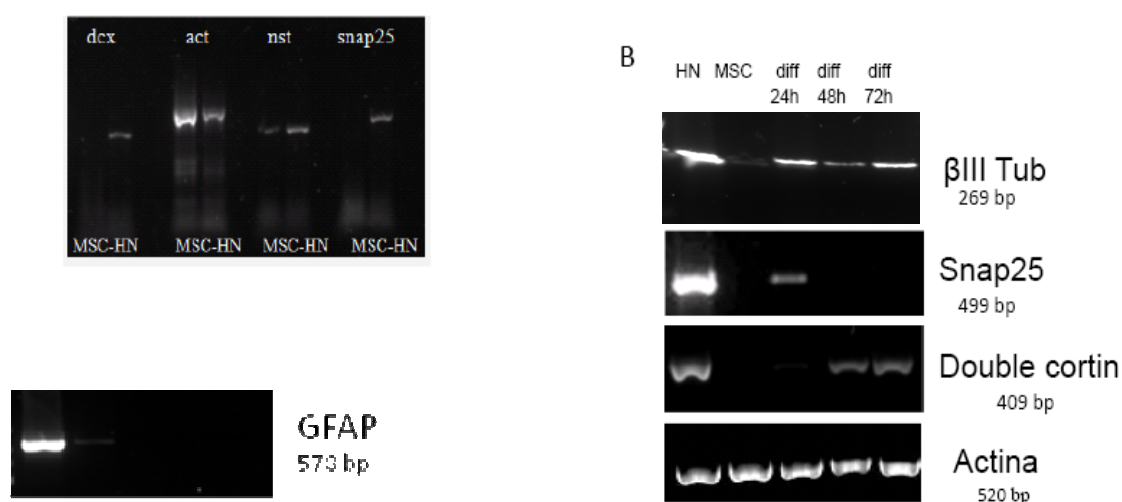
Quindi è stato isolato l'mRNA dalle cellule sottoposte a differenziamento con NZ4 a diversi tempi e successivamente è stato retro trascritto in cDNA.

Tutti i primers utilizzati sono stati disegnati mediante un programma on-line (Primer3) e per testare la loro specificità abbiamo effettuato delle PCR di controllo (Fig. 16A). Come controllo negativo sono state utilizzate MSC indifferenziate mentre come controllo positivo sono stati utilizzati neuroni ippocampali maturi di ratto a 7 DIV.

L'analisi qualitativa delle PCR ha permesso di confermare la positività per Nestina,  $\beta$ III tubulina e DCX ma l'assenza di SNAP25 (Fig. 16B). Poiché l'espressione di SNAP25 è stata invece osservata in immunofluorescenza, lo studio di questo gene merita ulteriori approfondimenti per capire la modulazione dell'espressione in funzione del tempo in coltura. Inoltre è stata verificata l'assenza di altri marcatori per tipi cellulari non neuronali come la GFAP, questa proteina è normalmente assente nei neuroni ma è fortemente espressa dagli astrociti (Sofroniew MV. 2012).

A

Primer	Primer sense	Primer antisense
$\beta$ actina	TGACGGGGTCACCCACTGTGCCCATCTA	CTAGAAGCTTGCGGTGGACGATGGAGGG
Nestin	ACCCGGTACAGGAGTCTGTG	AATCCCCATCTACCCCACTC
Doublecortin	TCGCTCAAGTGACCAACAAG	TGCCACTCTCCTGAGATCCT
Snap25	AGGACGCAGACATGCGTAATGAACTGGAGG	GTTGGAGTCAGCCTTCTCCATGATCCTGTC

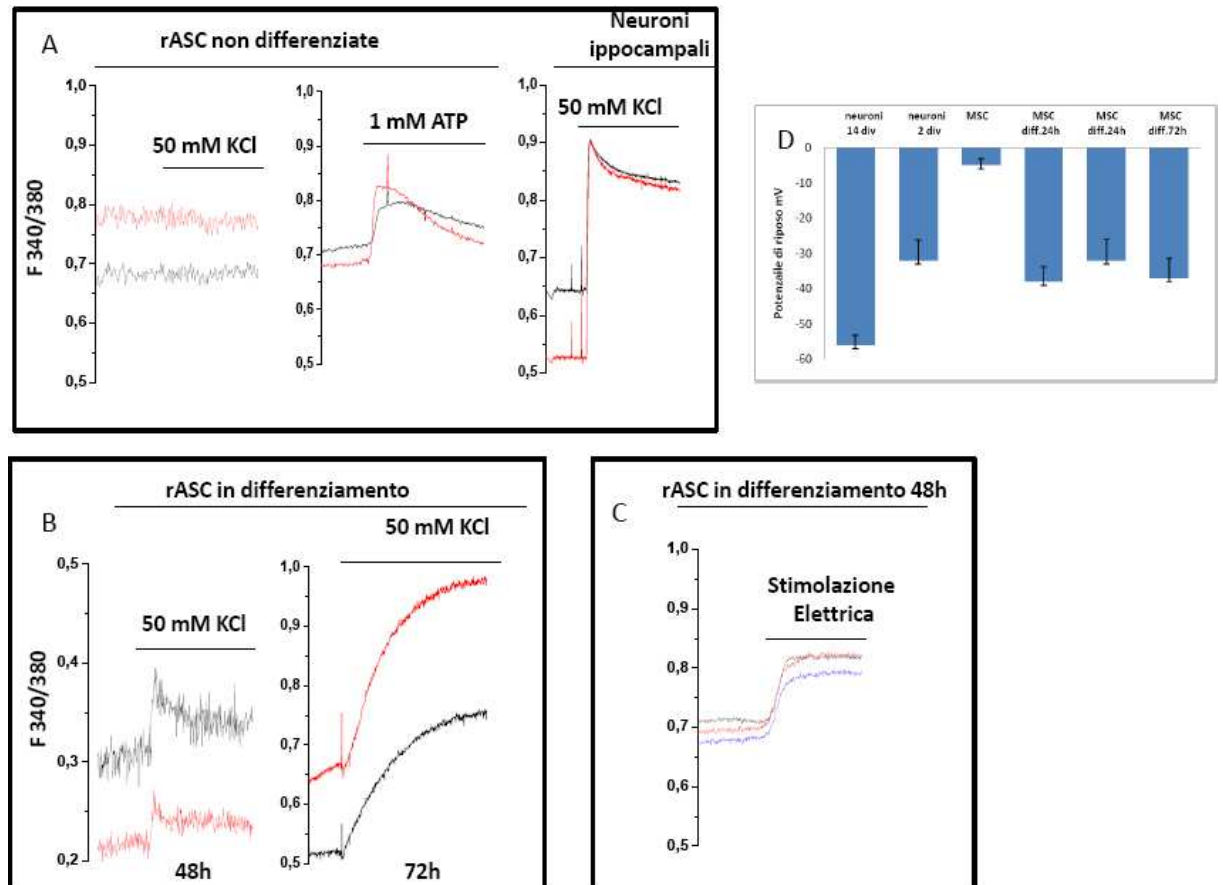


**Figura 16:** **A:** Primers disegnati per prove di PCR con cDNA di MSC non differenziate (CTR-) e di HN (CTR+). **B:** analisi dell'espressione genica su cDNA di neuroni ippocampali mantenuti nel loro terreno di crescita (CTR+); cDNA di MSC mantenute nel loro terreno di crescita (CTR-); cDNA di MSC in terreno differenziativo per 24h-48h e 72h. L'espressione dell'actina è usata come controllo interno.

### **6.4.3.1      *Analisi funzionale delle MSC differenziate***

La caratterizzazione molecolare dell'espressione di proteine specifiche del sistema nervoso centrale da parte di MSC sottoposte a differenziamento ha permesso di ipotizzare un effetto importante del mezzo NZ4 nell'indurre il loro transdifferenziamento in senso neuronale. Al fine di caratterizzare meglio questo processo differenziativo, anche dal punto di vista funzionale, sono stati effettuati esperimenti funzionali su MSC a diversi tempi sperimentali di differenziamento, neuroni primari agli stessi tempi in coltura e su MSC non sottoposte ad alcun trattamento di differenziamento. Questi studi funzionali sono stati effettuati mediante analisi quantitative delle variazioni dei livelli di calcio intracellulari misurate con registrazioni di imaging per il calcio su singola cellula, sia tramite valutazione quantitativa delle variazioni dei potenziali di membrana tramite registrazioni elettrofisiologiche in modalità patch clamp.

Tramite acquisizioni ratiometriche delle dinamiche di calcio su singola cellula è stato possibile valutare qualitativamente la risposta funzionale di cellule MSC sottoposte ad uno stimolo di depolarizzazione classico utilizzato per la stimolazione neuronale quale 50mM KCl. E' stato possibile osservare che le colture MSC non differenziate non rispondono a stimolazione con 50mM KCl, tipica stimolazione utilizzata per depolarizzare i neuroni (Fig. 17A) mentre, come atteso, sono in grado di rispondere ad una stimolazione di tipo purinergico (1mM ATP) (Fig.17A). Le cellule MSC sottoposte a differenziamento in mezzo NZ4, invece, mostrano una parziale risposta alla stimolazione con KCl, con una cinetica che varia a seconda del tempo di mantenimento in mezzo di differenziamento. Le MSC in differenziamento da 48h mostrano una risposta con un'ampiezza ridotta rispetto a quella osservata in cellule in differenziamento per 72h (Fig. 17B). Analizzando la cinetica si osserva che la risposta delle MSC in differenziamento per 72h non assomiglia alla risposta osservata in neuroni ippocampali maturi (Fig. 17A), tuttavia essa risulta paragonabile alla risposta funzionale ottenuta da neuroni in fase di sviluppo, come precedentemente dimostrato da studi condotti, indicando che la maturazione è in corso (Pravettoni et al. 2000). Sorprendentemente, le MSC in mezzo differenziativo non solo mostrano un fenotipo significativamente diverso, dalle stesse cellule mantenute in normali condizioni di coltura, a seguito di una stimolazione con KCl, ma risultano essere anche in grado di rispondere con flussi di calcio a seguito di una stimolazione elettrica di campo (Fig. 17 C), caratteristica questa solo delle cellule elettricamente attive come i neuroni.



**Figura 17:** **A:** Grafico rappresentativo delle registrazioni di imaging per il calcio su singola cellula relative all'analisi temporale della risposta dopo uno stimolo depolarizzante con 50mM KCl e con 1mM ATP. Le MSC contrariamente ai neuroni ippocampali non rispondono allo stimolo con KCl. Le MSC indifferenziate sono comunque vive poiché mostrano un basale omogeneo e rispondono a stimolazione con ATP. **B:** Grafico rappresentativo delle registrazioni di imaging per il calcio su singola cellula relative all'analisi temporale della risposta dopo uno stimolo depolarizzante con 50mM KCl. Le MSC in differenziamento per 48h mostrano una risposta allo stimolo depolarizzante con un'ampiezza ridotta rispetto a quella osservata in MSC sottoposte a differenziamento per 72h. La risposta delle MSC differenziate per 72h non è paragonabile alla risposta data dai neuroni ippocampali maturi ma risulta paragonabile a quella data dai neuroni nei primi giorni di sviluppo (Pravettoni et al 2000). **C:** Grafico rappresentativo delle registrazioni di campo con stimolazione elettrica su MSC a 48h. **D:** Quantizzazione delle registrazioni elettrofisiologiche in modalità patch clamp del potenziale di membrana a riposo (mV). Comparazione dei potenziali di riposo di diverse popolazioni cellulari: Neuroni 2 div, neuroni 13 div, MSC non differenziate, MSC differenziate 24h-48h-72h.

Inoltre, mediante registrazioni di elettrofisiologia in modalità patch clamp, si è vista una variazione del potenziale di membrana delle MSC in differenziamento rispetto alle MSC non differenziate. In particolare, il potenziale di riposo delle MSC in differenziamento è comparabile a quello di neuroni ippocampali durante le prime fasi di maturazione. Infatti, il potenziale di riposo delle MSC differenziate (24h  $-38 \pm 4,3$ ,  $n=5$ ; 48h  $-32 \pm 5,9$ ,  $n=7$ ; 72h  $-38 \pm 5,9$ ,  $n=6$ ) (Fig. 17D) è comparabile a quello registrato nei neuroni durante i primi stadi di sviluppo (2 div  $-32 \pm 5,8$ ,  $n=4$ ; 13 div  $-56 \pm 2,7$ ,  $n=8$ ) (Fig. 17D). In condizioni di controllo le MSC non mostrano una differenza di potenziale a cavallo della

membrana, pertanto la sua rilevazione su cellule sottoposte a differenziamento probabilmente è indice di un effettivo trans differenziamento.

Complessivamente, questi dati supportano un chiaro effetto del mezzo NZ4 a favore del differenziamento delle MSC da tessuto adiposo di ratto verso un fenotipo neuronale. Le cellule mantenute in NZ4 non solo esprimono marcatori specifici dei diversi stadi di sviluppo neuronale, ma acquisiscono la capacità di rispondere a KCl, mostrano influssi di calcio a seguito di una stimolazione elettrica di campo e variano il potenziale di membrana a riposo. Questi dati preliminari meritano ulteriore approfondimento dei meccanismi cellulari coinvolti e saranno oggetto di ulteriori studi sia *in vitro* che *in vivo* per caratterizzare meglio la loro potenziale applicabilità in scopi di medicina rigenerativa.

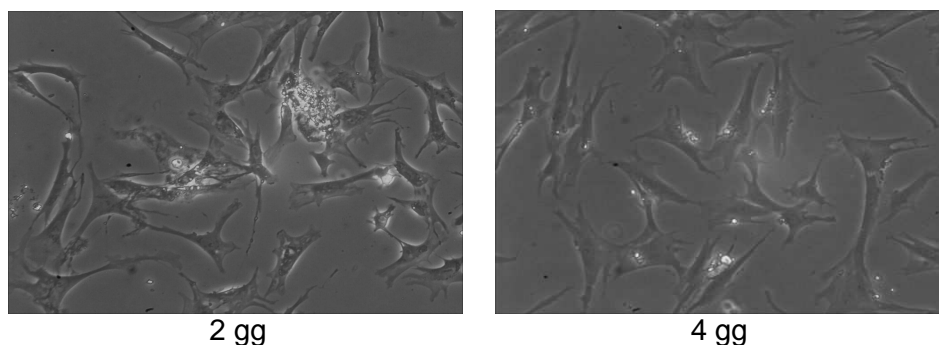
### **6.5 Sviluppo *in vitro* di sistemi cell carrier per iniezione *in vivo***

Per poter, in futuro, testare una iniezione *in vivo* delle MSC (eventualmente differenziate e non) è stato testato *in vitro* un idrogel che potesse permettere un'iniezione localizzata e diretta delle cellule. Questo idrogel è stato messo a punto dal laboratorio di Biocell del politecnico di Milano, ed è composto da sostanze biocompatibili, vi sono state incapsulate le cellule al suo interno per poterne valutare la loro sopravvivenza.

Sono state incapsulate le MSC indifferenziate all'interno dell' idrogel per circa 48 ore, in seguito si è proceduto con la piastratura delle cellule estratte dal gel su superficie di vetro.

Prima della piastratura le cellule vive sono state contate con l'utilizzo del colorante Trypan Blue per verificare la percentuale di sopravvivenza che è risultata essere di circa il 70%.

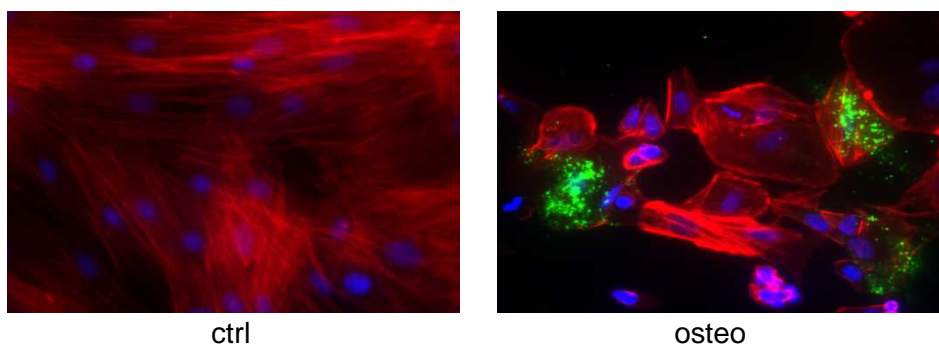
Dopo aver piastrato le cellule su vetrini le abbiamo monitorate per vedere se residui di gel potessero in qualche modo impedire alle cellule di aderire al vetro e quindi di proliferare.



**Figura 18:** foto in campo chiaro rappresentative di MSC estratte dall'idrogel dopo 2 diversi tempi in coltura.

Quindi si è osservato che le cellule sono in grado di aderire al vetro e di proliferare *in vitro* con una corretta morfologia.

Successivamente per verificare che il processo di incapsulamento nel gel non avesse in qualche modo alterato il loro potenziale di staminalità è stato indotto loro il differenziamento in direzione osteoblastica (vedi par...



**Figura 19:** immagini rappresentative di MSC estratte dall'idrogel e sottoposte a differenziamento osteoblastico.

Si è osservato che dopo 7 giorni in coltura le cellule a contatto con il mezzo di differenziamento osteoblastico, a differenza di quelle mantenute in condizioni di controllo, mostrano una evidente positività all' osteopontina che è un marcatore specifico di cellule osteoblastiche. Questo risultato ha permesso di sostenere che le cellule in seguito ad un incapsulamento nell'idrogel durato 48 ore non avevano subito danni per quanto riguardava il loro potenziale di staminalità.

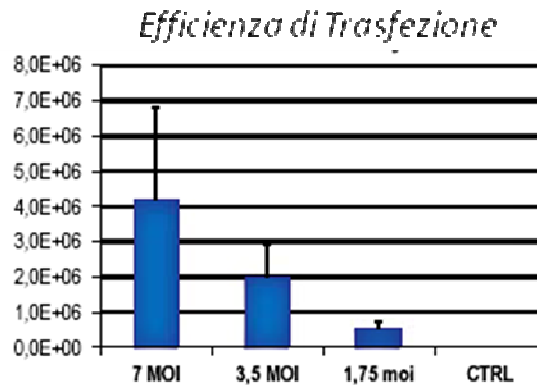
## **6.6 Messa a punto di un protocollo affidabile per marcare le MSC utilizzando un vettore lentivirale che esprima Luciferasi**

Poiché il passo successivo di questo studio sarà quello di iniettare in modelli animali in vivo MSC differenziate e non, si è reso necessario studiare un protocollo affidabile e sicuro che trasfettasse in maniera stabile le MSC senza arrecarne danno al tessuto di destinazione. E' infatti importante valutare il comportamento cellulare una volta iniettate



per capire il loro grado di attecchimento ed il ruolo funzionale. L' imaging rappresenta un valido approccio per lo studio *in vivo* di parametri quali la distribuzione cellulare, la sopravvivenza, la localizzazione e il destino delle cellule iniettate riducendo la variabilità inter-individuale e il numero di animali da utilizzare per lo studio.

A tale scopo, le MSC isolate da tessuto adiposo sono state infettate con diverse concentrazioni di un vettore lenti virale contenente luciferasi.

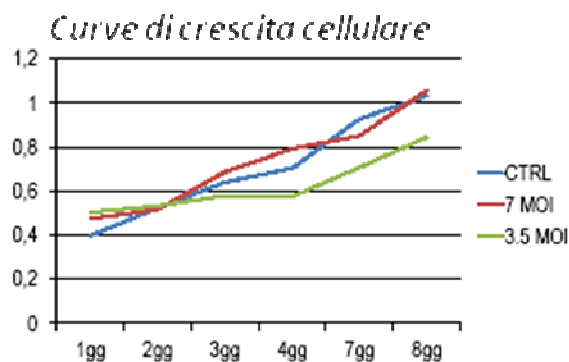


**Figura 20:** Espressione della luciferasi in MSC infettate con diversa quantità di virus PLW (1,75, 3,5 e 7 MOI).

Successivamente le MSC infettate sono state analizzate per testare eventuali variazioni rispetto alle cellule non trattate di controllo per quanto concerne la vitalità, la morfologia e

capacità di differenziare in osteoblasti.

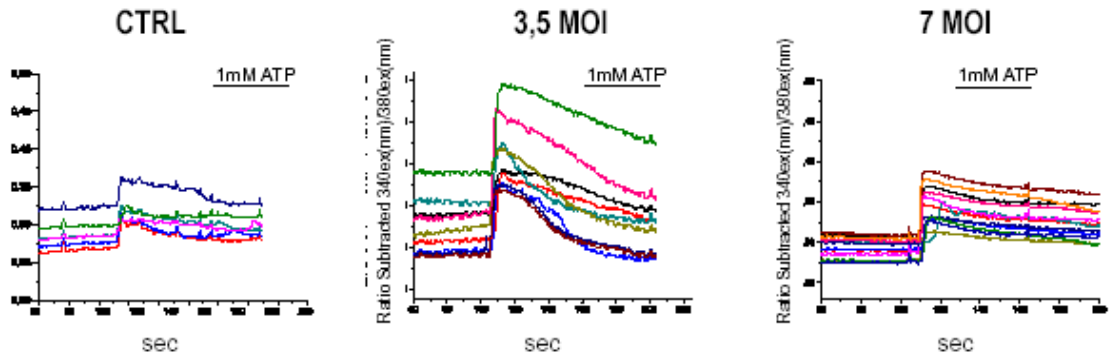
Quindi sono state effettuate delle curve di crescita cellulare, mediante colorazione con cristal violetto, sia di cellule in condizioni di controllo sia delle cellule trasfettate con differenti concentrazioni di virus.



**Figura 21:** Curve di crescita effettuate mediante cristal violetto di MSC mantenute in condizioni di controllo e infettate con diverse concentrazioni di virus.

Come si evince dal grafico le cellule infettate con diverse concentrazioni di virus mostrano un tasso di proliferazione paragonabile a quello delle MSC mantenute in condizioni di controllo.

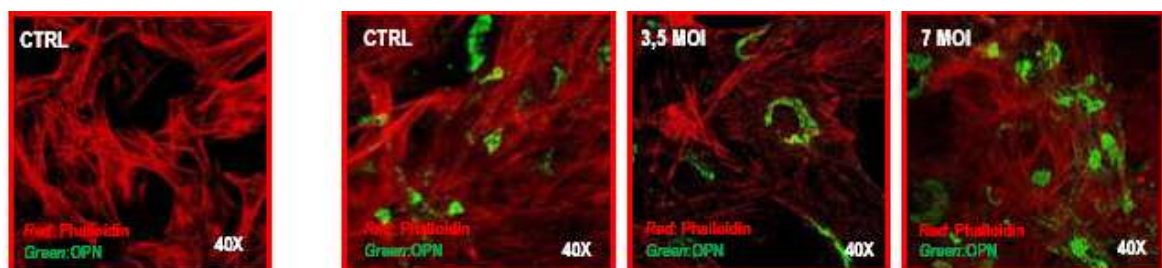
Successivamente sono state analizzate le variazioni di calcio intracellulare su singola cellula mediante stimolazione con ATP 1mM, per valutare che la funzionalità cellulare fosse rimasta intatta.



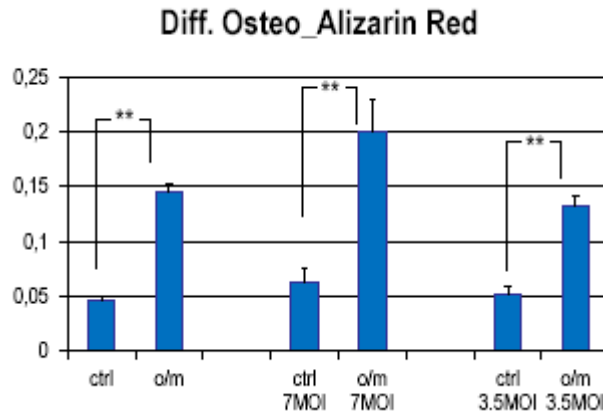
**Figura 22:** Tracce rappresentante di acquisizioni radiometriche calcio su MSC

Sia le MSC di controllo che quelle infettate con differenti concentrazioni di virus rispondono con variazioni di calcio intracellulare se stimolate con ATP 1mM. È stato osservato anche che le cellule infettate rispondono allo stimolo, anche se con un picco di intensità differente rispetto a quello registrato con le cellule non infettate, saranno quindi necessari ulteriori studi per comprendere le ragioni di questa differenza funzionale, probabilmente dovuta ad una diversa espressione dei recettori purinergici coinvolti dalla stimolazione con ATP.

Infine queste cellule infettate sono state sottoposte al protocollo di differenziamento osteoblastico, per valutare che avessero mantenuto le loro proprietà di staminalità. Quindi dopo 7 giorni di differenziamento osteoblastico mediante colorazione immunocitochimica è stata verificata la presenza di un marcatore specifico delle cellule osteoblastiche, l' osteopontina, sulle cellule sottoposte a differenziamento infettate con il virus non rispetto al controllo. Dopo 21 giorni di differenziamento invece sono stati valutati i depositi di calcio formati mediante il saggio dell'Alizarin Red.



**Figura 23:** Immagini di colorazioni di immunofluorescenza di cellule sottoposte a protocollo di differenziamento osteoblastico. Le cellule sottoposte a differenziamento mostrano positività al marcatore specifico osteoblastico: osteopontina (verde).



**Figura 24:** Valutazione quantitativa di depositi di calcio mediante colorazione con Alizarin Red. Le cellule infettate (3,5 e 7 MOI) conservano il loro potenziale differenziativo quando coltivate in mezzo osteogenico rispetto al controllo.

Visti questi ultimi risultati si è concluso che il protocollo applicato per trasfettare in maniera stabile le MSC è risultato efficiente e non altera le proprietà biologiche. L'inserimento della luciferasi è risultata essere una tecnica affidabile per studiare il comportamento in vivo ed ex vivo delle MSC al fine di stabilire efficaci strategie terapeutiche.

# ***DISCUSSIONE***

La medicina rigenerativa è una delle aree delle biotecnologie avanzate con i maggiori progressi dal punto di vista scientifico accompagnati però da scarse applicazioni in campo medico. Spesso le terapie rigenerative attuali sono basate su formazione di tessuti artificiali che vengono poi impiantati oppure sull'introduzione di cellule staminali nell'organismo al fine di riparare tessuti o trattare alcuni disturbi.

La terapia cellulare rappresenta una promettente alternativa per il trattamento di una vasta area di patologie, tra cui quelle neurodegenerative come ad esempio Parkinson, Huntington ed Alzheimer, per le quali, purtroppo, non sono tuttora disponibili terapie farmacologiche curative, ma solo trattamenti sintomatici e palliativi, di efficacia limitata nel tempo.

Il principale problema di questo tipo di terapia è rappresentato dall'origine e dalla natura delle cellule da utilizzare. Attualmente la comunità scientifica mostra un forte interesse nel potenziale utilizzo delle cellule staminali adulte per il trattamento di queste patologie. In particolare, numerose sono le aspettative nei confronti delle MSC, cellule staminali adulte multipotenti che possiedono capacità differenziative e una notevole plasticità che permettono loro di differenziare non solo in tipi cellulari di derivazione mesodermica (Wakitani et al., 1995) ma, in particolari condizioni, anche di assumere il destino di cellule eso- ed endo-dermiche (Javazon et al., 2004). L'utilizzo di queste cellule permetterebbe, inoltre, di superare tutte le discusse problematiche di natura etica legate all'uso di cellule staminali di derivazione embrionale.

In particolare, lo sviluppo di strategie di terapia cellulare per la cura di danni a livello del sistema nervoso centrale rappresenta un importante obiettivo della medicina rigenerativa. Nonostante la neurogenesi sia mantenuta anche nell'adulto, le scarse conoscenze attuali sui meccanismi che controllano la genesi di nuovi neuroni impediscono di sfruttare questi meccanismi di riparazione endogena a fini riparativi in caso di lesione cerebrale, dove il danno spesso prevale sull'attività ricostruttiva. L'utilizzo di cellule staminali in grado di differenziare in diversi tipi di cellule nervose potrebbe rappresentare un valido strumento terapeutico per contrastare lesioni cerebrali o fenomeni neurodegenerativi. Tra le cellule staminali, le cellule staminali mesenchimali adulte suscitano particolare interesse come sorgente cellulare da utilizzare per scopi terapeutici mirati alla rigenerazione di tessuto nervoso, in quanto esse non presentano particolari problemi etici e sono facilmente reperibili in grande quantità o dal midollo osseo o dal tessuto adiposo del paziente.

Scopo di questo progetto è stato quello di definire un protocollo sperimentale efficace per il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali adulte prelevate da tessuto adiposo umano verso il fenotipo neuronale.

Le cellule MSC isolate da midollo osseo e da tessuto adiposo di ratto sono state inizialmente caratterizzate per la loro staminalità, tramite induzione di differenziamento fisiologico in osteoblasti.

E' stata condotta un'analisi comparativa del potenziale di differenziamento delle MSC mantenute in condizioni standard di coltura o cresciute su particolari biomateriali scaffolds in titanio di proprietà del Politecnico di Milano, opportunamente trattati per risultare non tossici e biocompatibili.

Tramite quantificazione dei livelli di fosfatasi alcalina o la valutazione dei depositi arricchiti in calcio è stato possibile osservare come le MSC fossero in grado di mantenere il loro potenziale differenziativo sui diversi substrati in titanio funzionalizzato. Tuttavia è stato osservato come le cellule cresciute su un particolare substrato (SUM-Na) fossero in grado di mostrare un potenziale differenziativo più paragonabile a quello standard osservato nelle colture in vitro identificando quindi tale supporto come un valido candidato per successivi studi protesici su modelli animali in vivo.

Successivamente il lavoro si è maggiormente concentrato nello sviluppo e nella definizione di un protocollo clinicamente applicabile per indurre le cellule staminali mesenchimali estratte da tessuto adiposo di ratto a differenziare in cellule del sistema nervoso centrale. È stato deciso di focalizzare l'attenzione sulle MSC isolate da tessuto adiposo poiché a differenza delle MSC derivanti altri tessuti, esse si ottengono in grandi quantità con procedure poco invasive. Inizialmente è stata valutata la trasferibilità di protocolli già presenti in letteratura che prevedessero l' utilizzo di cellule staminali di origine diversa dal tessuto adiposo. A tale scopo, sono stati valutati sia mezzi differenziativi che prevedessero la formazione di sfere da MSC estratte da tessuto adiposo umano (Anghileri et al. 2007), sia mezzi che prevedessero un differenziamento diretto delle staminali derivate da diverse fonti quali il sangue del cordone ombelicale (Kang et al, 2006) e midollo osseo (Egusa et al. , 2005). In tutti i casi sono state riscontrate differenze nei risultati ottenuti con le MSC isolate da tessuto adiposo rispetto ai tipi cellulari utilizzati negli studi pubblicati, poiché i mezzi testati o si sono rivelati particolarmente tossici oppure inducevano un differenziamento verso una linea gliale. Inoltre, i tempi di differenziamento erano particolarmente lunghi (mediati da protocollo di de differenziamento e formazione di neuro sfere) e portavano al differenziamento di piccoli quantitativi di cellule, una percentuale non rilevante ai sensi di un futuro impiego clinico. Inoltre, alcuni componenti dei mezzi presi in esame erano caratterizzati da componenti non conformi alle norme delle linee guida GMP. Si è pertanto deciso di identificare e caratterizzare un nuovo mezzo di differenziamento che fosse la sintesi delle conoscenze apprese dagli studi precedentemente condotti,

conforme alle linee guida GMP e in grado di indurre un differenziamento clinicamente rilevante sia dal punto di vista dell'efficacia che dal punto di vista del processo temporale.

Dopo una serie di tentativi è stato identificato un mezzo proprietario apparentemente non tossico (NZ4, attualmente in valutazione pre deposito brevettuale) in grado di indurre un visibile cambio morfologico in senso neuronale in tempi rapidi della maggior parte delle cellule in coltura. E' stata inizialmente effettuata una prima caratterizzazione mediante immunocitochimica per marcatori neuronali dei primi stadi di sviluppo che ha permesso di osservare la positività delle cellule in differenziamento ai marcatori specifici dello sviluppo neuronale. Approfondendo ulteriormente l'analisi a tempi di differenziamento più lunghi con marcatori neuronali caratteristici degli stadi più avanzati di sviluppo neuronale, è stata osservata una positività a marcatori specifici (quali snap25, vAMP2 e p38) che ci ha indotto a prendere seriamente in considerazione l'ipotesi che questo mezzo di differenziamento da noi sviluppato potesse indurre un differenziamento specifico delle cellule in senso neuronale.

Si è pertanto proceduto alla caratterizzazione temporale in coltura dell'espressione di specifici geni caratteristici dello sviluppo neuronale in cellule MSC sottoposte a differenziamento. L'analisi tramite PCR ha permesso di confermare, in cellule mantenute nel mezzo differenziativo, la presenza di geni neuro-specifici, assenti a livello delle MSC non sottoposte a differenziamento.

La caratterizzazione delle cellule sottoposte a differenziamento è stata ulteriormente approfondita mediante analisi funzionali delle dinamiche di calcio intracellulare e mediante registrazioni elettrofisiologiche, comparando la risposta delle MSC sottoposte a differenziamento con la risposta di neuroni primari mantenuti in coltura per gli stessi tempi.

Confrontando le registrazioni di imaging per il calcio su singola cellula abbiamo potuto osservare come le cellule in differenziamento mostrassero un livello intracellulare di calcio basale significativamente diverso rispetto a quello registrato dalle stesse MSC non sottoposte a differenziamento, ma paragonabile al livello, più basso, di calcio intracellulare nei neuroni primari. Inoltre, esponendo le MSC in differenziamento a uno stimolo di depolarizzazione (50mM KCl) è stata osservata una risposta funzionale assente invece nelle MSC non differenziate. Le cellule MSC sottoposte a differenziamento sono state in grado di rispondere non solo ad una stimolazione farmacologica, ma anche ad una stimolazione elettrica di campo, mostrando una chiara differenza della risposta funzionale rispetto alle MSC non sottoposte a differenziamento.

Osservando attentamente la cinetica delle risposta funzionale delle MSC in risposta a KCl, e confrontando la stessa a precedenti osservazioni del nostro laboratorio sulla diversa cinetica di risposta delle colture primarie neuronali in fase di sviluppo (Pravettoni et al.2000), si osserva che la risposta delle cellule in differenziamento risulta del tutto paragonabile alla risposta dei neuroni nelle prime fasi di sviluppo (2-3 div) e non alla tipica risposta delle cellule neuronali mature. Probabilmente, le MSC sottoposte a differenziamento neuronale per 3,4 giorni mostrano un apparato recettoriale paragonabile a quello di un neurone primario in fase di sviluppo; saranno necessari ulteriori studi per approfondire come cambia la proporzione dei diversi recettori canale a stadi diversi di maturazione.

La caratterizzazione delle MSC sottoposte a differenziamento neuronale è stata ulteriormente approfondita dall'analisi quantitativa del potenziale di membrana a riposo mediante registrazioni di *patch clamp*. Comparando i dati di potenziale di riposo delle MSC, dei neuroni in fase di sviluppo e delle MSC sottoposte a differenziamento agli stessi tempi in coltura, queste ultime mostrano un potenziale di membrana paragonabile a quello delle colture neuronali primarie.

Sono ovviamente molteplici gli aspetti da affrontare. Risulta ad esempio essere prospetticamente molto interessante la caratterizzazione del processo di differenziamento, anche tramite l'utilizzo di specifici inibitori per i diversi recettori canale (al sodio, al calcio, al potassio) in modo da poter seguire il processo di maturazione nel tempo e caratterizzare la presenza in membrana di specifici canali. Inoltre, andrà quantificata meglio l'intensità della risposta a stimoli di depolarizzazione ai diversi stadi di sviluppo, sia mediante imaging per il calcio, sia mediante registrazioni elettrofisiologiche; sarà anche da quantificare meglio la percentuale di cellule in grado di assumere un profilo così marcatamente neuronale anche dal punto di vista funzionale, rispetto al totale delle cellule sottoposte a differenziamento.

I dati preliminari ottenuti in questa tesi sono tuttavia di estrema importanza per la definizione di un protocollo di differenziamento in grado di modulare il processo di differenziamento delle MSC verso un fenotipo marcatamente neuronale. Il potenziale impatto terapeutico di un protocollo di differenziamento ben caratterizzato è veramente notevole, ad esempio nelle terapie rigenerative in seguito a necrosi dovuta ad eventi ischemici.

Lo scopo di questo progetto, in prospettiva, è infatti quello di testare su un modello animale di ischemia il potenziale terapeutico dato da un'iniezione intracranica nella zona danneggiata delle cellule MSC autologhe prelevate dal tessuto adiposo e differenziate in senso neuronale.



A tale scopo sono stati svolti studi preliminari per studiare l'interazione di MSC con materiali avanzati biocompatibili da utilizzare per scopi di medicina rigenerativa. Tali idrogeli, devono possedere caratteristiche peculiari. Devono innanzitutto essere matrici sol-gel, in grado di essere liquide quando sottoposte a pressione (fase di iniezione) ma poi in grado di tornare ad una forma solida (una volta iniettate). Questi gel devono non solo sciogliersi lentamente favorendo il processi di *homing* delle MSC nel tessuto di destinazione, ma devono anche essere caricati con nano capsule contenenti i fattori di differenziamento ottimali (nel nostro caso il mezzo NZ4 che favorisce il differenziamento in senso neuronale).

Nelle prove preliminari svolte in collaborazione con enti di ricerca specificamente dedicati allo sviluppo di matrici biocompatibili è stato osservato che le cellule MSC non solo sono in grado di sopravvivere all'interno delle matrici biocompatibili, ma che una volta estratte dopo diversi giorni sono in grado di mantenere le proprie caratteristiche di staminalità e, se esposte al mezzo NZ4, sono in grado di differenziarsi verso un fenotipo neuronale (dati oggetto di domanda di brevetto).

Una volta terminata la caratterizzazione *in vitro* del processo di differenziamento, oggetto di questa tesi, verranno effettuate delle prove *in vivo*, inizialmente per caratterizzare il processo di *homing* e differenziamento *in vivo* delle cellule MSC prelevate dal modello animale stesso, e successivamente per effettuare studi più approfonditi sulle variazioni fenotipiche comportamentali del modello animale.

In conclusione, questo studio ha identificato un protocollo *in vitro* clinicamente rilevante per il differenziamento delle staminali mesenchimali adulte in cellule neuronali. Il protocollo prevede l'utilizzo di staminali adulte di facile reperibilità (prelevate da liposuzione), e permette il loro differenziamento in percentuali significative (circa il 60%) in cellule del sistema nervoso centrale. Inoltre, è caratterizzato da componenti conformi alle norme GMP (attualmente in fase di deposito brevettuale). Le cellule MSC esposte a questo mezzo di differenziamento acquisiscono caratteristiche morfologiche e funzionali tipiche delle colture neuronali in fase di sviluppo. Sarà di particolare interesse clinico approfondire lo studio del differenziamento staminale indotto *in vitro* in modelli di patologia animale (ad esempio ischemia).

# ***BIBLIOGRAFIA***

- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J. Molecular cloning of a novel brain-type Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* (2000) 74:2622–2625.
- Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID By stem cell gene therapy combined with nonmyeloblastic conditioning. *SCienze*. 2002;296:2410-2413.
- Alison MR and S Islam. Attributes of adult stem cells *J Pathol* 2009; 217: 144–160
- Anghileri Elena, Silvia Marconi, Angela Pignatelli, Pierangelo Cifelli, Mirco Galiè, Andrea Sbarbati, Mauro Kamprera, Ottorini Belluzzi, Bruno Bonetti. Neural differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 Oct;17(5):909-16
- Armstrong L, Lako M, Lincoln J, et al. mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech. Dev.* (2000); 97:109–116.
- Arosarena O (2005) Tissue Engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 13:233-41. Review
- Asakura A. Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med.* (2003); 13:123–128.
- Atala A (2007) Engineering tissue, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 1:83-96
- Bacci A, Verderio C, Pravettoni E, Matteoli M. (1999) The role of glial cells in synaptic function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 28;354(1381):403-9.
- Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem.* (2001). 276(39):36764-9.
- Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* (2007); 25:207–215.
- Baksh D, Song L and Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* (2004) 8(3):301-16
- Baksh DM, et al. (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8(3):301-16. Review.
- Banfi A, Muraglia B, Dozin M, et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* (2000); 28:707–715.
- Banker G. and Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* (1977). 126:397-425

- Barnabé GF, Schwindt TT, Calcagnotto ME, Motta FL, Martinez G Jr, de Oliveira AC, Keim LM, D'Almeida V, Mendez-Otero R, Mello LE. Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *PLoS One*. 2009;4(4):e5222.
- Barres B. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease *Neuron*, Volume 60, Issue 3, Pages 430-440 (2008)
- Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*. (2003) 69(3):250-6
- Bartlett WP., Banker G. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* (1984b).4(8):1954-1965.
- Barzilay R, Kan I, Ben-Zur T, et al. Induction of human mesenchymal stem cells into dopamine-producing cells with different differentiation protocols. *Stem Cells Dev* 2008;17:547-54.
- Barzilay R, Sadan O, Melamed E, et al. Comparative characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells from four different rat strains. *Cytotherapy* 2009;11:435-42.
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, et al. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* (2004);22:675–682.
- Bedet C, Isambert M-F, Henry J-P, Gasnier B. Constitutive phosphorylation of the vesicular inhibitory amino acid transporter in rat central nervous system. *J Neurochem* (2000). 75:1654–1663.
- Bellantuono I. Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss *Bioch. et Bioph. Acta*. (2009); 1792:364–370
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT Jr, Edwards RH. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*. (2000). 289(5481):847-9.
- Benayahu D, Akavia UD, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. *Curr Med Chem*. (2007); 14:173–179.
- Benayahu D, Shefer G, Shur I. Insights into chromatin remodelers in mesenchymal stem cells and differentiation. *Front Biosci*. (2008); 14:398–409.
- Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S. Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J Cell Biochem*. (2000); 79(3):407–415.
- Benraiss A., Chmielnicki E., Lerner K., Roh D., Goldman S. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* (2001) 21:6718-6731.

- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. *Cell*. (1999); 99:451–454.
- Blackmore M Letourneau P.C (2007) Protein synthesis in distal axons is not required for axon growth in the embryonic spinal cord Pages 976 – 986
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. (2001); 105:829–841.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*. (2006);10:7-14.
- Bonnet D and Dick JE Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. (1997); 3(7):730-7.
- Booher J., and Sensenbrenner M. Growyh and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* (1972). 2:97-105.
- Brack AS, Conboy MJ, Roy S, et al. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* (2007); 317:807–810.
- Butovsky O, Landa G, Kunis G, Ziv Y, Avidan H, Greenberg N, Schwartz A, Smirnov I, Pollack A, Jung S, Schwartz M. *J Clin Invest*. 2006 Apr;116(4):905-15. Epub 2006 Mar 23.
- Calne RY: The history of liver transplantation. In: *Organ and Cell Transplantation*. Imperial College Press, London, UK (2003).
- Cameron HA and McKay R. Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*. (1998) 8(5):677-80
- Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* (2000); 14:183–188.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. (1991) 9(5):641-50
- Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. (1994) 21(3):429-35
- Chen J., Li Y., Katakowski M., Xiaoguang C., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam SC., Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* (2003) 73:778-786.
- Chen LB, Jiang XB and Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. (2004) 10(20):3016-20
- Chen XG, Katakowski M., Li Y, Lu D., Wang L, Zhang L., Chen J, Xu YX., Gautam S., Mahmood A., Chopp M. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res* (2002b) 69: 687-691.

- Chen XG., Li Y., Wang L., Katakowski M, Zhang L., Chen J., Xu Y., Gautam SC., Chopp M. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* (2002a) 22: 275-279.
- Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells* (1996); 14:239–248.
- Crigler L., Robey RC., Asawachaicharn A., Gaupp D., Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol.* (2006). 198(1):54-64.
- De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* (2007) 25(1):100-6
- Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC and Balian G. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *J Orthop Res.* (2002) 20(6):1232-9
- Devine SM, Peter S, Martin BJ, Barry F and McIntosh KR. Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer J.* (2001) 7 Suppl 2:S76-82
- Dexter TM., Heyworth CM., Spooner E., Ponting ILO. The role of growth factors in selfrenewal and differentiation of haemopoietic stem cells. *Phil Trans R Soc Lond* (1990) 327: 85-89.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M et al. Human bone marrow stromal cells suppress Tlymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* (2002) 99:3838–3843.
- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate, *Br. J. Haematol.* (1999); 107:275–281.
- Dotti C.G, Sullivan C.A, Banker G. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* (1988). 8(4):1454-1468.
- Egusa H, Schweizer FE, Wang CC, Matsuka Y, Nishimura I. Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. *J Biol Chem.* 2005 Jun 24;280(25):23691-7.
- Elmariah SB., Oh EJ., Hughes EG., Balice-Gordon RJ. Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABA receptors. *J Neurosci.* (2005). 6;25(14):3638-50.
- Engler AJ, Sweeney HL, Discher DE, Schwarzbauer JE. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007;7:335.

- Erbs S, Linke A, Schächinger V et al. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation*. (2007) 116(4):366-74
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al; Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. (1998);279:1528–1530.
- Filip S, English D and Mokry J. Issues in stem cell plasticity. *J Cell Mol Med*. (2004) 8(4):572-7
- Foresta C, De Toni L, Ferlin A, Di Mambro A. Clinical implication of endothelial progenitor cells. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010 Jan;10(1):89-105
- Forrester JS, Price MJ and Makkar RR. Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation*. (2003) 108(9):1139-45
- Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* (2002); 69:188–197.
- Fremeau RT Jr, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002). 99:14488–14493.
- Fremeau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*. (2001). 31(2):247-60.
- Friedenstein AJ and Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. (1966) 16(3):381-90
- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. (2003) 11(1):55-64
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. (2000) 287(5457):1433-8
- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, et al. Canonical WNT signalling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*. (2005); 280:33132–33140.
- Gerdes W., Brysch W., Schlingensiepen KH., Seifert W. Antisense bFGF oligodeoxynucleotides inhibit DNA synthesis of rat astrocytes. *Neuroreport* (1992) 3(1): 43-46
- Ghazizadeh S, Taichman LB. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*. (2001). 20(6):1215-22.

- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA: adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;100: 1249-1260.
- Gimble JM, Zvonics S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttal ME: playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006; 98:251-266.
- Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* (2003) 3(5):705-13
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci.* (2002). 22(13):5442-51.
- Greco SJ, Liu K and Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells.* (2007) 25(12):3143-54
- Greenwood HL, Thorsteinsdottir H, Perry G, Renihan J, Singer PA, Daar AS: regenerative medicine: new opportunities for developing countries. *Int. J. Biotechnol.* 8 (1-2), 60-77 (2006).
- Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, et al. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann NY Acad Sci.* (2005); 1049:97–106.
- Gronthos S, Robey PG, Franklin DM, Storms RW and LeDy HA. Surface Protein Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *J Cell Physiol.* (2001) 189:54–63
- Groves AK., Entwistle A., Jat PS., Noble M. The characterization of astrocyte cell lines that display properties of glial scar tissue. *Dev Biol* (1993) 159: 87-104.
- Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, et al. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells* (2007); 25:646–654
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* (1999); 401:390–394.
- Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, et al. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J.Biol.Chem.* (2002); 277:1316–1323.
- Hassan MQ, Tare R, Lee SH, et al. HOXA10 controls osteoblastogenesis by directly activating bone regulatory and phenotypic genes. *Mol Cell Biol.* (2007); 27:3337–3352.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* (1965); 37:614–636.



- Heath CA, et al. (2000) Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 18(1):17-9.
- Henningson C T., Stanislaus MA, PhD, and Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol.* (2003). 111:745-53.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* (2001). 21:RC181.
- Hoffman K.L Logothetis N.K (2009) Cortical mechanisms of sensory learning and object recognition
- Howe MW, Feig SL, Osting SMK, Haberly LB. (2008) Cellular and subcellular localization of Kir2.1 subunits in neurons and glia in piriform cortex with implications for K<sup>+</sup> spatial buffering. *J Comp Neurol* 506: 877–893,.
- Huang ZJ., Kirkwood A., Pizzorusso T., Porciatti V., Morales B., Bear MF., Maffei L., Tonegawa S. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell.* (1999). 17;98(6):739-55.
- Jankowski RJ, Deasy BM and Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.* (2002) 9(10):642-7
- Javed A, Gutierrez S, Montecino M. Multiple Cbfa/AML sites in the rat osteocalcin promoter are required for basal and vitamin D-responsive transcription and contribute to chromatin organization. *Mol. Cell. Biol.* (1999); 19:7491–7500.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* (2002) 418(6893):41-9
- Jin K., Zhu Y., Sun Y., M,ao XO., Xie L., Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:11946-11950.
- Jin X., Hu H., Mathers PH., Agmon A. Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *J Neurosci.* (2003). 2;23(13):5662-73.
- Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng.* 1997;3(2):173-185.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. Principles of neural science. Third Edition.(1991) Elsevier. 22-24;898-899.
- Kang SK., Jun ES., Bae YC., Jung JS. Interactions between human adipose stromal cells and mouse neural stem cells in vitro. *Developmental Brain Research* (2003) 145:141-149.

- Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Xu XL, Yu XJ: Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2006 Jul;30(7):569-75. Epub 2006 Mar 6
- Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes dev* (2005). 19(10): 1129-55.
- Kimelberg HK., Narumi S., and Bourke RS. Enzymatic and morphologic properties of primary rat brain astrocyte cultures and enzymatic development *in vivo*. *Brain Res* (1978).153: 55-77.
- Kingham PJ, et al. (2007) Adipose-derived stem cell differentiate into a schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology* 207:267-274
- Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M and Terenghi G. Adiposederived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol.* (2007) 207(2):267-74
- Kohara K., Kitamura A., Adachi N., Nishida M., Itami C., Nakamura S., Tsumoto T. Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture. *J Neurosci* (2003). 9;23(14):6123-31.
- Kopen Gene C., Prockop Darwin J., Phinney Donald G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999).96:10711–10716
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* (2006); 116:1202–1209.
- Kroushus TJ et al.: The history of heart transplantation and heart valve transplantation. Imperial College Press, London, UK (2003).
- LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multi nucleate muscle fiber in response to injury. *Cell.* (2002); 111:589–601.
- Labouyrie E., Dubus P., Groppi A., Mahon FX., Ferrer J., Parrens M., Reiffers j., Mascarel A., Merlio JP. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol* (1999) 154, 405-415.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E and Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* (2003) 31(10):890-6
- Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* (2004) 14(4-6):311-24

- Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59:514-23
- Li Y., Chen J., Zhang LC., Wang L., Lu D., Katakowski M., Gao Q., Shen LH., Zhang J., Lu M., Chopp M. Gliosis and brain remodelling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* (2005) 49: 407-417.
- Liang J, Zhang H, Hua B, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15:644-6.
- Liu HM., Chen HH. Correlation between fibroblast growth factor expression and cell proliferation in experimental brain infarct: studied with proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol* (1994) 53:118-126.
- Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, et al. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res* 2009;69:4134-42.
- Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R., McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. (2001). 292:1389-1394.
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. (2003) 10(2):228-41
- Majumdar MK., Thiede MA., Mosca JD., Moorman M., Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (mscs) and stromal cells. *J Cellular Physiol* (1998) 176:186-192.
- Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, et al. Expansion of mesenchyma stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J. Cell. Biochem*. (2006); 97:744–754.
- Marom R, Shur I, Hager GL, and Benayahu D. Expression and regulation of CReMM, a chromodomain helicase-DNA-binding (CHD), in marrow stroma derived osteoprogenitors. *J.Cell.Physiol*. (2006); 207:628–635.
- Martin GR. 1981: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7634–7638.
- Marty S., Berninger B., Carroll P., Thoenen H. GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron*. (1996). 16(3):565-70.
- Mauro A. (1961). Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J. Biochem. Cytol*. 9, 493–496
- McCann SR: The history of bone marrow transplantation. Imperial College Press, London, UK (2003).

- McIntire SL, Reimer RJ, Schiske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification of the vesicular GABA transporter. *Nature* (1997). 389:870–876.
- Ming GL., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Ann Rev. Neurosci* (2005) 28: 223-250.
- Montecino M, Pockwinse S, Lian J, et al. DNaseI hypersensitive sites in promoter elements associated with basal and vitamin D dependent transcription of the bone-specific osteocalcin gene. *Biochemistry*. (1994); 33:348–353.
- Moriguchi S, Mizoguchi Y, Tomimatsu Y, Hayashi Y, Kadowaki T, Kagamiishi Y, Katsube N, Yamamoto K, Inoue K, Watanabe S, Nabekura J, Nakanishi H. (2003) Potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic responses by microglia. *Brain Res Mol Brain Res*. 26;119(2):160-9.
- Morizane A, Li JY and Brundin P. From bench to bed: the potential of stem cells for the treatment of Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*. (2008) 331(1):323-36
- Murphy DD., Cole NB., Segal M. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1998). 15;95(19):11412-7.
- N'th U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*. (2002) 20(5):1060-9
- Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM and Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res*. (1990) (259):223-32
- Nasef A, Zhang YZ, Mazurier C et al. Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int J Lab Hematol*. (2009) 31(1):9-19
- Ni B, Rostock PR Jr, Nadi NS, Paul SM. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci* (1994). 91:5607–5611.
- Nowarowski R. and Rakic P. The mode of migration of neurons to the hippocampus: A Golgi and electron microscopic analysis in foetal rhesus monkey. *J Neurocytol*. (1979). 8:697-718.
- Ostefeld T, Caldwell MA, Prowse KR, et al. Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation. *Exp. Neurol*. (2000); 164:215–226.
- Papalois VE, Hakim Ns, Najarian JS et al.: The history of kidney transplantation. Imperial College Press, London, UK (2003).

- Paredes R, Gutierrez J, Gutierrez S, et al. Interaction of the 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor at the distal promoter region of the bone-specific osteocalcin gene requires nucleosomal remodelling. *Biochem. J.* (2002);363:667–676.
- Peroni D, Scambi I, Pasini A et al. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp Cell Res.* (2008) 314(3):603-15
- Pfrieger F. W., and Barres B. A. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* (1997). 277: 1684-1687.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* (1999); 284:143–147.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* (1997) 276(5309):71-4
- Raff M., Apperly J., Kondo T., Tokumoto Y., Tang D. Timing cell-cycle exit and differentiation in oligodendrocyte development. *Novartis Found Symp.* (2001). 237:158 63.
- Rao Mahendra S., 2006. Are There Morally Acceptable Alternatives to Blastocyst Derived ESC? *Journal of Cellular Biochemistry* 98:1054–1061
- Ravindranath N, Dalal R, Solomon B, et al. Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology* (1997); 138:4026–4029.
- Riordan N, Ichim T, Min WP, et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Trans Med* 2009;7:29: published online 24 April 2009, doi:10.1186/1479-5876-7-29.
- Rios CG, Clifford G, McCarthy MB et al. Biologics in Shoulder Surgery: The Role of Adult Mesenchymal Stem Cells in Tendon Repair. *Techniques in Orthopaedics.* (2007) 22(1):2-9
- Roberts PJ, Storm-Mathisen J, Johnston GAR. Glutamate: transmitter in the central nervous system. *New York: John Wiley & Sons.* (1981).
- Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G and Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie.* (2005) 87(1):125-8
- Rombouts WJ and Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia.* (2003) 17:160–170
- Rooney GE, McMahon SS, Ritter T, et al. Neurotrophic factor-expressing mesenchymal stem cells survive transplantation into the contused spinal cord without differentiating into neural cells. *Tis Eng Part A* 2009; published online 31 March 2009, doi:10.1089/ten.tea.2009.0045.

- Roumier A, Béchade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, Bessis A. (2004) Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci.* 15;24(50):11421-8.
- Rubin H. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat. Biotechnol.* (2002); 20:675–68.
- Rutherford LC., DeWan A., Lauer HM., Turrigiano GG. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci.* (2000). 15;17(12):4527-35.
- Sadan O, Bahat-Stromza M, Barhum Y, et al. Protective effects of neurotrophic factors secreting cells in a 6-OHDA rat model of Parkinson disease. *Stem Cells Dev* 2009: published online 25, February, 2009 doi: 10.1089/ scd.2008.0411.
- Sagnè C, El Mestikawy S, Isambert M-F, Hamon M, Henry J-P, Giros B, Gasnier B. Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett* (1997). 417:177–183.
- Saito T, Kuang JQ, Bittira B, Al-Khaldi A and Chiu RC. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg.* (2002) 74(1):19-24; discussion 24
- Sames KS, Stolzing S, A Extending the lifespan. *Biotechnical, Gerontological, and Social Problems.* Medizin und Gesellschaft, Hamburg (2005).
- Sang Q., Tan SS. Contact-associated neurite outgrowth and branching of immature cortical interneurons. *Cereb Cortex.* (2003). 13(6):677-83.
- Santambrogio L. S. L. Belyanskaya F. R. Fischer (2001) Developmental plasticity of CNS microglia 10.1073/pnas.111152498 PNAS 22, vol. 98 no. 11 6295-6300.
- Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem.* (2002) 277(52):50734-48.
- Schuldiner S, Shirvan A, Linal M. Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev.* (1995).75(2):369-92.
- Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* (2003); 26:125–131. Review.
- Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, et al. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res.* (2004); 19:256–264.
- Serakinci N., Keith WN. Therapeutic potential of adult stem cells. *European journal of cancer* (2006). 42(9): 1243-1246.
- Sethe b S, Scutt a A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* (2005); 5(1):91-116.

- Sharpless NE, DePinho RA, Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J. Clin. Invest.* (2004); 113:160–816
- Shefer G, Yablonka-Reuveni Z. Reflections on lineage potential of skeletal muscle satellite cells: do they sometimes go MAD? *Crit Rev Eukaryot Gene Expression.* (2007); 17:13–22.
- Shen J, Hovhannisyanyan H, Lian JB, et al. Transcriptional induction of the osteocalcin gene during osteoblast differentiation involves acetylation of histones h3 and h4. *Mol.Endocrinol.* (2003); 17:743–756.
- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG and Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* (2005) 8(3):191-9
- Shibuki K, Gomi H, Chen L, Bao S, Kim JJ, Wakatsuki H, Fujisaki T, Fujimoto K, Katoh A, Ikeda T, Chen C, Thompson RF, Itohara S. (1996) Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron.*
- Shostak S. (Re)defining stem cells. *Bioessays* (2006); 28:301–308.
- Shur I, Benayahu D. Characterization and functional analysis of CReMM, a novel chromodomain helicase DNA-binding protein. *J.Mol.Biol.* (2005); 352:646–655.
- Shur I, Socher R, Benayahu D. In vivo association of CReMM/CHD9 with promoters in osteogenic cells. *J.Cell.Physiol.* (2006a); 207:374–378.
- Shur I, Solomon R, Benayahu D. Dynamic interactions of chromatin-related mesenchymal modulator, a chromodomain helicase-DNA-binding protein, with promoters in osteoprogenitors. *Stem Cells* (2006b); 24:1288–1293.
- Sierra OL, Cheng SL, Loewy AP, et al. MINT, the Msx2 interacting nuclear matrix target, enhances Runx2-dependent activation of the osteocalcin fibroblast growth factor response element. *J.Biol.Chem.* (2004); 279:32913–32923.
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* (2002); 20:592–596.
- Smith AG, Embryo-derived stem cells: of mice and men, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2001); 17: 435–462
- Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H and Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone.* (2002) 30(5):699-704
- Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Mitochondria and oxidative stress in neurodegenerative disorders.* *Ann N Y Acad Sci* 2008;1147:79-92.

- Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ and Stein JL. The osteocalcin gene: a model for multiple parameters of skeletal-specific transcriptional control. *Mol Biol Rep.* (1997); 24:185–196.
- Stein GS, Lian JB, vanWijnen AJ, et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* (2004); 23:4315–4329.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* (2003);33:919–926.
- Stolzing E, Jones D, McGonagle A, Scutt. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* (2008);129:163–173.
- Sun L, Akiyama K, Zhang H, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009;27:1421-32.
- Sutherland DER, Groth CG: The history of pancreas transplantation. Imperial College Press, London, UK (2003).
- Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep.* (2002) 3(8):798-803.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* (2000). 407:189–194.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci.* (2001). 21(22):182.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* (1998) 282:1145-7
- Timothy O'Brien, MD, PhD Frank P. Barry, PhD. Stem cell therapy and regenerative Medicine. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(10):859-861.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* (2001) 3(9):778-84
- Tuli R, Tuli S, Nandi S et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells.* (2003) 21(6):681-93



- Undale Anita H., MBBS, PhD; Jennifer J. Westendorf, PhD; Michael J. Yaszemski, MD, PhD; and Sundeep Khosla, MD Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair and Metabolic Bone Diseases
- Valerie D, Roobrouck F, Montoya U, et al. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res.* (2008); 10 314(9):1937-44.
- Varoqui H, Schafer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD. Identification of the differentiation-associated Na<sub>2</sub>/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* (2002). 22:142–155
- Verfaillie Catherine M, Martin F. Pera, and Peter M. Lansdorp. Stem Cells: Hype and Reality Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2002:369-91.
- Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* (2002) 12(11):502-8
- Villagra A, Cruzat F, Carvallo L, et al. Chromatin remodelling and transcriptional activity of the bone-specific osteocalcin gene require CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent recruitment of SWI/SNF activity. *J.Biol.Chem.* (2006); 281:22695–22706.
- Villagra A, Gutierrez J, Paredes R, et al. Reduced CpG methylation is associated with transcriptional activation of the bone specific rat osteocalcin gene in osteoblasts. *J.Cell.Biochem.* (2002); 85:112–122.
- Villars F., Bordenave L., Bareille R., Amedee J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem* (2000) 79:672-685.
- Volterra A, Meldolesi J Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Aug;6(8):626-40. Review.
- Wang L, Li Y, Chen J et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol.* (2002) 30:831–836
- Wang Y, Chen X, Armstrong MA and Li G. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop Res.* (2007) 25(7):926-32
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* (2000); 100:157–168.
- Weston AD, Hoffman LM, Underhill TM. Revisiting the role of retinoid signalling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* (2003); 69:156–173.
- Wilkins A, Kemp K, Ginty M, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res* 2009;3:63-70.

- Wright WE, Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging, *Nat. Biotechnol.* (2002); 20:682–688.
- Yannas IV: regenerative medicine (1st edition). Springer Publishing, NY USA (2005).
- Young DW, Pratap J, Javed A, et al. SWI/SNF chromatin remodelling complex is obligatory for BMP2-induced, Runx2-dependent skeletal gene expression that controls osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* (2005); 94:720–730.
- Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, et al. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev.* (2001); 106:97–106.
- Zeng X, Rao MS. Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* (2007); 145:1348–1358.
- Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, et al. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* (2003); 17 1146–1149.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* (2002) 13(12):4279-95