



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Università degli studi di Padova  
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOLOGIA E MEDICINA  
DELLA RIGENERAZIONE**

**INDIRIZZO: INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI**

**CICLO XXII**

**DEFINIZIONE DI COCKTAIL CITOCHINICI PER  
L'ESPANSIONE, IN CONDIZIONI FBS-FREE, DI CELLULE  
STROMALI MESENCHIMALI ISOLATE DA  
TESSUTO ADIPOSO E CORDONE OMBELICALE**

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

**Coordinatore di indirizzo:** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Francesco Rodeghiero

**Dottoranda:** Katia Chierogato



*...a mio zio Adriano, “il soprintendente ai lavori”*



## Abbreviazioni

aa aminoacidi  
ACS *AcylCoA syntetase*  
AF *amniotic fluid*, liquido amniotico  
Ag antigene  
ALDH aldeide deidrogenasi  
 $\alpha$  MEM  $\alpha$  *modification of minimum essential medium*  
AM *amniotic membrane*, membrana amniotica  
APC *allophycocyanin*, alloficocianina  
AT *adipose tissue*, tessuto adiposo  
bFGF *basic fibroblast growth factor*, fattore di crescita fibroblastico basico  
BM *bone marrow*, midollo osseo  
BrdU 5-bromo-2'-deossiuridina  
BP *binding protein*  
C/ERB  $\alpha$  CCAAT *enhancer-binding protein*  
CFU-F *fibroblast colony forming units*  
CIK *citokine induced killer*  
CO<sub>2</sub> anidride carbonica  
cPD *cumulative population doubling*  
D-PBS *Dulbecco phosphate buffered saline*  
DC *dendritic cells*, cellule dendritiche  
DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium*  
EGF *epidermal growth factor*, fattore di crescita epidermico  
ERK *extracellular signal-regulated kinase*  
F75, F25 fiasca da 75-25 cm<sup>2</sup>  
FABP4 *fatty acid binding protein 4*  
FITC *fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato di fluoresceina  
FBS *fetal bovine serum*, siero fetale bovino  
FS *forward scatter*, *scatter* della luce in avanti  
G-CSF *granulocyte colony-stimulating factor*, fattore stimolante le colonie granulocitarie  
GF *growth factors*, fattori di crescita  
GDGF *glioma derived growth factor*, fattore di crescita derivato dal glioma  
GM-CSF *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*, fattore stimolante le colonie granulocitarie/macrofagiche  
GvHD *graft versus host disease*  
GvL *graft versus leukemia*  
h ore  
HB EGF *heparin binding epidermal growth factor*  
HGF *hepatocyte growth factor*, fattore di crescita epatocitario  
HIF 1 $\alpha$  *hypoxia inducible factor 1 $\alpha$*   
HLA *human leucocyte antigen*  
HO1 *haem oxigenase 1*  
hPPP *human platelet poor plasma*, plasma umano povero di piastrine  
hPRP *human platelet rich plasma*, plasma umano arricchito di piastrine  
HPTA *hepatopoietin*, epatopoietina  
HSC *hematopoietic stem cells*, cellule staminali ematopoietiche

IDO indolamina 2,3-diossigenasi  
INF interferone  
IF immunofenotipo  
Ig immunoglobulina  
IGF I *insulin-like growth factor I*, fattore di crescita insulino simile I  
IL interleuchina  
ISCT *International Society for Cellular Therapy*  
JUN *c Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase*  
KIR *killer inhibitory receptors*  
LAK *lymphokine-activated killer*  
LDL *low density lipoprotein*, lipoproteine a bassa densità  
LPL *lipoprotein lipase*  
MAb anticorpo monoclonale  
MAP *mitogen-activated protein*  
MHC *major histocompatibility complex*, complesso maggiore di istocompatibilità  
MNC *mononuclear cells*, cellule mononucleate  
MSC *mesenchymal stromal cell*, cellule stromali mesenchimali  
NK *natural killer*  
ODGF *osteosarcoma derived growth factor*, fattore di crescita derivato dall'osteosarcoma  
P passaggio  
PB *peripheral blood*, sangue periferico  
PD *population doubling*  
PD1 *programmed cell death 1*  
PDGFbb *platelet derived growth factor bb*, fattore di crescita derivato dalle piastrine bb  
PE *phycoerythrin*, ficoeritrina  
PG prostaglandine  
PHA fitoemagglutinina  
PI3 fosfatidilinositolo 3  
PL placenta  
PPAR  $\gamma$  *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*   
RFU *relative fluorescence unit*  
RPMI 1640 *Roswell Park Memorial Institute 1640*  
RT-PCR *reverse transcriptase polymerase chain reaction*  
RXR  $\alpha$  *retinoic x receptor  $\alpha$*   
SCF *stem cell factor*  
SI sistema immunitario  
SF *scatter factor*  
SS *side scatter*, *scatter della luce a 90°*  
TGF $\alpha$  *transforming growth factor  $\alpha$* , fattore di crescita trasformante  $\alpha$   
TGF  $\beta$  *transforming growth factor  $\beta$* , fattore di crescita trasformante  $\beta$   
TNF *tumor necrosis factor*, fattore di necrosi tumorale  
UC *umbilical cord*, cordone ombelicale  
UCB *umbilical cord blood*, sangue da cordone ombelicale  
URG urogastrone  
VEGF *vascular endothelial growth factor*, fattore di crescita endoteliale vascolare

## Riassunto

Le cellule stromali mesenchimali umane (hMSC) sono cellule multipotenti, isolate da numerosi tessuti, con capacità di autoreplicarsi e di differenziarsi in più linee cellulari (osteoblasti, condrociti, adipociti, ecc.). Interagiscono con le cellule staminali ematopoietiche (HSC) e hanno proprietà immunomodulanti. Queste caratteristiche hanno reso le MSC eccellenti candidate per la medicina rigenerativa e la terapia genica.

Fino ad oggi il midollo osseo (BM) ha rappresentato la fonte principale di MSC, ma nell'ultimo decennio sono state sollevate delle riserve: 1) la bassa frequenza che richiede un'espansione *ex vivo*; 2) la comparsa di senescenza con il progredire dell'età del donatore; 3) la procedura di prelievo invasiva.

Questo ha spinto i ricercatori ad investigare, da una parte, fonti alternative e, dall'altra, nuovi protocolli di espansione per bypassare gli inconvenienti associati all'uso del siero fetale bovino (FBS) e di plasma umano arricchito di piastrine (hPRP). Le principali limitazioni sono legate, per l'FBS, al rischio di trasmissione di malattie prioniche e di reazioni immunitarie causate dalle proteine xenogeniche; per hPRP, alla sua composizione variabile, ad un effetto clinico poco conosciuto e, soprattutto, all'alta quantità di sangue intero richiesto per ottenere un volume di hPRP autologo sufficiente per l'espansione *ex vivo* delle MSC. In più, la centrifugazione ad alte *g*, nel tentativo di rimuovere le membrane delle piastrine, decresce l'effetto proliferativo di hPRP.

In questo studio sono state prese in esame due fonti alternative: 1) il tessuto adiposo (AT), da dove le MSC sono ottenibili in alto numero e con una facile procedura enzimatica; 2) il cordone ombelicale (UC), dal quale sono isolabili, come riportato in letteratura, MSC caratterizzate da frequenza e capacità replicativa maggiori rispetto alle BM MSC.

Per la prima volta è stato valutato, misurando l'incorporazione della bromodeossiridina nel DNA neosintetizzato, l'effetto sulla proliferazione di AT e UC MSC di un *pool* di sette fattori di crescita (GF) umani ricombinanti: *epidermal growth factor* (EGF), *basic-fibroblast growth factor* (bFGF), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *insulin-like growth factor I* (IGF I), *platelet-derived growth factor-bb* (PDGFbb) e *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF $\beta$ 1). Sono stati così definiti due cocktail a base di EGF-bFGF-PDGFbb per le AT MSC e EGF-PDGFbb per espansione delle UC MSC in un mezzo FBS-free supplementato con

plasma umano povero di piastrina (hPPP, 3%), che supporta la crescita delle mesenchimali minimizzando l'apoptosi e consente l'azione dei GF.

Queste combinazioni di citochine sono state in grado di fornire, dopo 21 giorni di coltura, un numero sufficiente di cellule per un eventuale trattamento, ad esempio, della *graft versus host disease* (GvHD), partendo da 100-150 cm<sup>3</sup> di AT e 20-30 cm di UC. Inoltre, nelle condizioni di coltura definite, sono serviti circa 80 ml di hPPP ottenibili da 150-200 ml di sangue intero, invece dei 350 ml di hPRP ricavabili da 1000-1200 ml di sangue.

La risposta mitogenica riscontrata sembra coinvolgere due protein-kinasi specifiche, MEK1 e MEK2, come evidenziato in presenza di un loro inibitore specifico (U0126). Questo suggerisce la priorità di questa via nel mediare la risposta mitogenica massima delle citochine.

I cocktail, inoltre, non influenzano l'espressione dei marker di superficie caratteristici delle mesenchimali. CD 105, CD 90 e CD 44 sono risultati altamente espressi sia sulle AT che sulle UC MSC, mentre la percentuale di cellule positive al CD 31, CD 34, CD 117 e CD 45 decresceva con il progredire dei passaggi, in linea con i criteri definiti dall'*International Society for Cellular Therapy*.

Le aldeidi deidrogenasi (ALDH), una classe di enzimi ossidativi, sono state di recente proposte come marker per l'identificazione e l'isolamento delle HSC dove sono espresse ad alti livelli (>80% nelle cellule CD 34+ isolate dal sangue della vena del cordone ombelicale). In questo studio si è indagato se le ALDH potessero svolgere un ruolo analogo per le MSC. I risultati ottenuti hanno evidenziato che le ALDH, combinate con CD 45 e CD 105, non possono essere usate come marker identificativi per le MSC derivate da AT e UC a causa della loro bassa espressione (inferiore al 50%).

La capacità differenziativa in senso adipogenico ed osteogenico, testato a fine del secondo passaggio (P2), è stata confermata per la AT MSC. L'esposizione a EGF-bFGF-PDGFbb ha incrementato l'adipogenesi e l'osteogenesi rispetto alla coltura in FBS e hPPP, probabilmente le citochine stimolano l'attivazione dei *pathway* coinvolti nel differenziamento adipogenico ed osteogenico.

L'utilizzo di cellule mesenchimali "indirizzate" al differenziamento adipogenico potrebbe rappresentare una promettente risorsa in chirurgia plastica e ricostruttiva per la ricostruzione del seno dopo mastectomia, per la riparazione di difetti tissutali e subdemiche conseguenti a traumi o ustioni. Per le AT MSC è stata riferita una

potenzialità osteogenica inferiore alle altre MSC adulte. Con il cocktail definito, che predispone le AT MSC anche all'osteogenesi, questo "problema" potrebbe essere superato, garantendo un numero sufficiente di precursori osteogenici per il popolamento di uno *scaffold*.

Le UC MSC, forse a causa della loro età ontogenia, non hanno evidenziato mineralizzazione e la formazione di vacuoli lipidici, ma si sono dimostrate più immunocompetenti delle AT MSC in presenza dei GF. L'effetto immunomodulante, a carico dei linfociti T attivati con fitoemagglutinina, è stato registrato per le UC MSC ad un rapporto MSC: cellule T pari a 1:10 in tutte le condizioni testate. L'immunomodulazione indotta dalle AT MSC è stata invece riscontrata a 1:5 in presenza del cocktail risultando così più blanda di quella in FBS. Probabilmente i fattori di crescita, inducendo la maturazione e predisponendo le cellule al differenziamento, compromettono le potenzialità immunomodulanti delle mesenchimali isolate da AT. Le UC MSC, essendo invece più immature, sono forse meno suscettibili all'azione dei GF rispetto alle MSC adulte. Quando tra mesenchimali e linfociti si è interposta una "barriera" che ne impediva il contatto "fisico", non è stato rilevato alcun blocco significativo della proliferazione delle cellule T. Si può concludere che il contatto cellulare rappresenti la condizione necessaria per attivare i meccanismi di immunosoppressione come la produzione di fattori solubili.

Recentemente, si sono moltiplicati i *trial* clinici dove si vanno ad infondere cellule CIK (*cytokine induced killer*) con lo scopo di aumentare l'efficienza del trapianto di HSC. Le cellule CIK sono una popolazione linfocitaria CD 3+ CD 56+, espanse *in vitro* con interferone  $\gamma$ , anti CD3 e interleuchina 2, e dotate di azione citotossica verso numerosi target tumorali, ma non sulle staminali CD 34+.

Visto il ruolo rilevante in campo ematologico sia delle MSC che delle CIK, è stata indagata l'interazione tra le due popolazioni cellulari. Le CIK hanno mostrato un'azione citotossica sulle UC MSC dose dipendente, mentre le mesenchimali hanno determinato la soppressione delle CIK e la riduzione della loro potenzialità citotossica a carico della K562, un target tumorale. Questi risultati dovrebbero essere tenuti presenti nella definizione di nuovi protocolli clinici di immunoterapia. Essi suggeriscono di somministrare prima le mesenchimali al fine di supportare l'attecchimento delle HSC e prevenire la GvHD, e solo in un secondo tempo le CIK ad azione antitumorale.

In conclusione, i cocktail definiti garantiscono l'espansione di una popolazione omogenea di mesenchimali e in numero sufficiente per l'uso clinico delle AT MSC “*committed*” in medicina ricostruttiva, e delle UC MSC in un contesto ematologico in combinazione con le cellule CIK a patto di una somministrazione in due tempi.

## Summary

Human mesenchymal stromal cells (hMSCs) are multipotent cells isolated from several tissues that possess self-renewal capacity, long term viability and are capable to differentiate into several cell lineages (osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, etc.). They interact with hematopoietic stem cells (HSC) and exert immunoregulatory function. These characteristics make MSCs excellent candidates for regenerative medicine and gene therapy.

To date, bone marrow (BM) has been the main source for the isolation of hMSCs, but in the last decade some drawbacks arose: 1) the cells low number that requires an *ex vivo* expansion; 2) the BM MSCs senescence with increasing of donor age; 3) the invasive procedure.

This has led many researchers to investigate alternative MSCs sources and new expansion protocols to bypass FBS/human platelet rich plasma (hPRP) limitations: 1) the risk of prion diseases and immunological reactions associated with the use of FBS; 2) the decreased proliferative effect of hPRP after high *g* rate centrifugation to purify it, its undefined composition and its full clinical impact that remains to be investigated. In addition, its use is limited by the amount of whole blood necessary to obtain a sufficient quantity of autologous hPRP for cell expansion.

In this study we focused on: 1) adipose tissue derived-MSCs (AT MSCs) because of the high number of cells that can be obtained and the easy enzyme-based procedures; 2) umbilical cord derived-MSCs (UC MSCs) which possess greater and faster expansion capability, higher frequency of colony forming unit fibroblast (CFU-F) than BM MSCs.

For the first time, we evaluated, measuring bromo-deoxyuridine incorporation in neosynthesized DNA, the effects on AT and UC MSCs expansion of a pool of seven human recombinant growth factors: epidermal growth factor (EGF), basic-fibroblast growth factor (bFGF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor I (IGF I), platelet-derived Growth factor-bb (PDGFbb) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1). We defined two cytokines cocktails based on EGF-bFGF-PDGFbb for AT MSCs, and EGF-PDGFbb for UC MSCs expansion in a FBS-free medium supplemented with hPPP (3%), which allows a normal MSCs expansion with a minimal apoptosis and supports GFs proliferative effect.

These mixtures permitted us, starting from about 100-150 cm<sup>3</sup> of AT and 30 cm of UC, to obtain after 21 days of culture a sufficient number of cells for clinical applications, for example in graft versus host disease (GvHD). Furthermore, in our expansion conditions, we required about 80 ml of hPPP obtainable from 150-200 ml of whole blood, as opposed to 350 ml of hPRP which requires 1000-1200 ml of whole blood.

The mitogenic response decreases when MEK signaling is inhibited by U0126, a MEK1/2 inhibitor. This result suggests that MEK 1/2 pathway is required to mediate a maximum mitogenic response of cells to GFs.

Our cocktails do not influence surface markers expression. AT and UC MSCs highly expressed CD 105, CD 90, and CD 44, whereas cells expressing CD 31, CD 34, CD 117 and CD 45 were lost with progressive passages, in line with the parameters proposed for MSCs by International Society for Cellular Therapy.

High levels of the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH) have proven to be a novel marker for the identification and isolation of hematopoietic stem cells (HSCs). Co-staining experiments revealed that >80% of ALDH+ umbilical cord blood cells were CD 34+. Based on our studies, ALDH combined with other surface markers (CD 45 and CD 105) can not be used exclusively to define MSCs derived from AT and UC in a manner similar to HSCs because of its low level (less than 50%).

Differentiation capacity into adipogenic and osteogenic lineage, tested at the end of P2, was confirmed only for AT MSCs. The exposure to EGF-bFGF-PDGFbb increased adipogenic differentiation as well as osteogenic one respect to cultures in FBS and hPPP, likely because these GFs commit MSCs to specific mesodermal differentiation.

This could represent a highly promising approach in tissue engineering for breast soft tissue reconstruction after mastectomy, tissue and subdermal defects after trauma or burn injury. AT MSCs were reported to have a slightly inferior potential for osteogenesis, with our GFs cocktail this “problem” could be overcome, a normal osteogenesis could take place and it could guarantee a large amount of osteogenic precursors for scaffold population.

UC MSCs, probably due to their ontogenetic age, did not show mineralization and the formation of lipid vacuoles, but they were more immunocompetent than AT ones in the presence of GFs. UC MSCs immunosuppressive effect, on T cells stimulated with phytohemagglutinin, was confirmed in all tested supplements and was

significant when MSCs:T cell ratio was 1:10. AT MSCs immunomodulation was detectable at 1:5 ratio in the presence of GFs cocktail and it was less marked than in FBS, likely because GFs, inducing cell maturation, reduce immunomodulatory potential. Whereas, UC MSCs, having relatively primitive nature, seem to be less influenced by cytokines than mature MSCs. We did not measure a significant immunosuppression when AT/UC MSCs and lymphocytes were separated by transwell. This suggests that the suppressive factor(s) are not constitutively secreted by MSCs and probably a pre-activation mediated by cell contact is required.

Recently, a number of clinical trials used cytokine induced killer (CIK) cells in an attempt to improve the effectiveness of HSC transplantation. CIK cells are a population of immune-effector cells CD 3<sup>+</sup> CD 56<sup>+</sup>, expanded in vitro by exposure to interferon  $\gamma$ , monoclonal anti CD3 and interleukin 2. They show cytotoxicity against a broad range of malignant cell targets, but not against normal CD 34<sup>+</sup> stem cells.

In view of relevant role of both MSCs and CIK cells, we explored the interactions between the two cell types. We found that CIK cells lysed UC MSCs in dose dependent manner, while UC cells killed CIK ones and suppressed their cytotoxicity against K562, a tumour target. These effects required cell to cell contact.

Our results should be taken into account in evaluating novel protocols of adoptive immunotherapy. They suggest to administer, at first, mesenchymal cells to optimize engraftment and to prevent GvHD, and then CIK cells to mediate graft versus leukemia.

In conclusion, our cocktails guarantee the expansion of an extremely homogeneous population of MSCs and a sufficient number of cells for clinical applications: committed AT MSCs in reconstructive medicine, and UC MSCs in hematologic context in combination with CIK cells.



# Indice

<b>1. Introduzione</b> .....	1
1.1 Cellule stromali mesenchimali: definizione.....	1
1.2 Fonti delle MSC: pregi e difetti.....	7
1.2.1 Midollo osseo.....	7
1.2.2 Sangue della vena del cordone ombelicale.....	9
1.2.3 Cordone ombelicale.....	10
1.2.4 Tessuto adiposo.....	12
1.2.5 Sangue periferico.....	13
1.2.6 Membrana e fluido amniotico.....	14
1.2.7 Placenta.....	15
1.3 Funzioni ed applicazioni cliniche delle MSC.....	18
1.3.1 L'immunomodulazione.....	18
1.3.1.1 L'azione delle MSC sul sistema immunitario è a 360°.....	18
1.3.1.2 I meccanismi ipotizzati nell'immunosoppressione: contatto cellulare e/o fattori solubili.....	20
1.3.1.3 Applicazioni cliniche presenti e future che sfruttino l'effetto Immunomodulante delle MSC.....	21
1.3.2 MSC e supporto all'emopoiesi.....	23
1.3.3 Altre applicazioni terapeutiche nella medicina ricostruttiva e rigenerativa.....	24
1.4 Terapie anticancro di ultima generazione e loro compatibilità con le MSC.....	25
1.4.1 Cellule NK attivate in LAK e MSC: una relazione pericolosa.....	25
1.4.2 Cellule CIK.....	28
1.5 L'espansione ex vivo delle MSC.....	29
1.5.1 Alternative al siero fetale bovino: il siero umano, il surnatante derivato dalle piastrine attivate, il lisato piastrinico e i mezzi <i>serum free</i> .....	29
1.5.2 Citochine: caratteristiche, funzioni e struttura.....	30
1.5.3 Citochine: <i>identity card</i> .....	33
1.5.3.1 Nome: <i>epidermal growth factor</i> , EGF.....	33
1.5.3.2 Nome: <i>basic fibroblast growth factor</i> , bFGF.....	36
1.5.3.3 Nome: <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> , G-CSF.....	38
1.5.3.4 Nome: <i>hepatocyte growth factor</i> , HGF.....	39
1.5.3.5 Nome: <i>insulin like growth factor I</i> , IGF I.....	41

1.5.3.6 Nome: <i>platelet derived growth factor</i> , PDGF.....	43
1.5.3.7 Nome: <i>transforming growth factor <math>\beta</math>1</i> , TGF $\beta$ 1.....	45
1.6 MSC: non è tutto oro quello che luce. Questioni aperte.....	46
<b>2. Scopo</b> .....	49
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	53
3.1 Preparazione dei supplementi ai mezzi di coltura.....	53
3.1.1 Preparazione di plasma umano povero di piastrine e plasma umano arricchito di piastrine.....	53
3.2 Isolamento e coltura.....	54
3.2.1 Isolamento delle MSC derivate da tessuto adiposo.....	54
3.2.2 Isolamento delle MSC derivate da cordone ombelicale.....	54
3.2.3 Espansione delle AT e UC MSC.....	55
3.2.4 Isolamento dei linfociti T.....	55
3.2.5 Isolamento ed espansione delle cellule CIK.....	56
3.2.6 Espansione K562.....	57
3.3 Definizione del cocktail di citochine.....	58
3.4 Ruolo di MEK 1/2 sulla proliferazione di AT e UC MSC in presenza dei cocktail di citochine.....	59
3.5 Valutazione <i>in vitro</i> della capacità differenziativa delle MSC espanse in mezzi supplementati con FBS, hPRP e hPPP in presenza ed assenza dei cocktail citochinici.....	59
3.5.1 Differenziamento osteogenico.....	59
3.5.2 Differenziamento adipogenico.....	60
3.6 Valutazione della morfologia.....	60
3.6.1 Colorazione con ematossilina-eosina.....	60
3.7 Analisi immunofenotipica mediante citofluorimetrica a flusso.....	61
3.8 Effetto immunomodulante delle AT e UC MSC nei diversi mezzi di coltura.....	63
3.8.1 Co-colture di AT e UC MSC con linfociti T attivati.....	63
3.9 Cellule CIK <i>versus</i> UC MSC.....	64
3.9.1 Effetto citotossico delle cellule CIK <i>versus</i> UC MSC rispetto ad un target tumorale.....	64
3.9.2 Co-colture tra UC MSC e cellule CIK.....	65
<b>4. Risultati</b> .....	67
4.1 Cellule stromali mesenchimali derivate da tessuto adiposo.....	67

4.1.1 Effetto di un <i>pool</i> di sette citochine sulla proliferazione delle AT MSC.....	67
4.1.2 Effetto a lungo termine del cocktail citochinico a base di EGF-bFGF-PDGFbb e ruolo di MEK 1/2 sulla proliferazione delle AT MSC.....	71
4.1.3 Immunofenotipo delle AT MSC.....	73
4.1.4 Capacità differenziativa.....	74
4.1.5 Morfologia delle AT MSC.....	75
4.1.6 Immunomodulazione.....	76
4.2 Cellule stromali mesenchimali derivate da cordone ombelicale.....	78
4.2.1 Effetto di un <i>pool</i> di sette citochine sulla proliferazione delle UC MSC.....	78
4.2.2 Effetto a lungo termine del cocktail citochinico a base di EGF-PDGFbb e ruolo di MEK 1/2 sulla proliferazione delle UC MSC.....	81
4.2.3 Immunofenotipo delle UC MSC.....	83
4.2.4 Capacità differenziativa.....	84
4.2.5 Morfologia delle UC MSC.....	85
4.2.6 Immunomodulazione.....	86
4.3 Relazione tra cellule CIK e UC MSC.....	88
4.3.1 Effetto delle cellule CIK sulle UC MSC.....	88
4.3.2 Effetto delle UC MSC sulle cellule CIK.....	90
<b>5. Discussione.....</b>	<b>95</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>103</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>105</b>



---

# 1. Introduzione

---

## 1.1 Cellule stromali mesenchimali: definizione

Negli ultimi vent'anni è drammaticamente aumentato l'interesse biologico e clinico per le cellule stromali mesenchimali (MSC) viste le loro potenzialità nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche, nella rigenerazione tissutale, nella terapia cellulare e genica.

Si tratta di cellule multipotenti, dalla morfologia fibroblastoide, capaci di auto rinnovarsi e originare tessuti di derivazione mesodermica come l'osso, la cartilagine, il muscolo, cellule stromali, tendini e tessuto connettivo.

La loro caratterizzazione non è sempre facile e univoca, per questo il *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* dell' *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) ha proposto nel 2006 dei criteri minimi per la definizione delle MSC umane (Dominici et al. 2006).

Tre sono le condizioni necessarie a tutt'oggi (tabella 1.1).

---

1. adesione alla plastica

---

2. fenotipo:	positivo ( $\geq 95\%$ )	negativo ( $\leq 2\%$ )
	CD 105	CD 45
	CD 73	CD 34
	CD 90	CD 14 o CD 11b
		CD 79 $\alpha$ o CD 19
		HLA-DR

Si consiglia un'analisi multicolore per la valutazione della co-espressione

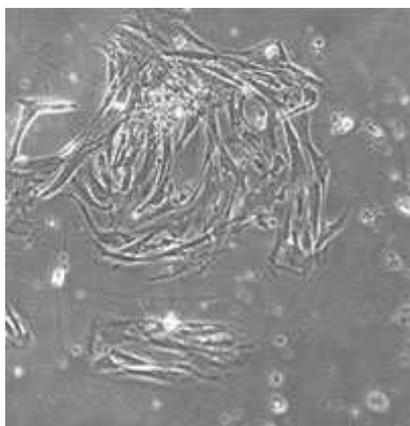
---

3. capacità di differenziamento *in vitro* in osteoblasti, adipociti e condrociti

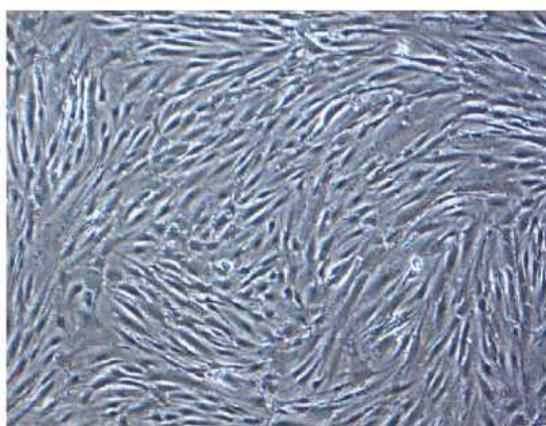
---

**Tabella 1.1.** Riassunto dei criteri identificativi delle MSC umane definiti dall'ISCT.

- 1) Le cellule devono possedere la capacità di aderire alla plastica di fiasche per colture cellulari in condizioni standard di coltura. Qui assumono una morfologia affusolata bipolare (figura 1.1 A) e, moltiplicandosi, originano un monostrato (figura 1.1 B).



**A**



**B**

**Figura 1.1.** **A.** Cellule stromali mesenchimali dalla caratteristica morfologia affusolata. **B.** Monostrato a confluenza di MSC da midollo osseo (BM).

- 2) Le MSC devono esprimere specifici antigeni (Ag) di superficie. Devono essere positive per una percentuale maggiore/uguale al 95% a:
- CD 105 o endoglina, originariamente riconosciuto dall'anticorpo monoclonale (MAb) SH2;
  - CD 73 o ecto 5' nucleotidase, riconosciuto dall'MAb SH3 e SH4;
  - CD 90 o Thy-1.

Devono nello stesso tempo mancare o essere espressi in percentuale inferiore al 2% CD 45 (marker pan-leucocitario); CD 34 (caratteristico dei progenitori ematopoietici e delle cellule endoteliali); CD 14 e CD 11b (espressi su monociti e macrofagi); CD 79  $\alpha$  e CD 19 (marker dei linfociti B) e HLA-DR (*human leukocyte antigen*).

Queste sono le condizioni necessarie e sufficienti per la caratterizzazione immunofenotipica, ma è da sottolineare che le MSC risultano positive anche per CD 166 (ALCAM), CD 29 (integrina  $\beta$ 1), CD 44 (H-CAM) e STRO-1. A seconda della fonte possono esprimere anche CD 349, Oct-4, nanog-3 e nestina. Come si vede, il pannello fenotipico è vario mancando un marker unico e specifico, ma in futuro nuovi Ag di superficie potrebbero facilitare l'isolamento,

la caratterizzazione e l'ottenimento di una popolazione pura di MSC. Di recente sono stati suggeriti a questo scopo:

a) CD 271 un recettore a bassa affinità per il fattore di crescita nervoso (Bühring et al. 2007). Questo ha consentito di identificare due popolazioni di MSC umane isolate da midollo osseo (BM, *bone marrow*):

CD 271<sup>bright</sup> e CD 271<sup>dim</sup> fenotipicamente, morfologicamente e funzionalmente diverse (tabella 1.2).

	CD 271 <sup>BRIGHT</sup>	CD 271 <sup>DIM</sup>
<b>Fenotipo</b>		
CD 40 (recettore per PDGF $\beta$ )	+	-
Clone W8B2	+	-
Clone W3D5	+	-
Clone W5C5	+	-
CD 56 + (epitopo diverso da quello delle cellule <i>natural killer</i> , NK)	+	-
Clone W1C3	Espressi a bassa intensità	-
Clone W5C4	Espressi a bassa intensità	-
CD 340	Espressi a bassa intensità	-
Clone HEK3D6	Espressi a bassa intensità	+
<b>Morfologia</b>		
	Alto contenuto citoplasmatico	Aspetto linfoblastoide immaturo
<b>Funzionalità</b>		
	Generano <i>fibroblast colony forming units</i> (CFU-F)	Non generano CFU-F

**Tabella 1.2.** Caratteristiche fenotipiche, morfologiche e funzionali delle sottopopolazioni di BM MSC CD 271<sup>+</sup>.

b) SSEA-4 antigene glicolipidico embrionale, marker delle cellule staminali embrionali pluripotenti (Gang et al. 2007). Circa il 2-4% delle BM MSC sono positive per questo marker e, una volta isolate ed espanse, aderiscono alla plastica, crescono 7 settimane senza mostrare segni di senescenza, non esprimono antigeni ematopoietici e si differenziano in adipociti, osteoblasti e cartilagine.

c) L'attività delle aldeide deidrogenasi (ALDH) è stata indicata come marker per l'identificazione dei progenitori ematopoietici (Storm et al 1999; Storm et al. 2005; Christ et al. 2007). Le ALDH sono proteine intracellulari responsabili dell'ossidazione delle aldeidi in acidi carbossilici. I membri di questa classe di enzimi hanno un ruolo chiave nel processamento dell'etanolo e delle ammine prodotte dal catabolismo delle catacolamine e dalla conversione della vitamina A in acido retinico. I progenitori ematopoietici CD 34+ mostrano alti livelli di ALDH citosolica e questo le rende resistenti agli agenti alchilanti. Per questa ragione un substrato fluorescente che lega l'ALDH si è dimostrato capace di identificare, quantificare e isolare le cellule staminali ematopoietiche (HSC) da BM, sangue periferico (PB) e da sangue della vena del cordone ombelicale (UCB), dove le cellule ALDH+ sono per il  $79.7 \pm 16.8\%$  CD 34+. Una strategia simile è stata tentata anche per le MSC derivate da tessuto adiposo, Mitchell (et al. 2006) riporta una positività all'ALDH superiore al 70%.

- 3) Le cellule devono mostrare la capacità di differenziarsi in osteoblasti, adipociti e condrociti *in vitro*.

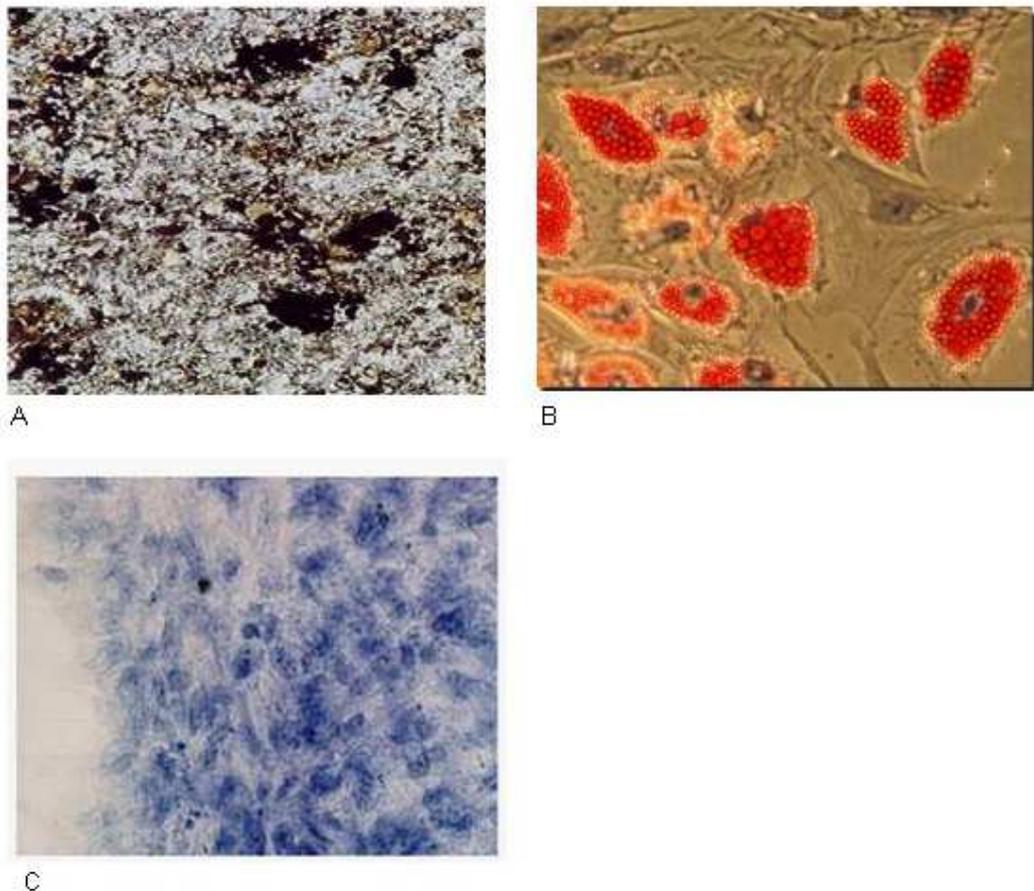
L'induzione del differenziamento in senso osteogenico è indicato dall'aumento della fosfatasi alcalina nelle fasi premature del processo (entro il secondo-quarto giorno), a partire dal nono-dodicesimo è rilevabile mediante colorazione di von Kossa la mineralizzazione, un marker degli osteoblasti maturi (figura 1.2 A)

Vacuoli lipidici e un nucleo schiacciato ai bordi della cellula sono indice del differenziamento adipogenico (figura 1.2 B). Questo interessa le cellule al centro delle colonie, mentre quelle in periferia restano indifferenziate e proliferanti. Le poche mesenchimali periferiche che evolvono in adipociti, migrano poi al centro, probabilmente "attirate" da un microambiente più favorevole.

Da un punto di vista molecolare, saggi di *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) hanno dimostrato che il differenziamento adipogenico è accompagnato dall'aumento dell'espressione di geni quali il PPAR  $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* ), C/ERB  $\alpha$  (*CCAAT enhancer-binding protein*), RXR  $\alpha$  (*retinoic x receptor  $\alpha$* ), ACS (*AcyCoA syntetase*), LPL (*lipoprotein lipase*) e FABP4 (*fatty acid binding protein 4*). I dati sono stati

confermati da studi con *microarray*, dove sono stati identificati anche geni critici per il metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e geni coinvolti nella gluconeogenesi, nella glicolisi, nella sintesi degli acidi grassi e nella lipogenesi (Sekiya et al. 2004).

Le MSC in presenza di *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) differenziano in senso condrogenico dando una micro-massa rilevabile con Alcian Blu (figura 1.2 C). TGF $\beta$  induce la condrogenesi via protein kinasi, come la p38, la protein kinasi A, la protein kinasi C e la kinasi Jun. La loro attivazione induce tra l'altro l'espressione di Wnt che up-regola l'espressione dell'N-caderina, una molecola di adesione necessaria nelle fasi iniziali della condrogenesi per la creazione del complesso d'adesione.



**Figura 1.2.** Per l'ISCT le cellule mesenchimali devono differenziare in senso: osteogenico con la formazione dei classici depositi di idrossiapatite rilevati con la colorazione di von Kossa (A); adipogenico, caratterizzato da vacuoli lipidici colorati con oil Red O (B); condrogenico con formazione di una micro-massa rilevata con Alcian blu (C).

Negli ultimi anni sono state dimostrate potenzialità trans-differenziative per le MSC di BM, tessuto adiposo (AT), timo, milza e UCB, ossia la capacità di generare, in presenza di opportuni mezzi, cellule di origine endodermica ed ectodermica.

In presenza di *fetal bovine serum* (FBS, 2%) e *vascular endothelial growth factor* (VEGF, 50 ng/ml), le MSC acquistano le caratteristiche di cellule simil-endoteliali esprimendo il fattore di von Willebrand, il recettore 1 e 2 per VEGF (FLT1 e KDR), VE-caderina e VCAM1. Le cellule però non esprimono CD 31 e CD 34, marker di cellule endoteliali mature, ma sono in grado di formare strutture capillare-simili (Oswald et al. 2004).

Tra le MSC derivate da BM, AT, timo e milza, differenziate in senso neuronale, si distinguono tre sottopopolazioni:

- il 60% delle cellule mostra forma bi/tri- polare con processi primari e secondari;
- il 20% delle MSC assume una morfologia simile agli oligodendrociti
- il restante 20% non mostra cambiamenti apparenti.

Il differenziamento neuronale indotto da fattori chimici è però transiente, al contrario una co-coltura con cellule di Schwann dà modifiche morfologiche e fenotipiche più durature. Si può concludere che i primi inducano solo cambiamenti iniziali, ma per completare il processo sono poi necessari dei fattori addizionali secreti da cellule neuronali mature (Krampera et al. 2007).

Anche le UCB MSC, in un mezzo differenziativo adatto, si contraggono e il loro corpo cellulare diventa tondo, triangolare o a forma di cono con processi multipolari. Esprimono NSE, una proteina citoplasmatica dei neuroni, e NF, un complesso composto da tre polipeptidi (NF-L, NF-M e NF-H). Si riscontrano anche i corpi di Nissl, peculiari strutture dei neuroni associate alla graduale maturazione delle cellule e costituite da reticolo endoplasmatico rugoso e ribosomi liberi. Mancano i tipici canali del sodio- $\text{Na}^+$ , ma ci sono quelli del potassio- $\text{K}^+$  (Hou et al. 2003; Park et al. 2006).

E' stata riportata per BM e UCB MSC la capacità di differenziare in miociti (Gang et al. 2004). La miogenesi è regolata da una famiglia di fattori regolatori, inclusi Myf5, MyoD, miogenina e MRF4. MyoD e Myf5 sono richiesti per indirizzare verso la linea miogenica, mentre la miogenina e MRF4 regolano la fusione e le fasi terminali del differenziamento. Le UCB MSC esprimono

MyoD a partire dal terzo giorno, mentre la miogenina raggiunge il picco dopo una settimana. Dopo 21 giorni è rilevabile la miosina che poi aumenta significativamente fino alla sesta settimana.

Sempre le UCB MSC sembrano in grado di originare epatociti assumendo una morfologia cuboide ed esprimendo bassi livelli di  $\alpha$ -fetoproteina, citocheratina 18, albumina e tiroxina aminotransferasi. Mostrano poi anche la capacità di legare lipoproteine a bassa densità (LDL), caratteristica funzionale degli epatociti (Lee et al. 2004).

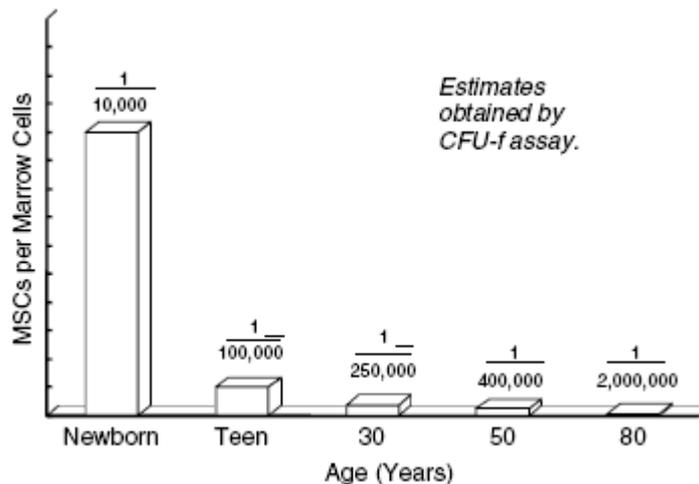
## **1.2 FONTI DELLE MSC: PREGI E DIFETTI**

### **1.2.1 Midollo osseo**

Il midollo osseo è stato il primo tessuto da cui sono state isolate negli anni '70 da Friedenstein le MSC, e continua ad essere la fonte più studiata e usata nei protocolli clinici.

Queste cellule, rispondenti ai criteri definiti dall'ISCT, sono isolate dalle mononucleate (MNC) del midollo dopo separazione su gradiente di densità o con l'ausilio di anti p75LNGFR (Quirici et al. 2002), o STRO-1 (Gronthos et al. 1994) o di anti CD 133 (Masiero et al. 2004; Perry et al. 2005). CD 133, un marker per le cellule staminali ematopoietiche, è anche espresso sulla superficie apicale delle cellule epiteliali neuronali, sugli epiteli embrionali, sul tubulo prossimale del rene nell'adulto e sulle cellule staminali neuronali adulte. La sua funzione è sconosciuta, sta di fatto che una parte delle cellule CD 133+ aderisce e si differenzia ex vivo in osteoblasti, adipociti, mioblasti, condrociti e cellule endoteliali, così come le p75LNGFR+ e le STRO-1+.

Le BM MSC hanno rappresentato per anni un target promettente per le terapie cellulari, ma ultimamente si sono sollevate delle riserve sul loro utilizzo. Il prelievo è, prima di tutto, invasivo e le cellule sono presenti a bassissima frequenza (1-3,4 MSC su  $10^4$  MNC. Bonab et al. 2006). In più, il loro numero è destinato a diminuire con l'avanzare dell'età (da 1 su  $10^4$  nel neonato si passa a 0,5 su  $10^6$  nell'adulto di 80 anni. Figura 1.3), cosa non trascurabile nel caso di trapianto autologo nel paziente anziano.



**Figura 1.3.** Frequenza delle MSC nel midolo osseo in relazione all'età del donatore stimate sulla base del numero di CFU-F.

Le cellule isolate ed espanse da soggetti anziani, inoltre, si replicano più lentamente ( $76,1 \pm 23,4$  ore rispetto alle  $44,0 \pm 7,7$  ore del giovane), con prolungamento della durata di tutte le fasi del ciclo cellulare. Anche la potenzialità differenziativa ne risente diminuendo. Nell'adulto si riscontra poi un numero maggiore di MSC positive all'SA- $\beta$ -gal responsabile della produzione di enzimi degradativi e citochine infiammatorie che compromettono l'organizzazione e la funzionalità del tessuto. Con l'età si osserva anche un incremento di p53, p21 e BAX. p53 è conosciuta per giocare un ruolo chiave nella senescenza e nell'apoptosi indotta da disfunzioni ai telomeri e da stress genotossico. Una volta attivata, p53 induce p21 e BAX che mediano rispettivamente la senescenza e l'apoptosi. L'attivazione della via p53/p21 potrebbe spiegare la ridotta proliferazione, mentre p53/BAX l'aumento dell'apoptosi (Zhou et al. 2008).

L'effetto finale di tutto questo è l'impossibilità di ottenere un numero sufficiente di cellule per l'applicazione clinica in brevi periodi. Con l'aumento dei tempi di coltura, Bonab (et al 2006), Mareschi (et al. 2005) e Stolzing (et al. 2008) hanno riscontrato:

- una riduzione della capacità proliferativa: al passaggio 1 (P1) il *population doubling* (PD) è di  $7,7 \pm 0,55$  e diventa  $1,2 \pm 0,73$  a P10;
- un accorciamento dei telomeri;
- la parziale perdita della capacità differenziativa in senso osteogenico ed adipogenico;
- la comparsa di anomalie morfologiche: aumento delle dimensioni, passaggio

ad una forma poligonale, granulazione nel citoplasma seguita da vacuolizzazione, arrotondamento della cellula, distacco dalla fiasca e relativa comparsa di detriti cellulari nel mezzo di coltura.

### **1.2.2 Sangue della vena del cordone ombelicale**

Durante lo sviluppo fetale l'emopoiesi avviene via via in organi diversi (dal fegato e la milza al midollo osseo), si pensa che le componenti cellulari di questo processo, ossia HSC e MSC, siano in grado di essere mobilizzate nel sangue e quindi di migrare in organi diversi.

Partendo da questo presupposto, Erices (et al. 2000) ha dimostrato per la prima volta la presenza di MSC nel 25% dei campioni di UCB da lui trattati. In particolare dalle MNC si originano, come confermato anche da Park (et al. 2006), due tipi di cellule aderenti: 1) osteoclasto-simile; 2) simil-mesenchimale. La morfologia delle prime è eterogenea ed allungata o ovale/rotonda, con bordi lisci e in alcuni casi con estensioni citoplasmatiche. Sono di solito in contatto tra loro e multinucleate con nuclei aggregati attorno ad un'area centrale. Sono positive per la fosfatasi acida, ma negative per gli acidi di Schiff ed esprimono CD 51/61.

Le cellule simil-mesenchimali presentano la caratteristica forma affusolata, sono positive per gli acidi di Schiff, ma negative per la fosfatasi acida. Esibiscono una capacità proliferativa maggiore delle BM MSC senza modifiche morfologiche e riduzione della proliferazione nel tempo. I marker di superficie sono quelli classici delle mesenchimali, così come la potenzialità osteogenica, condrogenica, neurogenica, miogenica ed epatogenica (Park et al. 2006; Bieback et al. 2004; Lee et al. 2004; Campagnoli et al. 2001; Gang et al. 2004; Goodwin et al. 2001; Che et al. 2005). L'adipogenesi non è invece confermata da tutti i gruppi di studio e sembra inferiore a quella delle BM MSC (Bieback et al. 2004), questo potrebbe essere legato all'età ontogenica delle cellule.

Per alcuni autori la presenza di UCB MSC rimane comunque difficile da dimostrare. Mareschi (et al. 2001) e Wexler (et al. 2003) riportano, infatti, l'estrema difficoltà o l'impossibilità di isolare mesenchimali da questa fonte. Le cellule da loro ottenute non raggiungono la confluenza, sono eterogenee, non proliferano e non sopravvivono dopo il primo passaggio. Non originano CFU-F, mostrano un fenotipo ematopoietico (CD 45+ , CD 14+ e CD 31+) e non differenziano.

Le discordanze riportate derivano probabilmente dall'assenza di una procedura standardizzata per la selezione, il processamento e l'espansione delle UCB MSC.

A questo si deve aggiungere l'esistenza di molti parametri critici:

- la bassa frequenza di MSC (0-2,3 su  $10^8$  MNC), questo spiega perchè solo dal 20-30% dei campioni trattati è riuscito l'isolamento. Inoltre, secondo Campagnoli e colleghi (2001), la frequenza declina con l'avanzare della gestazione. Nel primo trimestre è stata valutata in  $8,2 \pm 0,6$  su  $10^6$  MNC, al secondo e terzo, con le stesse condizioni di isolamento, non è stato possibile rilevare MSC. Questo fa ritenere che la frequenza di MSC circolanti declini in seguito alla migrazione da un sito ematopoietico all'altro durante l'ontogenesi.
- Il tempo tra raccolta e lavorazione non deve superare le 15 ore.
- Il volume di partenza deve essere superiore a 33 ml.
- Il campione non deve presentare segni di coagulazione o emolisi.
- Il pre-trattamento della fiasca con FBS sembra favorire l'adesione e la crescita.
- La procedura di isolamento avviene a spese delle HSC.

Nonostante tutto questo, le cellule da UCB sono più immature e meno immunogeniche delle adulte, non sussistono problemi etici e possono essere raccolte con procedura non invasiva o pericolosa per il nascituro.

### **1.2.3 Cordone ombelicale**

Oltre che dal sangue cordonale, le MSC sono state isolate da diversi comparti del cordone ombelicale (UC). Quest'ultimo si forma al ventiseiesimo giorno di gestazione e cresce fino a formare un organo elicoidale della lunghezza di 30-50 cm (figura 1.4). E' composto da tre vasi, una vena e due arterie, circondate dalla gelatina di Wharton e ricoperti da epitelio amniotico. La gelatina di Wharton è tessuto connettivo mucoso, una matrice ricca di: 1) fibre collagene di tipo I, III, V e VI che danno filamenti spessi da 10 nm aggregati in fasci con una distribuzione simile a quella della fibre elastiche; 2) ialuronano; 3) glucosaminoglicani; 4) microfibrille glicoproteiche di 13 nm di diametro che si intersecano con la rete di collagene (Franc et al. 1997).



**Figura 1.4.** Il cordone ombelicale durante la gestazione cresce fino ad una lunghezza di 30-50 cm assumendo una struttura elicoidale.

Le MSC sono state ottenute dal subendotelio della vena (Kadivar et al. 2006; Romanov et al 2003) e dalla gelatina di Wharton, in particolare dalla zona perivascolare, intervascolare e subamniotica (Lu et al. 2006; Sarugaser et al. 2005; Mitchell et al. 2003; Barsh et al. 2007; Karahuseyinoglu et al. 2007; Troyer et al. 2007).

Come le UCB MSC, quelle isolate dal cordone ombelicale presentano un tempo di duplicazione inferiore alle BM MSC, 24 ore rispetto alle 40, che inoltre resta costante fino al decimo passaggio, mentre per quelle derivate da BM aumenta ulteriormente dopo P6 (Lu et al. 2006).

Rispetto alle MSC “adulte”, sono cariotipicamente stabili, non perdono l’inibizione da contatto e non vanno incontro a modifiche morfologiche nel tempo. Queste caratteristiche portano a considerare le mesenchimali isolate da cordone ombelicale più primitive di quelle da BM.

Si differenziano in osteociti più rapidamente delle BM MSC (Barsh et al 2007), in condrociti, neuroni (Mitchell et al. 2003; Kadivar et al. 2006), cellule cardiache, muscolari ed endoteliali; mentre l’adipogenesi non è confermata da tutti i gruppi come per le UCB MSC.

L’efficienza di isolamento del 100% è garantita da una frequenza di CFU-F di una mesenchimale su 300 MNC (Sarugaser et al. 2005) o 1 MSC su 1609 MNC (Lu et al. 2006), che risulta essere significativamente più alta rispetto a UCB e BM. Questo, insieme all’elevata capacità proliferativa, permette una riduzione dei tempi di coltura per l’ottenimento del *quorum* di cellule necessario per la somministrazione clinica.

I marker di superficie sono quelli delle BM MSC, così come le citochine secrete, a parte che le UC MSC producono anche *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) e *granulocyte/macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) [Lu et al 2006].

Resta confermato l'effetto immunomodulante e il supporto all'emopoiesi.

Quanto detto, insieme all'accessibilità, alla facile manipolazione e all'assenza di limitazioni etiche, rende il cordone ombelicale una fonte promettente nella medicina rigenerativa e per la terapia cellulare/genica.

#### **1.2.4 Tessuto adiposo**

Il tessuto adiposo (figura 1.5 A e B) è un'altra fonte alternativa che può essere ottenuta in modo poco invasivo e in grande quantità dal tessuto sottocutaneo mediante liposuzione, la procedura di isolamento, basata sulla digestione enzimatica, è inoltre rapida e con una percentuale di successo del 100%.

Si tratta di un tessuto altamente complesso costituito da adipociti maturi, preadipociti, fibroblasti, cellule muscolari, endoteliali, monociti/macrofagi e linfociti. La frazione stromale vascolare derivata dalla digestione dell'AT ha una composizione molto eterogenea. Nei primi passaggi le cellule che esprimono i marker stromali (CD 13, CD 29, CD 44, CD 73, CD 90, CD 105, CD 166) sono poco presenti, con il progredire della coltura il loro numero aumenta e le percentuali di espressione dei CD stromali superano il 90%, eccetto il CD 105 che si arresta ad un 70% (Mitchell et al. 2006). Anche l'attività dell'aldeide deidrogenasi (ALDH) segue un andamento analogo raggiungendo un picco a fine P4 del 70%, poi cala e si porta al 10% a P9. L'immunofenotipo è quindi quello caratteristico delle MSC (Schaffler et al. 2007; Astori et al. 2007; Mitchell et al. 2006; Kern et al. 2006)

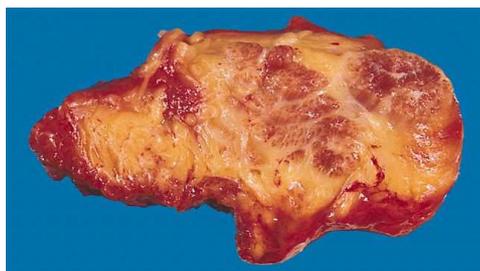
Le mesenchimali derivate da AT condividono con le BM MSC la morfologia fibroblastoide, la capacità differenziativa in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico (Schaffler et al. 2007; Astori et al. 2007; Kern et al. 2006), nonché la capacità immunomodulante su linfociti T attivati (Yanez et al. 2006).

Quello che invece le differenzia sono: 1) la frequenza di CFU-F nettamente superiore per l'AT (una AT MSC su 32 MNC [Mitchell et al. 2006]; una mesenchimale su 4880 MNC [Astori et al. 2007]); 2) la capacità proliferativa delle AT MSC è maggiore di quella delle mesenchimali derivate da BM (Kern et al. 2006), soprattutto in

caso di donatori giovani (Shi et al. 2005), ma resta comunque inferiore a quella delle UCB MSC (Kern et al. 2006). Quando però le cellule staminali sono isolate da BM e AT dello stesso paziente, non si riscontrano differenze significative riguardo la cinetica di crescita, la senescenza, la capacità differenziativa e l'efficienza di transduzione genica (De Ugarte et al. 2003).

E' da sottolineare la mancanza di dati dell'effetto sulle AT MSC del tipo di tessuto adiposo (bianco o bruno), la localizzazione (viscerale [figura 1.5 A] o sottocutaneo [figura 1.5 B]), della procedura chirurgica, delle condizioni di coltura, dell'esposizione a plastiche diverse, della densità di semina e della composizione dei mezzi.

L'AT è perciò una fonte dalle caratteristiche promettenti, ma che necessita di ulteriori e più approfonditi studi.



A



B

**Figura 1.5.** Tessuto adiposo viscerale derivato da addomino plastica (A). AT sottocutaneo è ottenibile mediante liposuzione (B).

### 1.2.5 Sangue periferico

La presenza delle MSC nel sangue periferico è contrastante. Questo è probabilmente dovuto al basso numero di mesenchimali circolanti in condizioni normali. Il numero di colonie su  $10^6$  MNC è stato riportato tra 0-0,025 (Kuznetsov et al. 2001), 0,080-0,0286 (He et al. 2007) e  $0,27 \pm 0,22$  (Cao et al. 2005). Arricchimenti di CFU-F si sono riscontrati sottoponendo i campioni a: 1) deplezione di CD 6 (Conrad et al. 2002); 2) immunoselezione con CD 133 (Tondreau et al. 2005); 3) partendo da *buffy coat* poi sottoposto a separazione su gradiente di densità (Zvaifler et al. 2000); 4) ricorrendo a microbiglie di fibrina (Kassis et al. 2006) e PB arricchito di progenitori mediante pre-trattamento del paziente con G-CSF (Kassis et al. 2006; Fernandez et al. 1997), un fattore di crescita che modula l'espressione o la funzione di molecole

citoadesive presenti sulla superficie di cellule progenitrici, in più produce profondi cambiamenti morfologici e immunoistochimici nello stroma midollare e nella matrice extracellulare. Il numero di progenitori secreti dopo trattamento con G-CSF è comunque variabile, legato all'età del donatore, alla sua condizione di salute e al tempo intercorso tra la somministrazione del farmaco e l'aferesi.

Le cellule isolate condividono i marker di superficie delle BM MSC (Fernandez et al. 1997; Kassis et al. 2006; He et al. 2007), anche se Kuznetsov (et al. 2001) non registra la presenza del CD 105; mostrano la capacità di differenziarsi in adipociti, osteociti e condrociti (He et al. 2007; Kassis et al. 2006), ma il basso numero di MSC presenti resta un fattore limitante per lo sfruttamento di questa fonte.

### **1.2.6 Membrana e fluido amniotico**

La membrana amniotica (AM) è lo strato più interno della placenta e consiste di un sottile strato epiteliale, una membrana basale e uno stroma avascolare. Qui sono riconoscibili due tipi cellulari con diverse origini embrionali: cellule epiteliali amniotiche derivate dall'ectoderma embrionale e cellule mesenchimali amniotiche dal mesoderma embrionale.

Da 4 cm<sup>2</sup> di membrana digerita enzimaticamente sono state ottenute a fine P0 1,3-1,5 10<sup>6</sup> AM MSC, considerando che la superficie totale è 1300 cm<sup>2</sup> si può ipotizzare l'isolamento di 4\*10<sup>8</sup> cellule, una quantità sufficiente per un'eventuale applicazione clinica.

Un'altra caratteristica rilevante è l'espressione di Oct4, marker caratteristico delle cellule staminali embrionali che viene down regolato durante il differenziamento.

Le AM MSC, oltre a rispondere ai requisiti dell'ISCT, sono in grado di differenziare in miociti e cellule endoteliali (Alviano et al. 2007).

Il fluido amniotico (AF) è un liquido situato nella cavità amniotica con funzione protettiva e veicolo per gli scambi con la madre. Compare all'inizio della seconda settimana di gestazione e aumenta in volume durante la gravidanza. E' composto di acqua ed elettroliti (98-99%), sostanze chimiche (glucosio, lipidi, proteine, ormoni ed enzimi) e cellule.

Le AF MSC rappresentano lo 0,9-1,5% delle cellule totali presenti nel liquido (Cananzi et al. 2009); Sessarego e colleghi (2008) riferiscono la presenza di 3 MSC in 1 ml di liquido, in entrambi gli studi il successo di isolamento è del 100%.

Mostrano una capacità proliferativa superiore alle BM MSC. Questo può essere dovuto al tempo di duplicazione minore (25 ore versus 30-90 ore delle mesenchimali da midollo osseo. Sessarego et al. 2008; Cananzi et al. 2009), e alla presenza di telomeri più lunghi (Sessarego et al. 2008). La potenzialità espansiva è inoltre influenzata dalla densità di semina: piastrando le AF MSC a 400/cm<sup>2</sup> si registra a P6 un cPD di 21,8, contro un cPD di 10,4 a 4000 MSC/cm<sup>2</sup> (Sessarego et al. 2008).

Il cariotipo è stabile e sono confermate la capacità differenziativa, l'espressione dei marker mesenchimali e l'effetto immunomodulante sui linfociti T attivati.

Entrambi le fonti sono ottenibili senza conflitti etici e procedura invasiva o pericolosa per il feto e la madre.

### 1.2.7 Placenta

La placenta (PL) umana è un organo formato sia da tessuti fetali che materni che supporta lo sviluppo embrionale e fetale. Post-parto è espulsa quindi non sussistono problemi etici e procedure invasive di ottenimento.

Le PL MSC si ipotizza siano più primitive delle mesenchimali adulte. Oltre ai classici marker di superficie indicati dall'ISCT, esprimono anche l'SSEA-4, TRA-1-61 e TRA-1-81, caratteristici delle cellule staminali embrionali, e geni derivati da mesoderma, ectoderma ed endoderma (Yen et al. 2005; Fukuchi et al. 2004).

La loro capacità espansiva è maggiore delle BM MSC e, nelle opportune condizioni di coltura, differenziano in senso adipogenico, osteogenico e neurogenico.

In tabella 1.3 sono riassunte le caratteristiche delle MSC ottenute dalle fonti sopra esposte.

Fonte	Ottenimento	Frequenza	Vantaggi	Limiti
Midollo osseo	Separazione su gradiente di densità anti CD 133 anti STRO-1 anti p75NGFR	1-3,4 su 10 <sup>4</sup> MNC	BM MSC rispondono ai requisiti dell'ISCT  Sono adottate in protocolli clinici	Con l'età: ↓ proliferazione, ↓ capacità differenziativa, ↑ apoptosi  Aumentando il tempo di coltura: ↓ proliferazione, ↓ capacità differenziativa, comparsa di anomalie morfologiche, ↓ frequenza  Prelievo invasivo

Sangue cordonale	Separazione su gradiente di densità  Immunodeplezione negativa di CD 3+, 14+, 19+, 38+, 66b+ e glicoforina A+ (Lee et al. 2004)	0-2,3 su 10 <sup>8</sup> MNC	<p>↑ Proliferazione</p> <p>Assenza di cambiamenti morfologici e calo della proliferazione nel tempo</p> <p>+ immature</p> <p>- immunogene</p> <p>procedura non invasiva o pericolosa</p> <p>assenza di problemi etici</p> <p>differenziamento in cellule che originano da tutti i foglietti embrionali (osteociti, condrociti, neuroni ed epatociti)</p>	<p>↓ Successo isolamento (20-30%)</p> <p>↓ Frequenza di MSC, il progredire della gestazione la abbassa ulteriormente</p> <p>↑ Volume di partenza (non inf. 33ml)</p> <p>Differenziamento adipogenico non confermato</p> <p>Richiesto prolungamento del tempo di coltura per avere un n° suff. di MSC per l'applicazione clinica</p> <p>La procedura di isolamento avviene a spese delle HSC</p>
Fegato fetale	Separazione su gradiente di densità	I° trimestre 11,3±2,0 su 10 <sup>6</sup> MNC	A P20 cPD è di 50	Il prelievo del tessuto durante la gestazione è associato ad alta morbilità e mortalità del feto e della madre
Midollo fetale	Separazione su gradiente di densità	I° trimestre 12,6±3,6 su 10 <sup>6</sup> MNC	A P20 cPD è di 50	Il prelievo del tessuto durante la gestazione è associato ad alta morbilità e mortalità del feto e della madre
Cordone ombelicale	Sminuzzamento e digestione enzimatica	1 MSC su 333 MNC 1 MSC su 1609 MNC	<p>Fonte accessibile e assenza impedimenti etici, con successo di isolamento del 100%</p> <p>Cariotipo stabile</p> <p>↑ CFU-F</p> <p>↓ Tempo di duplicazione (20h)</p> <p>↑ Proliferazione</p> <p>↓ Tempi di coltura</p> <p>Cellule + primitive</p> <p>Differenziamento osteogenico, condrogenico, neuronale, muscolare ed endoteliale</p>	Differenziamento adipogenico non confermato

Tessuto adiposo	Sminuzzamento e digestione enzimatica	1 MSC su 32 MNC 1 MSC su 4880 MNC	Procedura poco invasiva e grande quantità di materiale Procedura di isolamento rapida Frequenza di successo 100% ↑ CFU-F ↑ Proliferazione, aumenta in donatori giovani Immunofenotipo (IF) e differenziamento simile a BM MSC Confermato effetto immunomodulante	Poco studiato l'effetto del tipo di TA, localizzazione, procedura chirurgica, condizioni di coltura, plastiche, mezzi, densità
Sangue periferico	Buffy coat + separazione su gradiente di densità Deplezione CD 6 Immunoselezione CD 133 Microbiglie di fibrina + somministrazione G-CSF	0-0,025 MSC su 10 <sup>6</sup> MNC 0,27±0,22 MSC su 10 <sup>6</sup> MNC 0,0280-0,0286 MSC su 10 <sup>6</sup> MNC	Differenziamento ed IF simile a BM MSC	↓ CFU-F Presenza CD 105 non confermato da tutti i gruppi di studio Numero progenitori post G-CSF variabile con l'età del donatore, condizione di salute, terapie precedenti, tempo tra somministrazione ed aferesi
Liquido/membrana amniotica	AF MSC centrifugazione a 400 g AM MSC Digestione enzimatica	AF MSC: 3 MSC su 1 ml 0,9-1,5% delle cellule amniotiche	100% successo isolamento IF e differenziamento simile BM MSC (AM MSC anche in miociti ed endoteliali) ↑ Proliferazione (AF MSC: aumenta diminuendo la densità) ↓ Tempo di duplicazione (AF MSC: 25h) Assenza di impedimenti etici Procedura non invasiva o pericolosa	Sono necessari altri studi di conferma ed approfondimento

Placenta	Digestione enzimatica		↑ Proliferazione + primitive delle MSC adulte IF simile BM MSC Differenziamento adipo/osteo/neuro-genico	Sono necessari altri studi di conferma ed approfondimento
----------	-----------------------	--	---	---

**Tabella 1.3.** Rappresentazione schematica delle caratteristiche delle MSC ottenute dalle principali fonti riportate in letteratura.

## 1.3 Funzioni ed applicazioni cliniche delle MSC

### 1.3.1 L'immunomodulazione

#### 1.3.1.1 L'azione delle MSC sul sistema immunitario è a 360°

Le cellule stromali mesenchimali hanno suscitato l'interesse non solo dei ricercatori, ma anche dei clinici per la loro capacità di inibire *in vitro* e *in vivo* la proliferazione delle cellule T in seguito all'arresto della divisione nella fase G0-G1 del ciclo cellulare. Questo stato di quiescenza è comunque reversibile mediante stimolazione con interleuchina 2 (IL2), ed è accompagnato da un calo della produzione di interferone  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) e un aumento della secrezione di IL4 da parte dei T *helper*, che suggerisce uno *shift* delle cellule dallo stato pro-infiammatorio, caratterizzato dalla secrezione di INF  $\gamma$ , ad uno stato anti-infiammatorio con la liberazione di IL4. Sui T citotossici CD 8 positivi, le mesenchimali causano una riduzione del potere citotossico.

Le cellule T regolatorie sono una sottopopolazione di linfociti T che bloccano l'attivazione del sistema immunitario (SI) ed intervengono nell'omeostasi e nella tolleranza verso gli antigeni *self*. E' stato riportato che le MSC, inducendo la produzione di IL10 da parte delle cellule dendritiche (DC) plasmacitoidi, determinano la generazione di T regolatrici (Selmani et al. 2008) e il rilascio di HLA-G5.

Il blocco della proliferazione colpisce anche altre classi di cellule come le DC, le NK, i neutrofili e i linfociti B.

La maturazione delle cellule dendritiche, che hanno un ruolo fondamentale nella presentazione dell'antigene alle cellule T, è inibita dalle MSC. Le dendritiche mature, invece, mostrano un calo dell'espressione di MHC II (*Major histocompatibility complex II*), CD 11c, CD 83 e di altre molecole co-stimolatrici e pro-infiammatorie,

come il fattore di necrosi tumorale (TNF), con conseguente compromissione della loro funzione presentante.

Sulle DC plasmacitoidi, cellule specializzate nella produzione di alti livelli di INF-1 in risposta a stimoli microbici, le MSC *up* regolano la secrezione di IL10, una citochina anti-infiammatoria (Jiang et al. 2005; Ramasamy et al. 2007; Aggarwal et al. 2005).

Le NK sono importanti cellule effettrici dell'immunità innata ed esplicano il loro effetto antivirale ed antitumorale tramite azione citolitica e la produzione di citochine pro-infiammatorie. Le MSC inibiscono l'azione citotossica delle NK non attivate *down* regolando l'espressione di Nkp30 e NKG2D, recettori coinvolti nell'attivazione delle NK e nella soppressione delle cellule bersaglio (Spaggiari et al. 2006). Sulle NK stimulate con IL2 o IL15 le MSC riducono notevolmente la produzione di INF  $\gamma$ .

I neutrofili, un'altra classe di globuli bianchi implicati nell'immunità innata, dopo legame al batterio vanno incontro ad un processo noto come *respiratory burst*, questo viene depresso dalle mesenchimali che ritardano l'apoptosi spontanea dei neutrofili aumentandone la vita media (Djouad et al. 2007; Raffaghello et al. 2008).

Le MSC inibiscono poi la proliferazione, il differenziamento e l'espressione di recettori specifici per alcune chemochine dei linfociti B, specializzati nella produzione di anticorpi (Augello et al. 2005; Concione et al. 2006). Questo effetto sembra dipendere sia dal rilascio di fattori solubili che dal contatto cellula-cellula, ed essere mediato in particolare dall'interazione di PD1 (*programmed cell death 1*) con il suo ligando. Altri studi riportano l'esatto contrario di quanto appena descritto, ossia che le MSC supportano la proliferazione e il differenziamento delle cellule B (Traggiari et al. 2008).

Presi insieme questi risultati consentono di ipotizzare che, *in vivo*, l'inibizione della maturazione delle DC mediata dalle MSC riduca l'efficienza della presentazione dell'antigene e dell'espansione clonale delle cellule T. Aumentando le DC immature verrebbe poi favorita sia l'eliminazione delle NK che l'inibizione della loro proliferazione, dell'azione citotossica e della secrezione di citochine pro-infiammatorie. L'interazione diretta delle MSC con i linfociti T potrebbe arrestarne la replicazione, inibire la citotossicità dei T CD 8+ e incrementare l'attivazione dei T regolatori con conseguente deficit dei T *helper* fondamentali per l'innescamento della proliferazione e

maturazione dei linfociti B. Questo effetto indiretto sulle cellule B potrebbe poi essere rafforzato da uno inibitorio diretto svolto dalle MSC.

### **1.3.1.2 I meccanismi ipotizzati nell'immunosoppressione: contatto cellulare e/o fattori solubili**

Anche se esistono molti studi che hanno documentato l'azione immunosoppressiva delle MSC, il meccanismo è conosciuto solo in parte.

Si ritiene che il contatto cellulare e fattori solubili collaborino nell'immunomodulazione mediata dalle mesenchimali.

Il primo *step* coinvolge probabilmente il contatto cellula-cellula ed è mediato da molecole di adesione. Ad esempio, in seguito all'interazione diretta con i linfociti T, le MSC rilasciano IL10 che gioca un ruolo chiave nella secrezione da parte delle stesse mesenchimali di HLA-G5 solubile che sopprime l'attivazione di cellule T, di NK, riduce la citotossicità dei T CD 8+ e promuove la generazione di T regolatori (Selmani et al. 2008; Moranti et al. 2008).

Esistono poi numerosi fattori solubili immunosoppressivi che sono rilasciati dalle MSC costitutivamente o in seguito ad interazione con le cellule target. Rientrano in quest'ultimo gruppo l'ossido nitrico e l'indolamina 2,3-diossigenasi (IDO), rilasciate dalle MSC sotto stimolazione di INF  $\gamma$  secreto dalle cellule bersaglio. L'IDO induce la deplezione dal microambiente di triptofano, un aminoacido (aa) essenziale per l'attivazione dei linfociti T (Krampera et al. 2005; Ryan et al. 2003). Inoltre, l'INF  $\gamma$  secreto dalle cellule target, da solo o in combinazione con TNF, IL1 $\alpha$  o IL1 $\beta$ , stimola le MSC a rilasciare N-ossido sintetasi che inibisce l'attivazione dei linfociti T attraverso la produzione di ossido nitrico (Ren et al. 2008; Sato et al. 2006).

Altri fattori solubili, come TGF $\beta$ 1, HGF (*hepatocyte growth factor*), IL10, prostaglandina E2 (PGE2), HO1 (*haem oxygenase 1*), IL6 e HLA-G5 solubile, sono costitutivamente prodotti dalle MSC (Di Nicola et al. 2002; Aggarwal et al. 2005; Selmani et al. 2008; Meisel et al. 2004; Chabannes et al. 2007; Morandi et al. 2008; Kopler et al. 2005) e la loro secrezione può essere ulteriormente incrementata dalle citochine liberate dalle cellule target dopo interazione con le MSC. Ad esempio, TNF e INF  $\gamma$  secrete dalle cellule bersaglio aumentano la produzione di PGE2 da parte delle mesenchimali.

E' chiaro che nessuna di queste molecole ha un ruolo esclusivo e che la regolazione dell'immunosoppressione mediata dalle MSC è un sistema ridondante dove intervengono numerose molecole.

### **1.3.1.3 Applicazioni cliniche presenti e future che sfruttino l'effetto immunomodulante delle MSC**

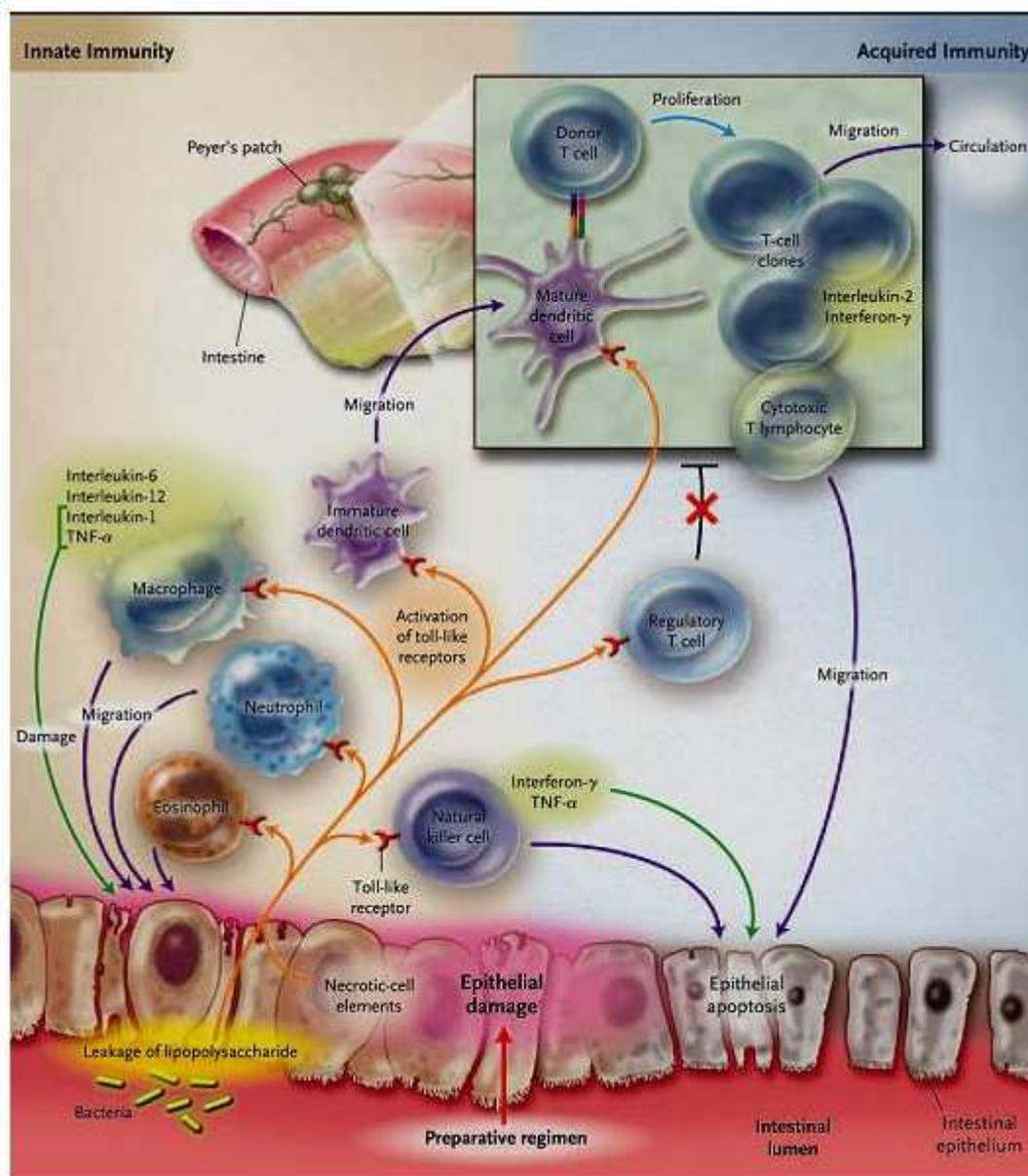
Visto l'effetto immunomodulante delle MSC, Bartholomew e colleghi (2001) per primi dimostrarono che la loro somministrazione *in vivo* poteva prolungare la sopravvivenza dopo innesto di pelle. Questo ed altri studi hanno fatto da apripista all'applicazione clinica delle MSC.

I risultati più significativi sono stati ottenuti nel trattamento della *graft versus host disease* (GvHD) grave e farmaco resistente. E' stato però notato che la co-somministrazione di MSC e HCS se da una parte previene efficacemente la GvHD, dall'altra sembra compromettere la *graft versus leukemia* (GvL) o effetto anti-leucemia svolto dal sistema immunitario del donatore, come confermato dall'alta incidenza di ricadute in pazienti leucemici trattati con le due tipologie cellulari.

La GvHD è una reazione immunitaria esercitata dal SI del donatore nei confronti dei tessuti del ricevente. Con il trapianto di midollo osseo allogenico, infatti, insieme alle HSC, si infonde nel ricevente anche il SI del donatore. Ne consegue una peculiare situazione di competizione tra SI: una reazione del ricevente verso il donatore, comunque debole a causa della radio-chemioterapia subita dal paziente, e una reazione del SI del donatore nei confronti dei tessuti del ricevente, in particolare a carico dello strato basale dell'epidermide e della mucosa gastrointestinale, dell'epitelio duttale biliare, dell'epitelio ghiandolare esocrino e delle HSC. Esistono due forme di GvHD: una acuta, letale e accompagnata da eruzioni cutanee, ittero, diarrea, emorragie intestinali, necrosi massiva delle cellule epiteliali; l'altra cronica con fibrosi ed atrofia di uno o più distretti, e che può portare al completo collasso funzionale dell'organo e alla morte.

Il meccanismo che scatena la GvHD non è completamente noto. Per la forma acuta si ipotizza che il trattamento pre-trapianto con chemioterapici ad alte dosi danneggi i tessuti, in particolare l'intestino, consentendo ai lipopolisaccaridi dei batteri di penetrare nei tessuti adiacenti e nel circolo sanguigno. Le molecole microbiche e i frammenti di cellule necrotiche andrebbero così ad attivare il recettore *Toll-like* di varie

cellule che rilascerebbero citochine infiammatorie (IL1, IL6, e IL12). Come conseguenza, neutrofili, macrofagi ed eosinofili migrerebbero al tessuto lesionato causando un ulteriore danno. Le DC mature, presentando gli antigeni ai linfociti T del donatore, ne indurrebbero una risposta allogenica caratterizzata dalla proliferazione degli stessi linfociti del donatore e secrezione di altre citochine pro-infiammatorie. L'attivazione del *Toll-like receptor*, bloccando l'azione soppressiva dei T regolatori CD 4+ CD 25+, permetterebbe ai linfociti attivati di danneggiare altri organi, in particolare fegato e pelle (figura 1.6; Copelan et al. 2006).



**Figura 1.6.** Schema del meccanismo ipotizzato per la forma acuta della GvHD (Copelan et al. 2006).

Visto la capacità di modulare la risposta immunitaria e di promuovere la riparazione dei tessuti, l'uso delle MSC è stato proposto anche nel trattamento delle malattie autoimmuni, condizioni patologiche che alterano il normale funzionamento del SI, provocando una reazione diretta contro il proprio organismo riconosciuto come non *self*.

Le mesenchimali sono state usate su modelli sperimentali animali di diabete, artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico e sclerosi multipla.

L'iniezione intravenosa di MSC ha comportato per il diabete un aumento del numero di isole pancreatiche e di cellule  $\beta$  (Lee et al. 2006), nel lupus un'inibizione delle cellule T e B autoreattive (Deng et al. 2005).

Nell'artrite reumatoide uno studio recente ha dimostrato che le MSC allogeniche potrebbero prevenire la distruzione del tessuto deprimendo l'attacco delle cellule T sulla cartilagine (Augello et al. 2007).

Nel modello animale per la sclerosi multipla, le mesenchimali sembrano indurre la tolleranza delle cellule T e la diminuzione delle perdita di neuroni, suggerendo un effetto protettivo sul tessuto danneggiato (Gerdoni et al. 2007) piuttosto che una riparazione per transdifferenziamento.

### **1.3.2 MSC e supporto all'emopoiesi**

Le MSC appartengono alla classe delle cellule stromali che insieme ad osteoblasti ed endoteliali, creano una "nicchia", un microambiente ideale per supportare l'emopoiesi dopo trapianto di HSC.

Questo effetto si esplica sia mediante adesione/interazione con le staminali ematopoietiche, sia tramite secrezione di citochine (*stem cell factor* [SCF], *lymphocyte inhibitory factor* [LIF], IL6, GM-CSF. Ringden et al. 2005) necessarie al differenziamento delle HSC.

Le mesenchimali producono anche regolatori "negativi" dell'emopoiesi (IL8, TGF $\beta$ ) in grado di mantenere le staminali ematopoietiche quiescenti in fase G0, indifferenziate e refrattarie a stimoli apoptotici, così da garantire una riserva e l'equilibrio tra le cellule quiescenti e differenziate.

La capacità di mantenere nel tempo i progenitori CD 34+ CD 38- non è uguale per tutte le MSC, è infatti fonte-dipendente, più marcata per le MSC derivate da BM e UCB rispetto a quelle isolate da AT (Wagner et al. 2007).

### **1.3.3 Altre applicazioni terapeutiche nella medicina ricostruttiva e rigenerativa**

Le MSC contenute nel tessuto scheletrico contribuiscono al normale rimodellamento e al processo riparativo fornendo il *pool* di osteoblasti necessari alla mineralizzazione dell'osso. In presenza di fratture e malattie, come osteoporosi, osteoartrite, cancro ed infezioni, questi processi sono spesso compromessi. Per questa ragione sono stati messi a punto dei supporti strutturali e meccanici, gli *scaffold* (Conconi et al. 2006), biocompatibili, biodegradabili e in grado di supportare la crescita e la funzione di ripristino della funzionalità ossea delle MSC. *Trial* clinici sull'uomo hanno registrato che in caso di osteogenesi imperfetta, malattia causata da un deficit di uno dei due geni codificanti il collagene di tipo I, le MSC aumentano la mineralizzazione e riducono la frequenza delle fratture (Horwitz et al. 1999; Horwitz et al. 2001). Benefici sono riportati anche nel caso di deficit craniofacciali (Miura et al. 2006; Howard et al. 2008).

Studi sull'uomo hanno rivelato la capacità delle MSC di riparare la cartilagine (Wakitani et al. 2004; Kuroda et al. 2007), anche se resta da chiarire se la formazione di tessuto sia da attribuire direttamente alle MSC espanse *ex vivo*, o a meccanismi paracrini che indirettamente inibiscono l'infiammazione o stimolano la crescita e/o l'attività di progenitori endogeni o condrociti.

Le ischemie cardiache e l'insufficienza cardiaca sono le principali cause di morbilità e mortalità nel mondo occidentale. Studi su modelli animali hanno dimostrato benefici sia biologici sia funzionali che includono l'attenuazione della cicatrice miocardica, delle dimensioni della regione infarturata, il miglioramento della funzione ventricolare, l'aumento della densità vascolare e della perfusione miocardica (Toma et al. 2002; Amado et al. 2005; Valina et al. 2007). La sicurezza a lungo termine del trattamento e l'effetto sull'uomo non sono ancora stati chiariti e sono stati riportati, sempre su modelli sperimentali, effetti avversi come un'alta frequenza di ossificazione e/o calcificazione (Breitback et al. 2007). Il meccanismo coinvolto sembra essere mediato da fattori paracrini (HGF, IGF I [*insulin like-growth factor*], VEGF, HIF 1 $\alpha$  [*hypoxia inducible factor 1 $\alpha$* ]) piuttosto che da transdifferenziamento. I numerosi fattori solubili secreti dalle MSC probabilmente agiscono sia su cellule mature proteggendole da ipossia ed ischemia, sia su progenitori favorendone la migrazione, la proliferazione e

il differenziamento (Kamihata et al. 2001; Xu et al. 2007; Pugh et al. 2003; Dai et al. 2007; Urbanek et al. 2005).

La capacità multi-differenziativa delle mesenchimali si presta anche a future applicazioni cliniche in ingegneria tissutale e ricostruttiva. Il differenziamento in senso adipogenico potrebbe essere sfruttato per la ricostruzione del seno dopo mastectomia, trauma o ustioni. Quello miogenico in futuro renderà possibili nuovi approcci terapeutici per le distrofie muscolari, un gruppo eterogeneo di malattie che si manifestano con la progressiva perdita del tessuto muscolare e per le quali non esiste una cura farmacologica. La potenzialità neurogenica delle MSC potrebbe essere sfruttata per patologie del sistema nervoso centrale e periferico. La natura monocellulare del diabete I ne fa un bersaglio ideale per la terapia cellulare a base di MSC in grado di originare cellule  $\beta$  pancreatiche. Il differenziamento in epatociti fornisce nuovi spunti per il trattamento di disturbi cronici al fegato, per la rigenerazione e il trapianto (Schaffler et al. 2007).

## **1.4 Terapie anticancro di ultima generazione e loro compatibilità con le MSC**

### **1.4.1 Cellule NK attivate in LAK e MSC: una relazione pericolosa**

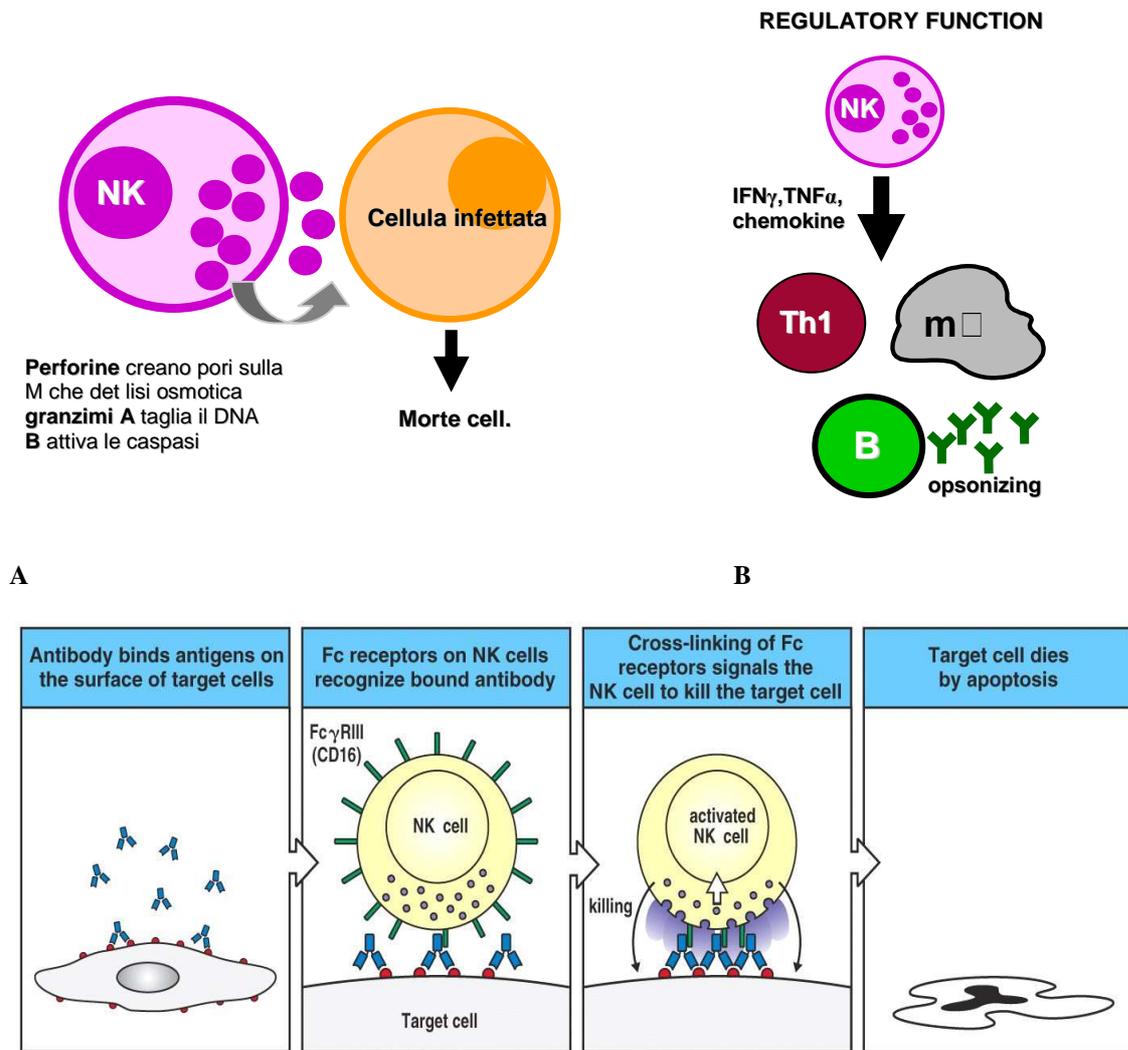
Le cellule NK sono una sottopopolazione di linfociti di derivazione midollare distinta da linfociti B e T.

Nel sangue periferico rappresentano il 5-15 % dei linfociti, nella milza 1-3 %, si riscontrano anche a livello degli organi non linfoidi (polmoni, fegato, decidua, villi intestinali).

Dal punto di vista fenotipico, sono CD 3 negative, esprimono invece il CD 16, CD 56, CD 11, CD 2 e CD 25.

Hanno azione citolitica indipendente da una pregressa sensibilizzazione e dai meccanismi di riconoscimento associativo MHC I/II antigene, e non c'è memoria immunologica. Le NK svolgono infatti la loro funzione grazie a granuli contenenti perforine, proteine capaci di formare pori nella membrana della cellula bersaglio inducendo così lisi osmotica, e granzimi A e B, enzimi che penetrano nelle cellule attraverso i pori formati dalle perforine causando l'apoptosi (figura 1.7 A). Le NK

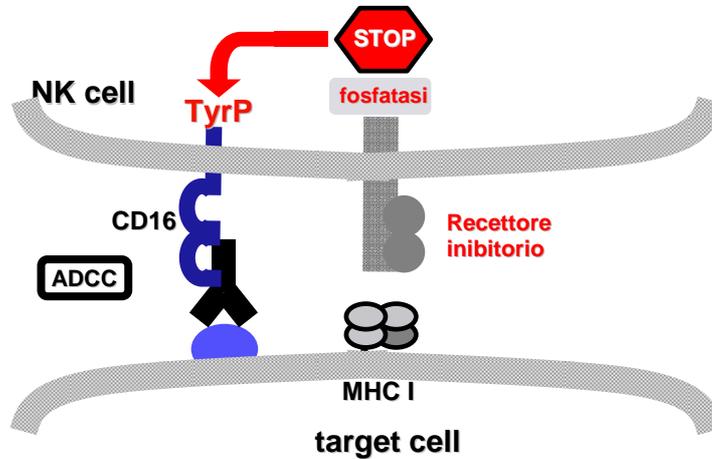
presentano altre due funzioni non trascurabili: 1) quella regolatoria, secernendo infatti  $TNF\ \alpha$ , GM-CSF e  $INF\ \gamma$ , stimolano macrofagi, linfociti T e B (figura 1.7 B); 2) azione citotossica anticorpo dipendente mediata da CD16, un recettore a bassa affinità che lega l'Fc dell'immunoglobulina (Ig) G1 e IgG3 fissate con le regioni Fab alla superficie di una cellula bersaglio che viene poi indotta all'apoptosi (figura 1.7 C).



**C**  
**Figura 1.7.** Rappresentazione schematica delle funzioni delle cellule NK. A. Azione citolitica. B. Funzione regolatoria. C. Azione citotossica mediata dal CD 16.

L'attivazione di questa sottopopolazione linfocitaria è regolata da un bilanciamento dinamico di segnali generati da recettori ad azione attivatrice (come CD 16) e da recettori ad azione inibente (ad esempio KIR, *Killer Inhibitory Receptors*, che

lega MHC I sulla cellula bersaglio, con conseguente attivazione di una fosfatasi che blocca l'attivazione CD 16-indotta. Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Schematizzazione del bilanciamento dinamico tra recettori ad azione attivante (CD 16) ed inibente (KIR) nell'attivazione delle NK.

Le NK sono inoltre regolate da citochine quali IL15, IL12, IL2 e  $\text{INF } \gamma$  e  $\beta$ .

Negli ultimi decenni nella lotta ai tumori hanno suscitato l'interesse di molti ricercatori in virtù:

- 1) della loro azione contro le cellule tumorali. Quest'ultime infatti presentano bassi livelli di HLA I/MHC I a seguito della selezione a favore di mutanti MHC-negativi operato dai linfociti T citotossici. Le cellule tumorali possono in alternativa essere ricoperte da IgG che, per legame con il CD 16, possono indurre le NK all'attivazione e alla secrezione di  $\text{INF } \gamma$ , IL2 e 12 con azione attivante su macrofagi, linfociti T e B.
- 2) della *graft versus leukemia*. Si ipotizza che le cellule NK del donatore uccidano le cellule tumorali residue del ricevente.
- 3) della loro capacità di attivarsi, in presenza di alte concentrazioni di IL 2, in cellule LAK (*lymphokine-activated killer*) con esaltata attività citolitica e più vasto spettro di specificità. Studi recenti hanno però evidenziato una relazione pericolosa tra le NK attivate e le MSC. Le mesenchimali inibiscono in modo dose dipendente la proliferazione delle LAK, ne riducono la citotossicità e la secrezione di citochine. Da parte loro le LAK lisano le MSC non solo eterologhe, ma anche autologhe (Sotiropoulour et al. 2006 ; Spaggiari et al. 2006 e 2008). Nel primo caso si ha la perdita della

GvL, nel secondo della prevenzione della GvHD e dell'effetto positivo sull'attecchimento del trapianto. Tutto ciò porta a riflettere sui protocolli clinici da realizzare per evitare l'annullamento delle due terapie. E' necessario che le due tipologie di cellule non si incontrino, bisogna in questo caso escludere la co-somministrazione. Potrebbe essere utile iniziare con le MSC che devono supportare l'emopoiesi e minimizzare il rischio di insorgenza di GvHD, e poi in un secondo momento, quando le mesenchimali avranno esaurito il loro compito, infondere le LAK per sopprimere le cellule leucemiche sopravvissute al regime di condizionamento radio-chemioterapico.

#### **1.4.2 Cellule CIK**

Nell'ultimo decennio si sono moltiplicati i protocolli clinici con preparati linfocitari arricchiti di cellule CIK (*citokine induced killer*), una sottopopolazione di linfociti caratterizzata dall'espressione di marker di superficie comuni a linfociti T e cellule NK, sono infatti CD 3+ e CD 56+. Sono principalmente utilizzate in due patologie: in pazienti con carcinoma epatico dopo ablazione chirurgica per eliminare le cellule tumorali residue; in pazienti ematologici in ricaduta dopo trapianto allogenico. Sono in fase 1 e 2 di sperimentazione anche protocolli su pazienti con carcinoma intestinale.

Le CIK, che nel sangue periferico rappresentano solo l'1-5%, sono dotate di attività citotossica verso vari target di cellule tumorali. In particolare nella leucemia mieloide acuta, cronica e nel linfoma a cellule B e T inducono l'apoptosi selettiva delle cellule tumorali promuovendo la GvL. In più le cellule CIK non interferiscono nell'attecchimento del trapianto e hanno mostrato una scarsa propensione ad indurre la GvHD.

Fino ad oggi in letteratura non ci sono studi che prendano in considerazione l'interazione tra questi preparati arricchiti e le MSC, relazione che sarebbe opportuno verificare al fine di definire nuovi protocolli di immunoterapia capaci di sfruttare le potenzialità di entrambe le linee cellulari. Questo è divenuto una necessità alla luce dei risultati sopra esposti sull'interazione riscontrata *in vitro* tra MSC e cellule LAK.

## 1.5 L'espansione *ex vivo* delle MSC

### 1.5.1 Alternative alla siero fetale bovino: il siero umano, il surnatante derivato dalle piastrine attivate, il lisato pistrinico e i mezzi *serum free*

Nelle applicazioni cliniche approvate il mezzo usato per l'espansione *ex vivo* delle MSC umane viene supplementato con FBS. Il rischio di trasmissione di malattie prioniche e zoonosi è considerato basso, decisamente maggiore è l'immunogenicità derivata dalle proteine xenogeniche presenti nell'FBS. Recentemente, si è valutato che una singola preparazione di  $10^8$  MSC umane cresciute in condizioni standard in siero bovino contiene approssimativamente 7-30 mg di proteine sieriche (Spees et al. 2004). L'uso di lotti diversi di FBS, inoltre, comporta variabilità nell'espansione delle MSC.

Questo ha indotto i ricercatori a definire dei supplementi alternativi all'FBS in grado di fornire, da un lato, un numero di cellule sufficienti per l'applicazione clinica, dall'altro, di mantenere inalterate le caratteristiche immunofenotipiche e le potenzialità differenziative.

Molti studi affermano che i mezzi *serum free* non supportano la crescita delle mesenchimali, ma l'aggiunta di citochine sembra renderlo possibile anche se le procedure per l'ottenimento della coltura primaria comprendono sempre derivati animali xenogenici. Ng e colleghi (2008) sono ricorsi a StemPro *serum free* con bFGF, TGF $\beta$ 1 e PDGFbb; Gronthos e collaboratori (1995) ad  $\alpha$  MEM con EGF e PDGFbb. In contrasto con questi lavori, altri ricercatori sostengono invece che le citochine, in assenza di una quantità minima di FBS (2%), non sarebbero in grado di garantire la crescita delle MSC (Krampera et al. 2005).

Recentemente, è stato proposto come alternativa all'FBS il siero umano autologo. Le BM MSC sembrano crescervi più velocemente registrando un tempo di duplicazione di circa 53 ore contro le 84 in FBS, ma si osserva un differenziamento più lento (Shahdadfar et al. 2005). Questo approccio è però limitato dalla quantità di siero necessario per espandere le MSC per l'uso clinico, e dalla variabilità di crescita registrata nel caso di pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico. Per by-passare questi problemi si è optato per un *pool* di sieri umani provenienti da donatori AB positivi, ma i risultati sono contrastanti. Alcuni riportano che la crescita delle BM MSC si arresta dopo il primo passaggio (Shahdadfar et al. 2005); altri hanno dimostrato che per le AT e BM MSC il siero AB consente di ottenere risultati migliori dell'FBS in

termini di proliferazione e mantenimento delle potenzialità (Kocaoemer et al. 2007; Bieback et al. 2009).

Oltre al siero umano, è stato preso in esame il surnatante arricchito di fattori di crescita derivati dalla piastrine attivate con trombina. Questo supplemento ha indotto un aumento della migrazione (Gruber et al. 2004) e della proliferazione nelle AT e BM MSC maggiore rispetto all'FBS e paragonabile al siero AB (Gruber et al. 2004; Kocaoemer et al. 2007; Bieback et al. 2009). Per alcuni autori è però responsabile di una diminuzione dell'osteogenesi (Gruber et al. 2004). Rispetto al siero umano, il suo ottenimento è inoltre più laborioso, comporta l'utilizzo di trombina/eparina e il contenuto in citochine è variabile e non standardizzabile.

L'utilizzo del lisato piastrino mostra effetti proliferativi migliori di qualsiasi altro supplemento (Zaky et al. 2008; Bieback et al. 2009; Prins et al. 2009), ma sembra favorire la condrogenesi (Zaky et al. 2008), i frammenti di membrana delle piastrine, che vanno a formare aggregati e ad aderire alla superficie delle MSC, non sono completamente rimovibili e soprattutto la sua composizione non è definita.

### **1.5.2 Citochine: caratteristiche, funzioni e struttura**

Con citochina si intende una proteina di secrezione con funzione regolatoria, che controlla la sopravvivenza, la crescita e il differenziamento cellulare.

Caratteristiche comuni alle citochine possono considerarsi quelle di seguito elencate:

- 1) sono molecole che si trovano nel mezzo extracellulare ed interagiscono con specifici recettori su cellule target;
- 2) servono per comunicare informazioni sullo stato dell'organismo;
- 3) provocano una risposta biologica appropriata nel tessuto target e connessa a sopravvivenza, crescita/proliferazione, differenziamento cellulare;
- 4) la ridondanza, ossia la stessa risposta cellulare può essere mediata da più citochine. Si tratta di un meccanismo di salvataggio per assicurare la risposta;
- 5) la pleiotropia, che implica che le citochine possono agire su diversi organi target. Essa rende perciò necessaria la compartimentazione caratterizzata da:

- a) azione paracrina: le cellule secernenti le citochine devono essere situate nelle immediate vicinanze del loro bersaglio;
- b) capacità autocrina: le cellule producono citochine per autostimolarsi e regolarsi;
- c) rimozione delle citochine per endocitosi o loro disattivazione.

Queste molecole generano una grande varietà di attività biologiche. Esistono citochine che sono:

- sensori della pressione di ossigeno: il rene, ad esempio, in sua carenza libera eritropoietina che determina la produzione di globuli rossi;
- molecole prodotte in risposta a microrganismi (o prodotti da essi derivati) per la proliferazione di linfociti o per la chemiotassi;
- sensori di reazione immunitaria;
- sensori di danno tissutale.

La classificazione delle citochine può avvenire anche sulla base della loro struttura. Si distinguono quattro gruppi o superfamiglie (figura 1.9):

GRUPPO 1: caratterizzate da un fascio di 4  $\alpha$ -eliche antiparallele. Qui si distinguono poi altri due sottogruppi:

- 1) 4  $\alpha$ -eliche *short chain* (es. GM-CSF);
- 2) 4  $\alpha$ -eliche *long chain* (es. G-CSF).

GRUPPO 2: struttura a fogli  $\beta$  a lunga catena. In questo caso i sottogruppi sono tre:

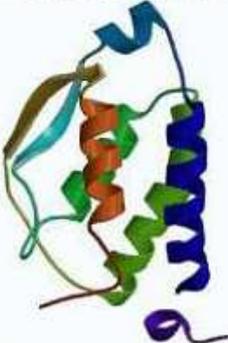
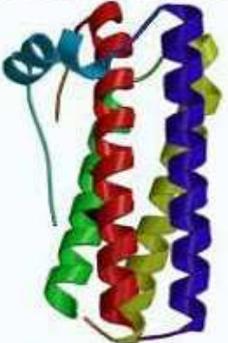
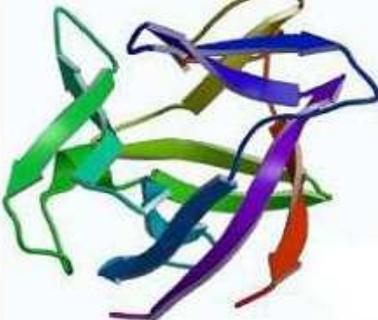
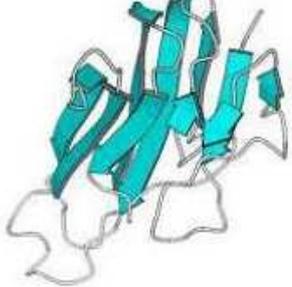
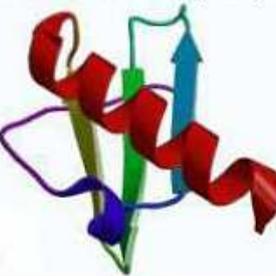
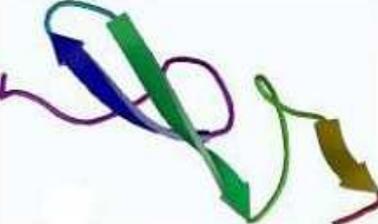
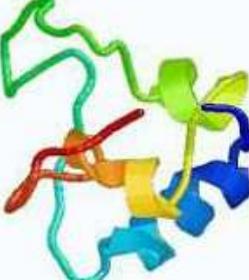
- 1) *cystine knot* o a nodo di cistina (es. PDGF, TGF $\beta$ );
- 2)  *$\beta$  jellyroll* o anello gelatinoso (es. TNF);
- 3)  *$\beta$  trefoil* o trifoglio  $\beta$  (es. FGF).

GRUPPO 3: citochine a corta catena  $\alpha/\beta$  dove coesistono strutture  $\beta$  e  $\alpha$ -eliche.

Anche qui i sottogruppi sono tre:

- 1) le chemochine;
- 2) a  *$\beta$  meander* o a meandro  $\beta$  (es. EGF, TGF $\alpha$ );
- 3) insulino simile (es. IGF).

GRUPPO 4: citochine con struttura a mosaico che risulta dall'unione di più moduli (es. HGF).

GRUPPO 1	<p>SC-4<math>\alpha</math> BUNDLE (GM-CSF)</p> 	<p>LC-4<math>\alpha</math> BUNDLE (G-CSF)</p> 	GRUPPO 1
GRUPPO 2	<p><math>\beta</math>-TREFOIL (IL-1<math>\beta</math>)</p> 	<p>CYSTINE KNOT (TGF-<math>\beta</math>)</p> 	GRUPPO 2
	<p><math>\beta</math>-JELLYROLL (TNF-<math>\alpha</math>)</p> 	<p>CHEMOKINES (IL-8)</p> 	GRUPPO 3
GRUPPO 3	<p><math>\beta</math>-MEANDER (TGF-<math>\alpha</math>)</p> 	<p>INSULIN (IGF-1)</p> 	

**Figura 1.9.** Classificazione strutturale delle citochine.

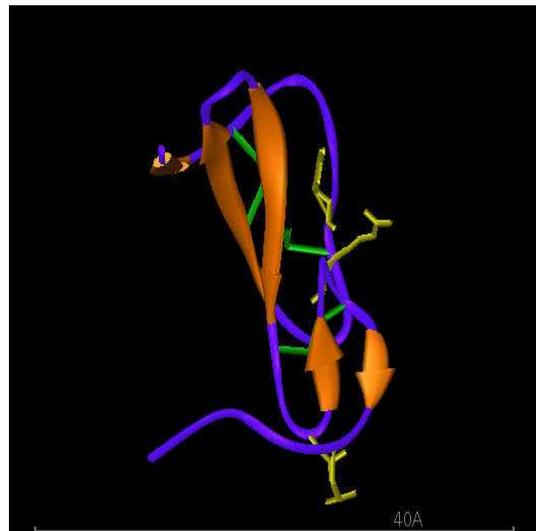
### 1.5.3 Citochine: *identity card*

Tramite uno studio bibliografico sono state selezionate sette citochine che sembrano avere un ruolo chiave sulle proprietà proliferative, differenziative e migratorie delle MSC. Di seguito si riportano le loro schede identificative.

#### 1.5.3.1 Nome: *epidermal growth factor*, EGF.

**Sinonimi:** Urogastrone, URG.

**Struttura:** è una proteina globulare di 6,2 kDa appartenente al gruppo 3 a meandro  $\beta$  (figura 1.10). E' formata da 53 aa e contiene tre ponti disolfuro essenziali per l'attività biologica. Deriva da un precursore, una glicoproteina transmembrana, di ben 1207 aa che contiene 8-9 moduli di EGF. Per taglio proteolitico si ottengono perciò 8-9 molecole di EGF da una di precursore.

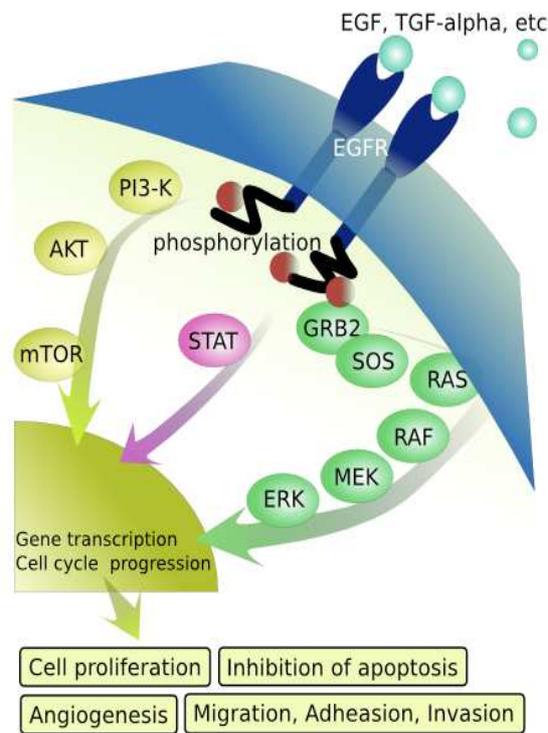


**Figura 1.10.** Struttura dell'EGF

**Funzione:** è un potente fattore di crescita che stimola la proliferazione di tessuti epiteliali, ed un forte mitogeno per molti tipi di cellule. In più, l'EGF inibisce la secrezione acida a livello gastrico ed è coinvolto nella guarigione delle ferite.

**Meccanismo:** svolge la sua azione per legame con il suo recettore, EGFR o HER1 o Erb B. Questo è caratterizzato da due domini extracellulari *cysteine rich* e un dominio tirosin kinasico nella parte citoplasmatica. Per la trasmissione del segnale è essenziale l'autofosforilazione che segue la dimerizzazione del recettore, dopo di che si ha l'arruolamento di varie proteine che, con i loro domini SH<sub>2</sub>, legano le tirosine fosforilate di EGFR. La cascata del segnale porta poi all'attivazione delle MAP (*mitogen-activated protein*) kinasi. Quest'ultime sono una famiglia di proteine comprendenti, tra le altre, ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e JNK (*c Jun-*

*NH<sub>2</sub>-terminal kinase*), queste, attivate dalla fosforilazione, traslocano nel nucleo per promuovere diverse risposte fisiologiche: ERK partecipa alla proliferazione e alla sopravvivenza cellulare, mentre JNK è implicato nell'apoptosi (figura 1.11).



**Figura 1.11.** Meccanismo d'azione di EGF.

**Azione svolta sulle MSC:** l'EGF determina un aumento del numero di BM MSC (Gronthos et al. 1995) pari al 30% rispetto al mezzo di controllo contenete solo FBS al 2% (Tamana et al. 2006). L'effetto, dose dipendente con raggiungimento del *plateau* ad una concentrazione di 10 ng/ml, è comunque limitato forse per la presenza dell'FBS che maschera quello della citochina, oppure per un aumento dell'apoptosi.

L'esposizione all'EGF o la sua presenza nel mezzo differenziativo non modifica la capacità differenziativa sia in senso adipogenico che osteogenico.

Si registra inoltre un aumento della capacità migratoria in seguito all'attivazione di ERK e PLC $\gamma$ .

In letteratura è riportato uno studio (Krampera et al. 2006) sull'*heparin binding EGF like growth factor* o HB-EGF. La capacità di quest'ultimo di legare l'eparina e proteoglicani eparin-solfati, lo distingue dalle altre citochine EGF simili e potrebbe spiegare la maggiore azione mitogena, rispetto all'EGF, su alcuni tipi di cellule. Partecipa inoltre alla riparazione tissutale, alla chemotassi, alla crescita tumorale, all'angiogenesi e alla fibrogenesi.

Il gene per HB-EGF codifica una proteina transmembrana di 208 aa costituita da una sequenza segnale di 19 aa, un pro-peptide N-terminale di 43 aa, un dominio EGF simile di 86 aa e un pro-peptide C-terminale di 60 aa.

Sulle BM MSC HB-EGF è un fattore proliferativo, l'effetto è dose dipendente con *plateau* a 25 ng/ml. L'aumento della proliferazione risulta di circa il 30% rispetto al

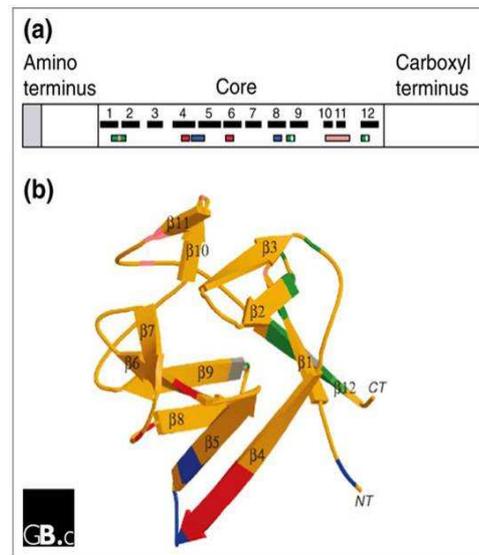
controllo negativo (FBS al 2%), ed è completamente abolito in presenza di un anticorpo monoclonale anti-EGFR.

Il pre-trattamento con HB-EGF preserva la potenzialità differenziativa, ma la sua aggiunta nel mezzo differenziativo previene reversibilmente il differenziamento.

**1.5.3.2 Nome:** *basic fibroblast growth factor*, bFGF.

**Sinonimi:** FGF-2.

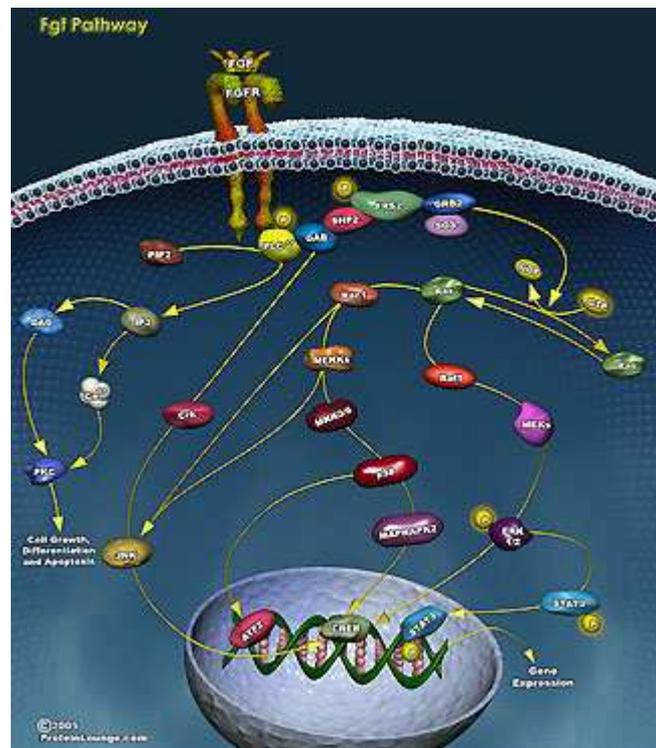
**Struttura:** è una proteina di 17,1 kDa appartenente alla famiglia degli FGF, con struttura  $\beta$  *trefoil* ed alta affinità per l'eparina e i proteoglicani eparin-solfato che partecipano alla formazione del complesso FGF-recettore stabile ed attivo (figura 1.12).



**Figura 1.12.** Struttura di bFGF.

**Funzioni:** gli FGF giocano un ruolo centrale nello sviluppo prenatale, nella crescita postnatale e nella rigenerazione di numerosi tessuti promuovendo la proliferazione e il differenziamento. In più, bFGF partecipa alla vasculogenesi, all'angiogenesi, all'emopoiesi e alla guarigione delle ferite.

**Meccanismo:** i membri della famiglia FGF legano quattro recettori (FGFR1, FGFR2, FGR3 e FGFR4) caratterizzati da tre domini extracellulari di tipo immunoglobulinico e un dominio intracellulare tirosin kinasico diviso in due tronconi (figura 1.13).



**Figura 1.13.** Meccanismo d'azione di bFGF.

**Azione svolta sulle MSC:** bFGF è un fattore mitogeno non solo sulle BM MSC, dove raddoppia il numero di cellule rispetto al controllo negativo (Solchaga et al. 2005), ma anche sulle AT MSC dove l'aumento è di una volta e mezzo (Chiou et al. 2006). L'effetto ottimale si registra 10 ng/ml per entrambi le fonti. In condizioni *serum free*, Gronthos (et al. 1995) non registra alcun effetto, mentre Batulla (et al. 2006) riporta un aumento della proliferazione di PL e BM MSC di 4-5 volte in un mezzo messo a punto per le staminali embrionali e confrontato con quello classico supplementato con FBS (10%).

L'esposizione a questa citochina modula il differenziamento in senso condrogenico. Sulle AT MSC bFGF sembra selezionare specifici progenitori condrogenici ed indurre l'espressione di Sox9, fattore di trascrizione cruciale nella condrogenesi, e di FGFR2 e N-caderina, marker della condensazione (Chiou et al. 2006). Anche per le BM MSC la presenza di bFGF potenzia la condrogenesi accompagnata dalla *down regulation* delle MAP kinasi e della via del segnale di Wnt, il loro ruolo però non è ancora stato chiarito (Solchaga et al. 2005).

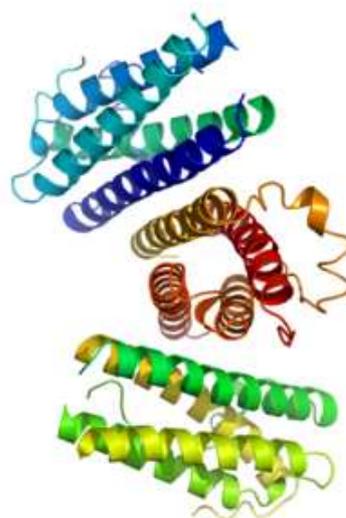
**1.5.3.3 Nome:** *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF.

**Sinonimi:** CSF-3, MGI-1G, GM-CSF $\beta$ , pluripoietina.

**Struttura:** è una proteina globulare di 174 aa contenente due ponti disolfuro (figura 1.14).

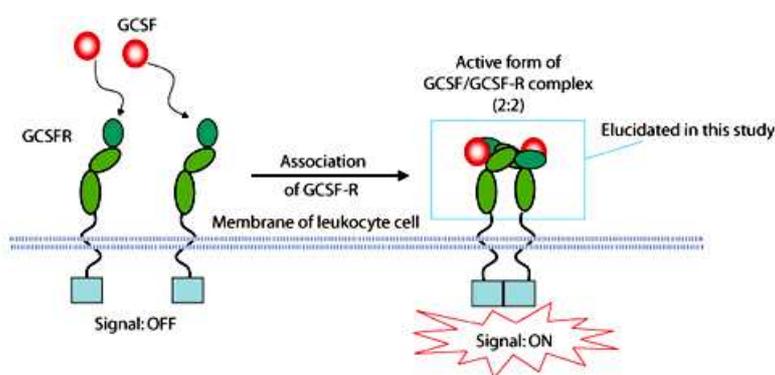
**Funzioni:** il G-CSF è un fattore di crescita ematopoietico prodotto da una grande varietà di cellule inclusi macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali e stromali del midollo osseo. Stimola la

proliferazione e la differenziazione di cellule progenitrici ematopoietiche verso la linea neutrofili-granulociti, inoltre è usato in clinica per facilitare il reclutamento di HCS dal sangue periferico per il trapianto.



**Figura 1.14.** Struttura di G-CSF.

**Meccanismo:** il G-CSF si lega al suo recettore (G-CSFR) costituito, a partire dall’N-terminale, da un dominio Ig-simile, due subdomini emopoietico-simile di 100 aa ciascuno e subdomini fibronettina di tipo



**Figura 1.15.** Meccanismo d’azione di G-CSF.

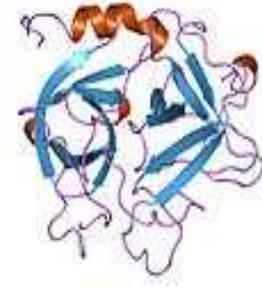
III. Segue poi la formazione di un complesso attivato responsabile della cascata del segnale il cui meccanismo molecolare non è ancora stato chiarito (figura 1.15).

**Azione svolta sulle MSC:** nel topo il G-CSF aumenta il numero di cellule mesenchimali sia all’interno del midollo che nel sangue periferico. Il meccanismo che governa questo aumento non è chiaro, ma potrebbe essere attribuito all’inibizione del differenziamento in osteoblasti indotto da G-CSF con conseguente incremento di BM MSC indifferenziate (Tatsumi et al. 2008).

**1.5.3.4 Nome:** *hepatocyte growth factor*, HGF.

**Sinonimi:** SF (scatter factor), epatopoietina (HPTA).

**Struttura:** un precursore lineare di 697 aa, dopo proteolisi, genera la forma biologicamente attiva di HGF con struttura a mosaico costituita da due catene polipeptidiche a e b, di 463 aa e 234 aa rispettivamente, unite da ponte disolfuro (figura 1.16).

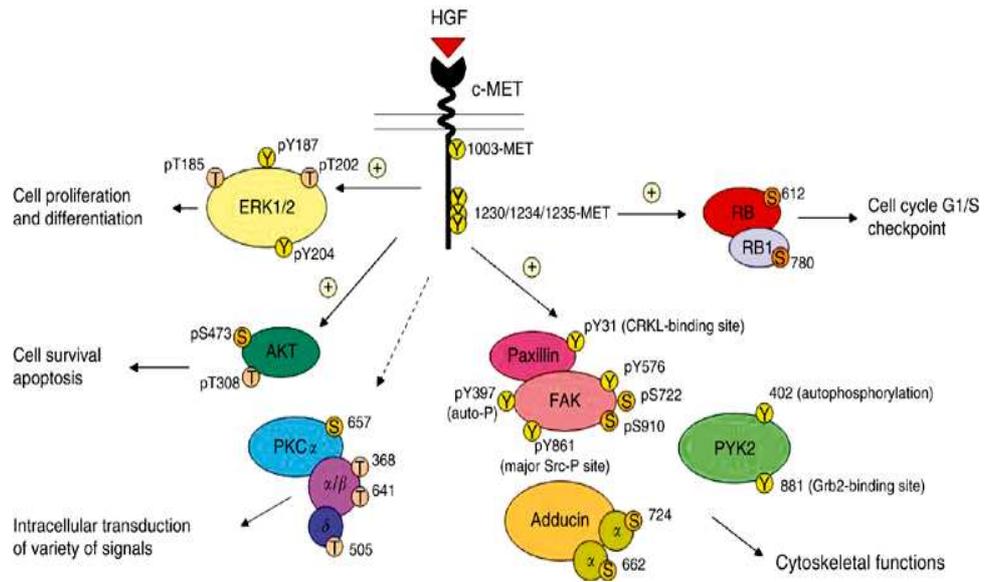


**Figura 1.16.** Struttura di HGF.

**Funzione:** l'azione di HGF include l'induzione della proliferazione, della migrazione, della morfogenesi, è inoltre un mitogeno fondamentale nel processo rigenerativo del fegato.

**Meccanismo:**

si lega al recettore tirosin kinasico MET, una glicoproteina eterodimerica, che, dopo fosforilazione, recluta diversi trasduttori del segnale che attivano la cascata delle MAP e la fosfatidil-inositolo 3 (PI3) kinasi (figura 1.17).



**Figura 1.17.** Meccanismo d'azione di HGF.

**Azione svolta sulle MSC:** HGF stimola la migrazione (Neuss et al. 2004).

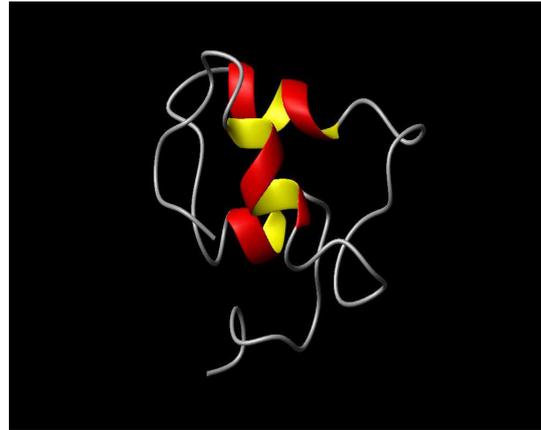
Ostacola il differenziamento osteogenico *in vitro* inibendo l'espressione di fattori di trascrizione specifici (Standal et al. 2007).

L'effetto sulla proliferazione è ancora una volta contrastante. Alcuni autori riportano l'assenza di azione mitogena (Neuss et al. 2004; Forte et al. 2006 ma su MSC isolate da ratto), e altri registrano una promozione della proliferazione (Standal et al. 2007). Una possibile spiegazione di risultati così in contrasto può risiedere nell'uso di concentrazioni differenti di HGF (25-50 ng/ml versus 100 ng/ml), mezzi diversi e mesenchimali con origine differente.

**1.5.3.5 Nome:** *insulin like growth factor I*, IGF I.

**Sinonimi:** somatamedina C, IGF-IA.

**Struttura:** la proteolisi di un precursore inattivo con regioni pro-peptidiche N e C-terminali, porta ad una proteina globulare di 70 aa con tre ponti disolfuro intramolecolari (figura 1.18).

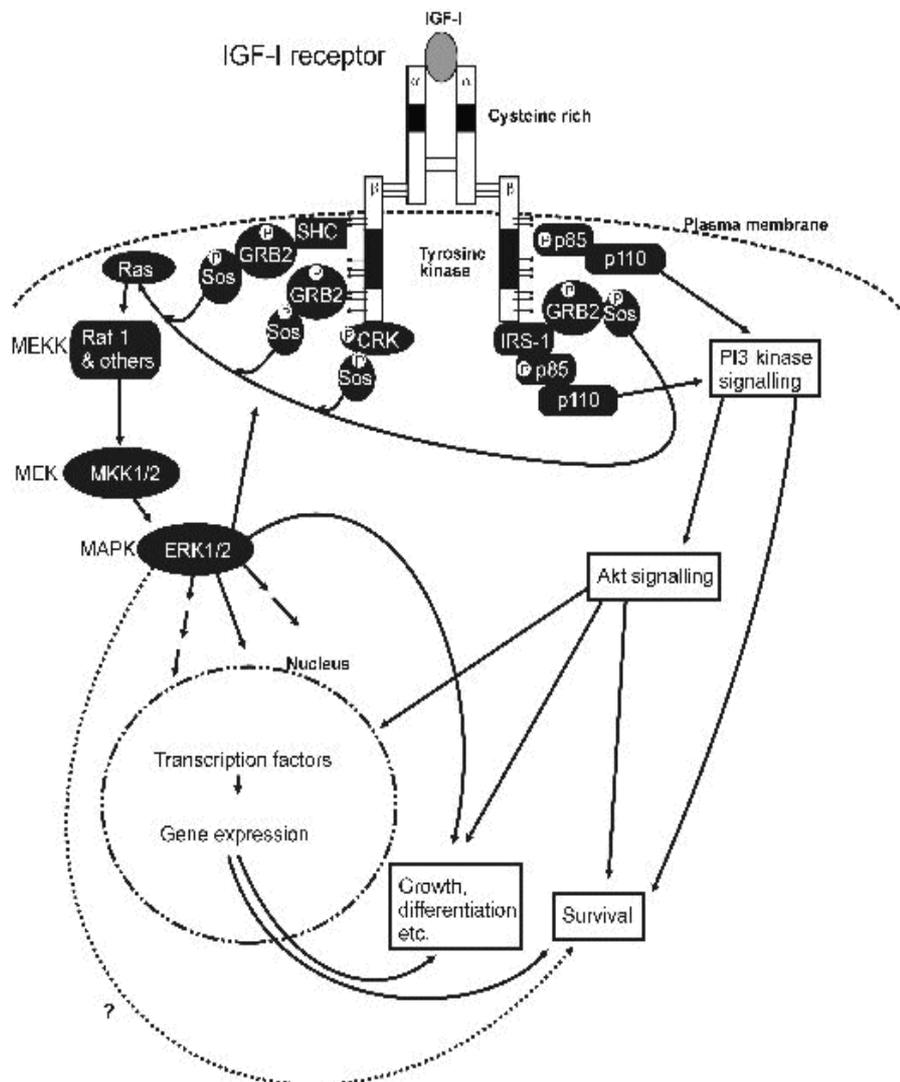


**Figura 1.18.** Struttura di IGF I.

**Funzioni:** IGF I appartiene ad una famiglia comprendente anche l'insulina e la relaxina. Ha funzioni e struttura simili ad esse, ma possiede un'azione proliferativa più marcata. Gioca inoltre un ruolo cruciale nella formazione dell'osso.

**Meccanismo:**

IGF I si lega ad uno specifico recettore (IGFR-1), che possiede attività tirosin kinasica ed attiva una serie di mediatori, inclusi le MAP e PI3 kinasi (figura 1.19).



**Figura 1.19.** Meccanismo d'azione di IGF I.

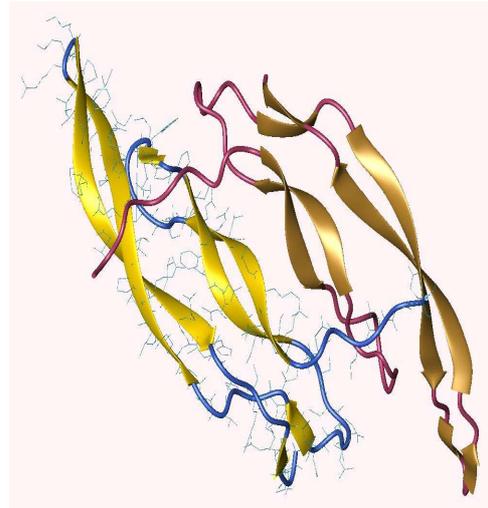
**Azione svolta sulle MSC:** è stato riportato che IGF I raddoppia la proliferazione delle BM MSC senza interferire sul successivo differenziamento in senso osteogenico ed adipogenico (Thomas et al. 1999). Non tutti però concordano sull'effetto mitogeno di questa citochina. Gronthos (et al. 1995) ritiene che non supporti la crescita delle BM MSC, forse questo è dovuto a condizioni sperimentali diverse, o all'IGF I costitutivamente secreto dalle mesenchimali che maschera l'effetto del fattore esogeno, o a proteine leganti l'IGF I (IGF-BP), forti modulatrici dell'azione della stessa citochina.

Anche studi su modelli animali riportano risultati contrastanti. Su BM MSC isolate da topo la citochina induce un aumento della proliferazione dose dipendente, e l'espressione di collagene II, Sox9 e proteoglicani, tutti marker condrogenici (Longobardi et al. 2006). Sulle mesenchimali derivate da ratto non si registra alcun effetto proliferativo, ma un aumento della migrazione (Li et al. 2007), riscontrato anche sulle BM MSC umane con andamento dose dipendente (Fiedler et al. 2006).

**1.5.3.6 Nome:** *platelet derived-growth factor*, PDGF.

**Sinonimi:** fattore di crescita derivato dal glioma (GDGF, *glioma derived growth factor*); fattore di crescita derivato dall'osteosarcoma (ODGF, *osteosarcoma derived growth factor*).

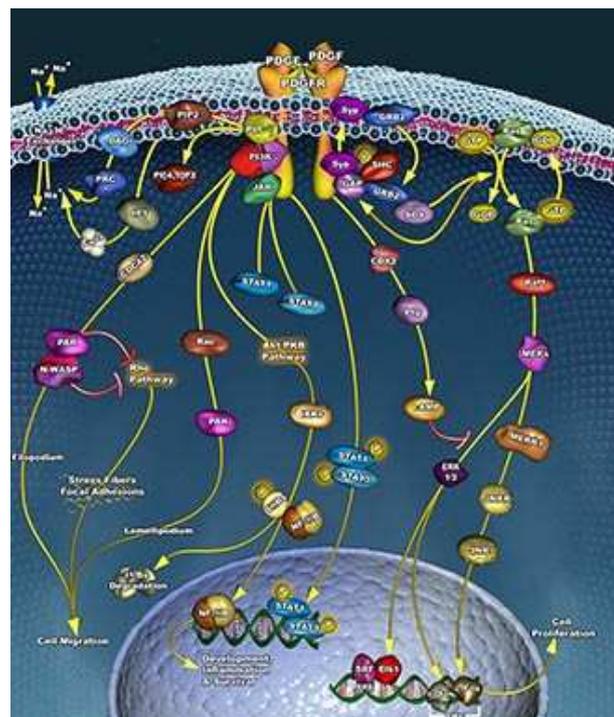
**Struttura:** il PDGF è un dimero del gruppo 2 a nodo di cistina costituito da due catene polipeptidiche unite da un ponte disolfuro e denominate a, b, c e d che sono assemblate in eterodimeri (PDGFab) o omodimeri (PDGFaa, PDGFbb, PDGFcc e PDGFdd. Figura 1.20).



**Figura 1.20.** Struttura di PDGF.

**Funzione:** si tratta di un potente mitogeno e chemoattrattore di vari tipi di cellule. E' accumulato nei granuli  $\alpha$  delle piastrine, ma può essere sintetizzato anche da macrofagi, cellule epiteliali ed endoteliali. E' stato riportato che questa famiglia di citochine svolge importanti funzioni fisiologiche nello sviluppo degli organi, nella formazione di vasi sanguigni, nell'eritropoiesi, nonché in processi patologici come nell'oncogenesi, nella fibrogenesi e nell'aterosclerosi.

**Meccanismo:** il PDGF esplica la sua azione biologica legandosi ai recettori PDGFR a e b. Il PDGFR a lega ad alta affinità le catene a, b e c, mentre PDGFR b solo le catene b e d. A differenza di PDGF aa e bb, PDGF cc e dd richiedono un'attivazione proteolitica prima di attivare i recettori. Il ligando induce poi dimerizzazione di entrambi i recettori



**Figura 1.21.** Meccanismo d'azione di PDGF.

e successiva autofosforilazione della tirosin kinasi. Quest'ultima è responsabile della fosforilazione di numerose molecole segnale che generano un'azione a cascata con conseguente attivazione delle MAP kinasi, che inducono proliferazione, migrazione e differenziamento, e della PI3 kinasi, che promuove la sopravvivenza cellulare (figura 1.21).

**Azione svolta sulle MSC:** PDGFbb induce la proliferazione delle AT MSC in modo dose e tempo dipendente. L'effetto sembra mediato da JNK che induce la progressione del ciclo cellulare dalla fase G0/G1 ad S (Kang et al. 2005). Sulle BM MSC l'aumento della proliferazione è di circa il 30% rispetto al controllo negativo (FBS 2%). Non si riscontra effetto sinergico tra EGF e PDGFbb (Tamana et al. 2006; Gronthos et al. 1995).

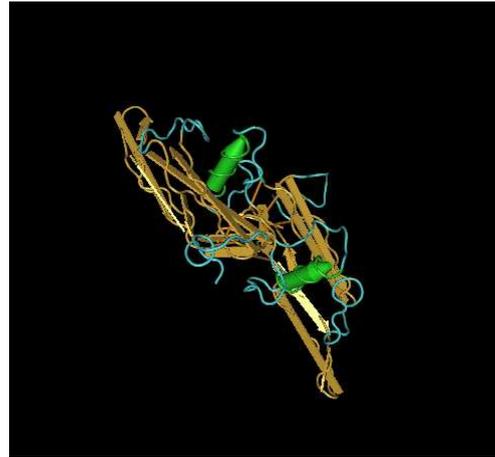
L'esposizione a questa citochina non riduce la potenzialità differenziativa, ma la sua presenza nel mezzo differenziativo inibisce l'adipogenesi e promuove l'osteogenesi (Tamana et al. 2006). Questo è in contrasto con quanto riportato da Kratchmarova (et al. 2005) che non osserva sulle BM MSC stimolazione del differenziamento osteogenico. I due studi non sono comunque confrontabili, visto che nel primo si esamina l'osteogenesi all'ultimo stadio (dopo 28 giorni), mentre il secondo prende in considerazione la prima settimana.

Il PDGFbb si è visto promuovere anche la migrazione delle mesenchimali isolate da BM (Tamana et al. 2006).

**1.5.3.7 Nome:** *transforming growth factor  $\beta$ 1*, TGF $\beta$ 1.

**Sinonimi:** fattore inibente il differenziamento, fattore inducente la cartilagine.

**Struttura:** TGF $\beta$ 1 appartiene alla famiglia dei TGF $\beta$  costituita da più di 40 membri incluse le isoforme del TGF $\beta$ , BMP e GDF. E' una proteina composta da due monomeri di 120 aa uniti da un ponte disolfuro, con struttura a nodo di cistina (figura 1.22).

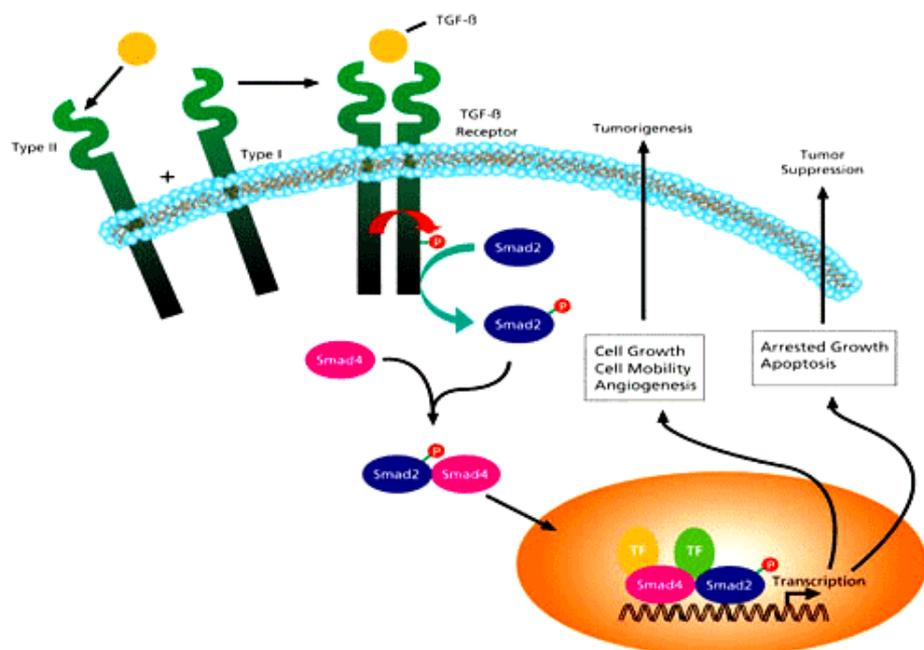


**Figura 1.22.** Struttura di TGF $\beta$ 1.

**Funzione:** delle tre isoforme di TGF $\beta$ ,  $\beta$ 1 è la più abbondante secreta da quasi tutte le cellule. E' una citochina multifunzionale che regola la proliferazione, la crescita, il differenziamento, la migrazione e la sintesi della matrice extracellulare. E' inoltre coinvolto nell'embriogenesi, nel rimodellamento tissutale e nella riparazione delle ferite.

**Meccanismo:**

lega il recettore per il TGF $\beta$  tipo II (TGF $\beta$ RII) che porta alla fosforilazione del recettore di tipo I (TGF $\beta$ RI) e alla formazione di un complesso recettoriale,



**Figura 1.23.** Meccanismo d'azione di TGF $\beta$ 1.

TGF $\beta$ RII-TGF $\beta$ RI, responsabile della fosforilazione dei fattori di trascrizione Smad. Smad 2 e 3 si legano poi a Smad 4 con formazione di un eterodimero capace di entrare nel nucleo e favorire o inibire l'attivazione genica (figura 1.23).

**Azione svolta sulle MSC:** TGF $\beta$ 1 sulle BM MSC isolate da topo aumenta la proliferazione in modo dose dipendente con un massimo a 10 ng/ml, e mostra un effetto additivo con IGF I (Longobardi et al. 2006). Sulle MSC umane non sembra inibire la formazione di CFU-F (Gronthos et al. 1995).

Sembra indurre la condrogenesi aumentando l'espressione di marker condrogenici quali Sox9 e il collagene II (Longobardi et al. 2006).

## 1.6 MSC: non è tutto oro quello che luce. Questioni aperte

### 1. Le MSC sono cellule staminali?

Le mesenchimali espanse *in vitro* mancano delle telomerasi. Questo fa supporre che la loro sia una staminalità limitata e che si tratti di progenitori *committed*, caratterizzati da una capacità non illimitata di auto-rinnovarsi (Zimmermann et al. 2003).

### 2. Sono cellule immunoprivilegiate?

Le MSC non esprimono MHC II, CD 40, CD 80, CD 86 e presentano solo bassi livelli di MHC I, risultano perciò poco immunogeniche. In condizioni sperimentali su modelli animali è stato però riscontrato il rigetto dopo infusione di cellule allogeniche (Eliopoulos et al. 2005; Nauta et al. 2006).

### 3. Il transdifferenziamento *in vivo* è reale?

Nonostante i risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo*, si ritiene che l'effetto delle MSC sia legato alla capacità di modulare il SI e di stimolare la sopravvivenza di cellule residenti nell'organo danneggiato tramite meccanismi paracrini e il reclutamento di precursori locali (Lee et al. 2006; Gerdoni et al. 2007; Togel et al. 2005), piuttosto che ad una transdifferenziazione.

### 4. Quanto dura l'effetto delle mesenchimali?

Da studi di *imaging*, le MSC dopo infusione si distribuiscono in vari organi attratte da segnali chemotattici rilasciati dalle cellule lese e sopravvivono almeno qualche mese. Dati concernenti l'effetto a lungo termine e l'immunomodulazione in presenza di stimoli antigenici cronici non esistono ancora.

5. Le MSC e il rischio oncogenico.

Sebbene l'infusione di mesenchimali sia considerata relativamente sicura, studi recenti hanno evidenziato che diventano neoplastiche dopo coltura prolungata e possono favorire la crescita tumorale in alcuni modelli sperimentali (Djouad et al. 2003). Le MSC, infatti, sono in grado di migrare al tumore con alta selettività e di collocarsi nello stroma ad esso associato (Studený et al. 2002) grazie alla presenza sulla loro superficie di recettori per le chemochine (Sordi et al. 2005). Inoltre, producono costitutivamente fattori pro-angiogenici, quali VEGF e IL6, e metalloproteinasi degradanti la matrice in risposta a citochine infiammatorie (Ries et al. 2007), tutti fattori questi riconosciuti promuovere la crescita tumorale.



---

## 2. Scopo

---

Le cellule stromali mesenchimali sono cellule multipotenti isolate da numerosi tessuti: midollo osseo, fegato, rene, tessuto adiposo, sangue periferico e cordonale, cordone ombelicale e placenta.

Sono capaci di differenziarsi in diverse linee cellulari inclusi osteoblasti, condrociti, adipociti, miociti scheletrici e cardiaci, cellule endoteliali e neuroni.

Interagiscono con le cellule staminali ematopoietiche influenzando l'attecchimento post trapianto e il differenziamento.

Presentano capacità immunosoppressiva, che ha generato un forte interesse clinico nei loro confronti nel campo del trapianto di HSC allo scopo di prevenire o controllare la GvHD. Sono, infatti, in grado di bloccare la proliferazione delle cellule T, interferiscono con il differenziamento, la maturazione e le funzioni delle cellule dendritiche, modulano l'azione dei linfociti B, riducono la citotossicità delle cellule NK.

Queste caratteristiche le rendono eccellenti candidate nella medicina rigenerativa e nella terapia genica. Purtroppo si tratta di cellule rare nel corpo umano e per l'applicazione clinica ne è richiesto un alto quantitativo, ad esempio per il trattamento della GvHD servono 2 milioni di mesenchimali pro chilo che significa 140 milioni di cellule per un paziente dal peso standard di 70 kg. Questo impone perciò un'espansione *ex vivo*.

Nella maggior parte dei protocolli clinici figura come supplemento al mezzo di coltura il siero fetale bovino che potrebbe causare reazioni immunitarie, rischio di trasmissione di malattie virali e prioniche. A questo va aggiunto che non tutti i lotti sono equivalenti nel supportare la crescita delle MSC.

Questo ha spinto molti ricercatori a investigare formulazioni FBS-free in grado di espandere le mesenchimali senza comprometterne la capacità differenziativa e/o la pluripotenza.

Questo filone di ricerca ha evidenziato che in presenza di EGF le BM MSC aumentano del 30% rispetto ad un mezzo con il 2% di FBS (Tamana et al. 2006), stesso effetto si riscontra con HB-EGF (Krampera et al. 2005). bFGF, addizionato ad un mezzo messo a punto per le cellule staminali embrionali, induce una proliferazione

delle PL e BM MSC di 4-5 volte maggiore rispetto ad un mezzo convenzionale (RPMI con FBS al 10%. Battula et al. 2007). Solchaga e Chiou riportano, in presenza di bFGF, un aumento di 2 e 1,5 volte per le BM e AT MSC rispettivamente, ma in DMEM. HGF non induce la proliferazione ed annulla l'effetto dell'FBS. IGF I e TGF $\beta$ 1 aumentano la crescita delle BM MSC isolate da topo in modo dose dipendente, ed insieme mostrano un effetto sinergico (Longobardi et al. 2006). Anche le BM MSC umane sono un potenziale target per l'IGF I, la proliferazione risulta doppia rispetto al controllo (Thomas et al. 1999). Il PDGFbb stimola la crescita delle AT MSC in modo dose dipendente con un picco a 25 ng/ml.

Da questa rapida panoramica di risultati è evidente la difficoltà di comparare i dati a causa dei diversi protocolli usati che differiscono per la fonte di MSC, densità di semina, mezzo di controllo, intervallo di concentrazione dei fattori di crescita (GF), tempo di esposizione e saggio usato per testare la proliferazione (incorporazione della timidina triziata o di bromo-deossiridina, conta con il tripan blu, ecc.).

Per ovviare a questo si è valutato l'effetto di un *pool* di fattori di crescita (EGF, bFGF, G-CSF, HGF, IGF I, PDGFbb e TGF $\beta$ 1) in condizioni sperimentali standard, al fine di definire un cocktail di citochine capace di supportare la crescita delle MSC in condizioni *FBS-free* e in grado di competere con il lisato piastrinico. Quest'ultimo, se da una parte ha un effetto proliferativo superiore all'FBS, dall'altra contiene aggregati delle membrane delle piastrine che aderiscono alle MSC, ha una composizione non definibile e il volume di sangue per ottenere una quantità di lisato autologo sufficiente per un'espansione *ex vivo* per un'applicazione clinica è decisamente alto (1-1,2 litri).

Per bypassare le limitazioni del BM (il declino del numero di MSC e della potenzialità differenziativa con l'aumentare dell'età del donatore), sono state usate e messe a confronto due fonti alternative: il tessuto adiposo e il cordone ombelicale. Il tessuto adiposo deriva dal mesenchima e contiene una popolazione cellulare eterogenea incluse le MSC. Quest'ultime rispondono ai criteri minimi definiti dall'ISCT, la procedura d'ottenimento del materiale è poco invasiva e quella di isolamento rapida con una percentuale di successo del 100%.

Il cordone ombelicale contiene una subpopolazione cellulare che esibisce un fenotipo mesenchimale e una morfologia fibroblastoide. A differenza della mesenchimali adulte, le UC MSC hanno una capacità espansiva maggiore e più rapida, una più alta frequenza di CFU-F e l'efficienza di isolamento è del 100%. Sono

cariotipicamente stabili nel tempo, ma la capacità differenziativa è dubbia, forse per la loro età ontologica.

Una volta definiti i cocktail ottimali di citochine si è verificato se le condizioni di coltura potessero alterare le fondamentali proprietà biologiche delle MSC. In particolare è stata valutata: 1) la capacità espansiva a lungo termine (35 giorni) in presenza di citochine e hPPP al 3%, confrontandola con la crescita in un mezzo addizionato con FBS (10%), o hPRP (10%) o solo hPPP (3%) che fungeva da controllo negativo. 2) l'espressione dei marker di superficie caratteristici delle MSC (positività per CD 105, CD 44 e CD 90; negatività per CD 45, CD 34, CD 31, CD 117). In più si è indagato se l'espressione dell'ALDH poteva caratterizzare in modo univoco le MSC, come visto per le HSC. 3) la capacità differenziativa in senso adipogenico ed osteogenico. 4) l'effetto immunomodulante sulle cellule T poste in co-cultura con le AT o UC MSC separate o meno da un inserto-*transwell*, per valutare il ruolo del contatto cellulare e della secrezione di fattori solubili.

In campo ematologico le MSC non sono le uniche cellule ad avere attirato l'interesse medico. Negli ultimi anni sono aumentati i protocolli clinici con le cellule CIK, una sottopopolazione linfocitaria CD 3+ CD 56+, anch'essa rara nel sangue periferico (1-5%) e che necessita perciò di un'espansione *ex vivo*. Queste cellule promuovono la GvL grazie alla loro azione citotossica verso target tumorali. Nel trattamento delle leucemie sarebbe perciò ideale riuscire a combinare l'effetto anti GvHD delle MSC con quello GvL delle CIK ricorrendo a protocolli clinici che sfruttino le potenzialità delle due terapie.

Per questo è stata studiata l'interazione tra le due linee cellulari alla luce della controproducente relazione riscontrata *in vitro* tra MSC e cellule NK attivate in LAK: le prime inibiscono la proliferazione, la secrezione di INF  $\gamma$  e deprimono la citotossicità delle NK; le seconde lisano le mesenchimali. Questi risultati hanno suggerito di "giocare", nel caso di LAK-MSK, sui tempi di somministrazione evitando la co-somministrazione che potrebbe portare all'annullamento dei trattamenti.

Lo studio è stato per il momento condotto su cellule CIK espanse da donatore sano e UC MSC espanse in presenza di FBS. In futuro sarà interessante verificare se gli effetti registrati in queste condizioni saranno confermati su MSC cresciute nei mezzi supplementari con le citochine e derivate da AT, e su CIK isolate da donatore malato.



---

## 3. Materiali e metodi

---

### 3.1 Preparazione dei supplementi ai mezzi di coltura

#### 3.1.1 Preparazione di plasma umano povero di piastrine e plasma umano arricchito di piastrine

Per la preparazione dei lotti di plasma umano povero (hPPP) e ricco di piastrine (hPRP), 4-5 sacche da 400 ml di sangue intero di paziente affetti da policitemia vera non in trattamento farmacologico e sottoposti a salasso-terapia sono state processate secondo la seguente procedura. Il sangue è stato aliquotato in provette da 50 ml (Falcon-Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, <http://www.bd.com>), circa 30 ml/provetta, e si sono aggiunti 30 U/ml di eparina (Pharepa 25.000 U/5 ml PharmaTex Italia Srl, Milano, Italia, <http://www.pharmatex.it>) per prevenire la gelificazione del mezzo.

Dopo aver centrifugato a 1.500 g per 20 minuti, hPPP è stato raccolto in tubi sterili da 50 ml e su un'aliquota si è effettuata la conta delle piastrine. Il lotto per essere accettabile doveva presentare un numero di piastrine inferiore a 3.000/  $\mu$ l. Le provette sono state poi stoccate a -80 °C per due giorni. Dopo scongelamento e sonicazione, hPPP è stato centrifugato a 1.500 g per 30 minuti, riunito in una bottiglia sterile per una miscelazione ottimale, aliquotato e stoccato a -20 °C.

Per l'ottenimento di hPRP, il sangue è stato centrifugato a 240 g per 10 minuti; la conta delle piastrine qui doveva risultare maggiore/uguale a 700.000/  $\mu$ l. Dopo 48 ore a -80 °C, scongelamento e sonicazione, si è proceduto a centrifugazione a 1.500 g per 30 minuti per rimuovere i frammenti di membrane delle piastrine, il tutto è stato riunito, aliquotato e stoccato a -20°C.

## 3.2 Isolamento e coltura

### 3.2.1 Isolamento delle MSC derivate da tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è stato ottenuto da 10 donatori sani d'età compresa tra 30 e 50 anni, sottoposti ad addomino plastica presso il Dipartimento di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza. Il materiale biologico è stato ottenuto in accordo con gli standard etici del comitato etico locale.

Circa 100-150 cm<sup>3</sup> di AT sono stati lavati con *Dulbecco phosphate buffered saline* (D-PBS, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada, <http://www.stemcell.com>) e penicillina/streptomina 1X (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, <http://www.sigmaaldrich.com>). Il tessuto è stato poi tagliato e digerito con collagenasi di tipo II allo 0,1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, <http://www.invitrogen.com>) per un'ora a 37 °C in incubatore con il 5% di CO<sub>2</sub>. 30 ml del tessuto digerito sono stati aliquotati con 10 ml di *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM addizionato con 1.000 mg glucosio/L, Sigma-Aldrich) in provette sterili da 50 ml. Dopo aver centrifugato a 140 g per 10 minuti, il pellet ottenuto è stato risospeso e filtrato con l'ausilio di colini di nylon dalle maglie di 70 µm (Falcon-BD). Dopo un'ulteriore centrifugata a 270 g per 4 minuti, le cellule, risospese in mezzo completo costituito da DMEM supplementato con penicillina/streptomina 1X, L glutammina 1X (Sigma-Aldrich) e hPPP (10%), sono state piastrate in fiasche per colture cellulari da 75 cm<sup>2</sup>-F75 (Falcon-BD) e messe ad incubare a 37 °C con 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo tre giorni il mezzo è stato cambiato e le cellule non aderenti rimosse.

### 3.2.2 Isolamento delle MSC derivate da cordone ombelicale

I cordoni ombelicali sono stati ottenuti, in accordo con gli standard etici del comitato etico locale, da 10 donatrici sane sottoposte a parto cesareo presso l'Unità Operativa di Ginecologia ed Ostetricia dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza.

Il cordone ombelicale della lunghezza di 20-30 cm è stato prima lavato con una soluzione di D-PBS e penicillina/streptomina 1X (Sigma-Aldrich), poi tagliato con bisturi monouso e digerito per quattro ore in F75 con collagenasi di tipo II allo 0,1% (Invitrogen) in incubatore a 37 °C. Successivamente è stata aggiunta tripsina-EDTA

(Sigma-Aldrich) allo 0,25% in rapporto 1:1 per 30 minuti. Per bloccare l'azione dei due enzimi, si è ricorsi ad un pari volume di mezzo completo costituito da DMEM supplementato con penicillina/streptomina 1X, L glutammina 1X e hPPP (10%). Dopo quattro giorni di incubazione a 37 °C con 5% di CO<sub>2</sub>, si è provveduto alla rimozione del terreno di coltura e all'aggiunta di DMEM completo.

### 3.2.3 Espansione delle AT e UC MSC

Le cellule, raggiunta una confluenza dell'80-90%, sono state staccate con tripsina-EDTA 0,25%, contate in camera di *Burker* e seminate in F75 a 1.500 cellule/cm<sup>2</sup> in quattro diverse condizioni di coltura. I terreni di coltura erano costituiti da un mezzo base (DMEM + penicillina/streptomina 1X + L glutammina 1X) supplementato con: 1) 10% FBS (STEMCELL Technologies); 2) 10% hPRP; 3) 3% hPPP; 4) hPPP 3% in presenza dei cocktail di citochine definiti con la procedura di seguito riportata e rappresentati da: EGF, bFGF e PDGFbb per AT MSC (tutti a 10 ng/ml); EGF e PDGFbb per UC MSC (10 ng/ml ciascuno). Tutte le citochine sono state acquistate presso la PeproTechInc., Rocky Hill, NJ, USA, <http://www.peprotech.com>. Dopo tre giorni, metà mezzo è stato sostituito con quello fresco. Ogni sette giorni le cellule sono state staccate e ripiastrate a 1.500 MSC/cm<sup>2</sup>. Ad ogni passaggio (da P1 a P5), si è calcolato il PD usando la seguente formula:

$$PD = (\log_{10} N_t - \log_{10} N_0) / \log_{10} 2$$

dove N<sub>0</sub> rappresenta il numero di cellule piastrate e N<sub>t</sub> quello delle staccate; sommando il PD di ogni passaggio con quello del passaggio precedente si è determinato il PD cumulativo (cPD). L'espansione è stata condotta su cinque campioni per ciascuna delle due fonti.

### 3.2.4 Isolamento dei linfociti T

La procedura si basa su una centrifugazione a gradiente di densità che consente di isolare le cellule mononucleate dal sangue periferico. Queste si posizionano in corrispondenza dell'interfaccia tra la soluzione di polisaccarosio (Histopaque-ficoll

1077 g/l, Sigma-Aldrich) ed il plasma, mentre gli eritrociti ed i granulociti vengono attirati verso il fondo dalla forza di gravità.

Per un miglior risultato, i campioni sono stati processati entro due ore dal prelievo con i reattivi a temperatura ambiente. Circa 9 ml di sangue sono stati diluiti con fisiologica in rapporto 1:3 e stratificati su *ficoll* in provette da 15 ml (Falcon-BD) in rapporto 1:1. Dopo centrifugazione a 600 g per 30 minuti senza freno a temperatura ambiente, si è proceduto alla raccolta dell'anello di linfo-monociti formatosi all'interfaccia. Per rimuovere il *ficoll* si sono eseguiti due lavaggi con fisiologica, quindi il *pellet* è stato risospeso in DMEM completo (FBS 10%, penicillina/streptomina 1X, L glutamina 1X), trasferito in fiasca per coltura cellulare da 25 cm<sup>2</sup>-F25 e lasciato ad incubare per 2 ore a 37 °C con il 5% di CO<sub>2</sub> per far aderire i monociti. Sul surnatante raccolto è stata effettuata una conta al contaglobuli (Becton, Dickinson and Company) per la determinazione della concentrazione dei linfociti T.

### **3.2.5 Isolamento ed espansione delle cellule CIK**

I linfo-monociti sono stati isolati a partire da 17-18 ml di sangue mediante centrifugazione a gradiente di densità su *ficoll* secondo la procedura sopra descritta. Una volta raccolto l'anello ed eseguito il lavaggio, il *pellet* è stato risospeso a 5\*10<sup>6</sup> cellule/ml in X-VIVO (Cambrex, Walkersville-Maryland, <http://www.cambrex.com>) addizionato con INF  $\gamma$  (1000 U/ml. Imukin, Boehringer-Ingelheim, <http://www.boehringer-ingelheim.it>). Il giorno successivo si sono aggiunti OKT3 (50 ng/ml. Orthoclone, Janssen-Cilag, <http://www.janssen-cilag.it>) e IL2 (500 U/ml. Proleukin, Novartis Farma, <http://www.novartis.it>). Ogni tre giorni fino al sedicesimo giorno si è proceduto alla diluizione del campione a 1\*10<sup>6</sup> cellule/ml con X-VIVO, al ripristino di IL2 (500 U/ml) e all'analisi citofluorimetrica per la determinazione dell'arricchimento in cellule CIK. La marcatura è stata eseguita su 500.000 cellule utilizzando CD 56-PE (Becton-Dickinson), CD 4-FITC, CD 8-APC e CD 3-Cy7 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA, <http://beckmancoulter.com>). Dopo un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente e un lavaggio in fisiologica, è stata eseguita la lettura su citofluorimetro BD F500 (Becton-Dickinson) con la raccolta di almeno 10.000 eventi.

### 3.2.6 Espansione delle K562

La linea cellulare delle K562 è stata acquistata dalla DMSZ (Germania, <http://www.dmsz.de.com>). Si tratta di cellule tondeggianti e in sospensione prelevate da una paziente affetta da leucemia mieloide cronica in crisi blastica. Secondo le specifiche del produttore, sono state mantenute a 37 °C con 5% di CO<sub>2</sub> ad una concentrazione compresa tra 0,3-1,5 10<sup>6</sup> cellule/ml, in RPMI 1640 supplementato con FBS al 10% che è stato cambiato ogni tre giorni.

### 3.3 Definizione del cocktail di citochine

Lo studio per la definizione del cocktail ottimale di citochine per l'espansione delle AT e UC MSC in condizioni FBS-*free* è stato condotto su 4 campioni per tipo, ed ogni esperimento è stato allestito in triplicato.

Sono state testate le seguenti citochine: EGF, bFGF, G-CSF, HGF, IGF I, PDGFbb e TGF β1 (Peprotech Inc.).

Brevemente, le AT/UC MSC alla fine del primo passaggio sono state piastrate nei pozzetti della piastra da 96 (Falcon-BD) alla densità di 1.500 cellule/cm<sup>2</sup> e lasciate *overnight* in DMEM supplementato con hPPP al 3%, penicillina/streptomina (1X) e L-glutamina (1X). Questo mezzo FBS *free*, determinato in uno *step* precedente dello studio dove si sono valutate concentrazioni variabili di hPPP (0%, 2%, 3%, 5% e 10%), supporta l'espansione delle MSC minimizzando l'apoptosi e permette l'azione dei fattori di crescita. Quest'ultimi, infatti, in assenza di siero non riescono ad espletare il loro effetto, come confermato da Krampera e colleghi (2005) che hanno fissato al 2% la concentrazione minima efficace di FBS per garantire la vitalità delle MSC e l'azione dei GF. Il tentativo di sostituire il siero umano con concentrazioni fisiologiche di albumina umana (50 mg/ml, Kedrion S.p.A., Castelvecchio Pascoli-Lucca, Italia, <http://www.kedrion.com>), insulina (1 ng/ml, Sigma-Aldrich) e desametasone (10<sup>-9</sup> M, Sigma-Aldrich), con lo scopo di mettere a punto un mezzo *serum free* per l'espansione delle mesenchimali, non ha dato esito positivo. Le cellule non solo non si espandevano, ma davano segno di sofferenza mostrando variazioni morfologiche (forma più

allungata, filiforme, aumento della granulosità), e dopo 4-5 giorni si staccavano e morivano.

Il giorno successivo, il mezzo è stato sostituito con quattro diversi mezzi supplementati rispettivamente con: 1) FBS (10%); 2) hPRP (10%); 3) hPPP (3%); 4) hPPP (3%) con GF alla concentrazione di 5, 10, 30 ng/ml; 5) hPPP (3%) con EGF (10 ng/ml) e le altre citochine a 5, 10, 30 ng/ml allo scopo di valutare gli effetti additivi sulla proliferazione indotta da EGF, il più studiato e meglio caratterizzato dei GF (tabella 3.1). Il *range* di concentrazione delle citochine è stato determinato con uno studio preliminare dove è stato valutato l'effetto dell'EGF sulle AT e UC MSC alle concentrazioni di 0, 5, 10, 30, 50 e 75 ng/ml in presenza di hPPP (3%). Si è evidenziato il raggiungimento di un *plateau* a 30 ng/ml. Dopo 72 ore l'indice di proliferazione è stato determinato con 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU) Proliferation Assay Kit (Merck-Calbiochem, San Diego, California, USA, <http://www.merckbiosciences.com>), seguendo le specifiche del produttore. Brevemente, durante le ultime 24 ore di coltura la BrdU è stata aggiunta nei pozzetti. Il giorno successivo le cellule sono state fissate ed esposte all'anticorpo monoclonale anti BrdU, seguito dalla perossidasi e dal substrato fluorogenico. L'intensità del prodotto fluorescente blu, misurato a 325 nm di eccitazione e 420 nm di emissione, è proporzionale alla quantità di BrdU incorporata nel DNA sintetizzato in cellule proliferanti. Il risultato è stato espresso come rapporto tra la fluorescenza (RFU) delle MSC espanse nelle singole condizioni di coltura e quella delle MSC coltivate nel mezzo supplementato con hPPP al 3%, assunto come riferimento.

FBS 10%	hPRP 10%	hPPP 3%	EGF 5ng/ml *	EGF 10ng/ml *	EGF 30ng/ml *
bFGF 5ng/ml *	bFGF 10ng/ml *	bFGF 30ng/ml *	G-CSF 5ng/ml *	G-CSF 10ng/ml *	G-CSF 30ng/ml *
HGF 5ng/ml *	HGF 10ng/ml *	HGF 30ng/ml *	IGF-I 5ng/ml *	IGF-I 10ng/ml *	IGF-I 30ng/ml *
PDGFbb 5ng/ml *	PDGFbb 10ng/ml *	PDGFbb 30ng/ml *	TGFβ1 5ng/ml *	TGFβ1 10ng/ml *	TGFβ1 30ng/ml *
bFGF 5ng/ml **	bFGF 10ng/ml **	bFGF 30ng/ml **	G-CSF 5ng/ml **	G-CSF 10ng/ml **	G-CSF 30ng/ml **
HGF 5ng/ml **	HGF 10ng/ml **	HGF 30ng/ml **	IGF-I 5ng/ml **	IGF-I 10ng/ml **	IGF-I 30ng/ml **
PDGFbb 5ng/ml **	PDGFbb 10ng/ml **	PDGFbb 30ng/ml **	TGFβ1 5ng/ml **	TGFβ1 10ng/ml **	TGFβ1 30ng/ml **

**Tabella 3.1.** Rappresentazione schematica dei supplementi aggiunti al mezzo base (DMEM, penicillina/streptomycin 1X, L-glutamina 1X). \* in presenza di hPPP al 3%, \*\* in presenza di hPPP al 3% e EGF (10 ng/ml). L'esperimento è stato condotto in triplicato per ogni condizione e campione.

### **3.4 Ruolo di MEK 1/2 sulla proliferazione di AT e UC MSC in presenza dei cocktail di citochine**

In letteratura è stato riportato come MEK 1 e MEK 2 (chiamate anche MAPK o ERK kinasi), due protein-kinasi specifiche, svolgano un'azione nella cascata delle protein-kinasi controllando la crescita cellulare e il differenziamento. MEK 1/2 sono attivate da una gran varietà di fattori di crescita e citochine attraverso la fosforilazione di due residui serinici in 217 e 221. U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadiene. Merck-Calbiochem) si è visto essere un inibitore altamente selettivo per MEK 1/2.

Operativamente, alla fine del primo passaggio 3.000 cellule (CD 45- CD 105+ CD 90+ al 95,00 ± 3,00%) sono state seminate nei pozzetti di una piastra nera da 96 con fondo trasparente in un mezzo costituito da DMEM, penicillina/streptomina 1X, L-glutamina 1X e hPPP al 3%. Il giorno successivo le cellule sono state trattate per un'ora con U0126 (30 µM), quindi, dopo 2 lavaggi con fisiologica, stimulate con i rispettivi cocktail (hPPP 3% con EGF, bFGF, PDGFbb a 10 ng/ml per le AT MSC; hPPP 3% con EGF e PDGFbb a 10 ng/ml per UC MSC), o con un mezzo supplementato con hPPP (3%), o FBS (10%) o hPRP (10%). Dopo 24 ore è stata aggiunta la BrdU e il giorno dopo è stato completato il test precedentemente descritto. Il risultato è stato riportato come fluorescenza della MSC pre-trattate con l'inibitore e fluorescenza delle cellule non esposte a U0126.

### **3.5 Valutazione *in vitro* della capacità differenziativa delle MSC espanse in mezzi supplementati con FBS, hPRP e hPPP in presenza ed assenza dei cocktail citochinici**

#### **3.5.1 Differenziamento osteogenico**

Il test differenziativo è stato condotto a fine P2 su cellule seminate alla densità di 1.500 MSC/ cm<sup>2</sup> su vetrini (Thermanox Plastic Coverslips- Nunc, Rochester, NY, USA, <http://www.nuncbrand.com>) sistemati nei pozzetti della piastra da 24 (Falcon-BD), e coltivate nelle quattro condizioni (FBS 10%, hPRP 10%, hPPP 3% con e senza

GF) fino al raggiungimento dell'80-90% di confluenza. A questo punto il mezzo di coltura è stato sostituito con quello differenziativo costituito da DMEM, penicillina/streptomicina (1X), L-glutamina (1X), FBS 10%, desametasone ( $10^{-7}$  M, Sigma-Aldrich),  $\beta$  glicerofosfato (10 mM/L, Sigma-Aldrich), acido ascorbico (50  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich). Il mezzo veniva sostituito ogni tre giorni. Dopo 21 giorni il differenziamento veniva valutato con la colorazione di von Kossa, per verificare il deposito della matrice di idrossiapatite. Le cellule, dopo essere state fissate con formalina al 10% per 5 minuti a temperatura ambiente, sono state incubate per 15 minuti con una soluzione all'1% di argento nitrato (Sigma-Aldrich) e poi esposte a luce ultravioletta per 2 ore. I vetrini, risciacquati con acqua distillata e poi trattati con sodio tiosolfato (5%, Sigma-Aldrich) per 5 minuti per rimuovere l'argento non reagito, sono stati controcolorati con rosso neutro all'1% per 2 minuti.

### **3.5.2 Differenziamento adipogenico**

Le MSC, a fine P2, sono state piastrate a 1.500 cellule/cm<sup>2</sup> su vetrini sistemati nei pozzetti della piastra da 24 ed esposte per 21 giorni, una volta raggiunta la confluenza dell'80-90%, ad un mezzo (DMEM) con penicillina/streptomicina (1X), L-glutamina (1X), FBS (10%), insulina (10  $\mu$ g/ml), desametasone ( $10^{-6}$  M) e 3-isobutilmetil-xantina (100  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich). Il mezzo veniva cambiato ogni tre giorni. A fine coltura le cellule sono state fissate con formalina (10%) per 5 minuti. E' stato poi aggiunto isopropanolo al 60% per 5 minuti e successivamente Oil Red O (0,5%) per 25 minuti. Dopo un lavaggio con isopropanolo, le cellule sono state controcolorate con ematossilina per 1-2 minuti.

## **3.6 Valutazione della morfologia**

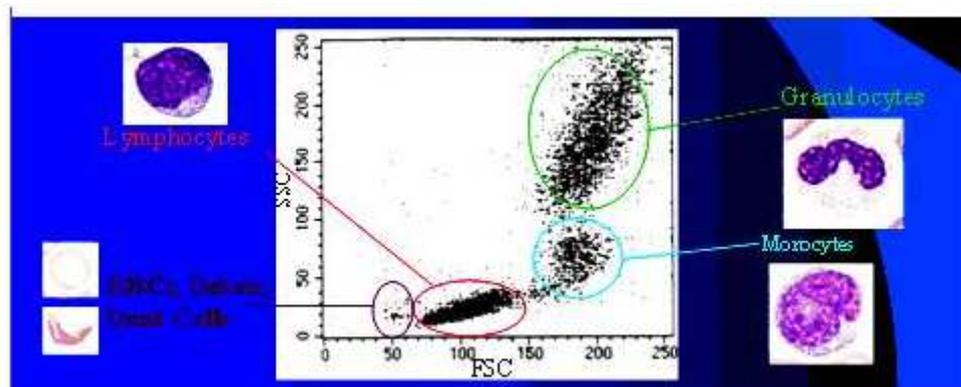
### **3.6.1 Colorazione con ematossilina-eosina**

Le variazioni morfologiche sono state valutate ricorrendo alla classica colorazione con ematossilina-eosina. Le cellule a fine P1 e P5 sono state seminate alla densità di 1.500 MSC/cm<sup>2</sup> su vetrini alloggiati nei pozzetti della piastra da 24, e

coltivate in presenza dei quattro diversi supplementi (FBS 10%, hPRP 10%, hPPP 3% con e senza i cocktail definiti) fino al raggiungimento del 50-60% di confluenza. A questo punto sono state fissate con formalina (10%) per 5 minuti, colorate con ematossilina per 5 minuti, risciacquate con acqua di rubinetto e controcolorate con eosina diluita 1:500 per 25 minuti. Dopo un ulteriore risciacquo, i vetrini sono stati montati con l'ausilio della gelatina di Kaiser.

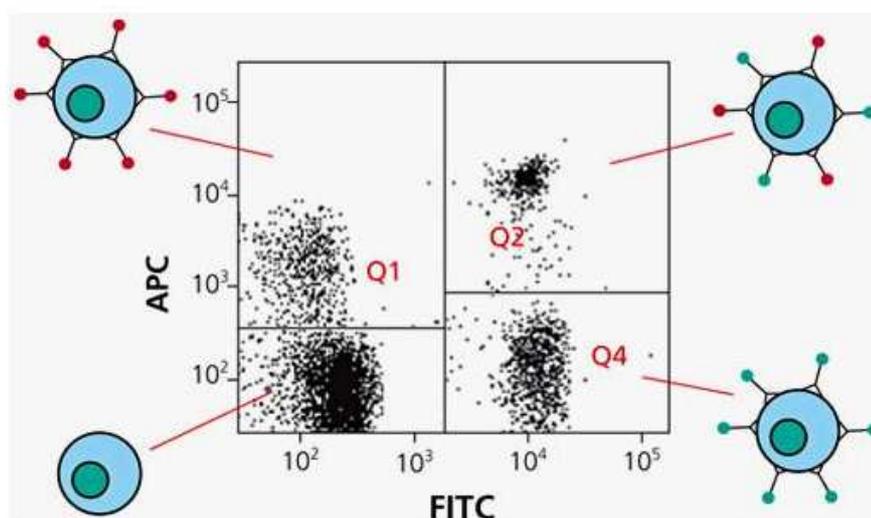
### 3.7 Analisi immunofenotipica mediante citofluorimetria a flusso

La citometria a flusso è una metodica che permette di valutare parametri fisici e chimici di particelle biologiche o cellule contenute in una sospensione facendole passare in una camera di rilevazione con un'elevata velocità di analisi. Questa tecnica ha il vantaggio di analizzare un alto numero di eventi in tempi ristretti di acquisizione, consente inoltre la raccolta contemporanea fino a 10 parametri per cellula valutabili singolarmente o in combinazione mediante *gating*. Lo strumento tipico consta di sorgenti di illuminazione a laser, fotomoltiplicatori o sensori, filtri ottici e di una cella a flusso. Con la citofluorimetria si vanno a valutare parametri come lo *scatter* che rappresenta la luce deviata dalla cellula. Distinguiamo: il *forward scatter* (FS), o *scatter* della luce in avanti, che risulta dalla rifrazione della luce dovuta alla superficie delle particelle, l'impulso ottenuto è proporzionale alle dimensioni della cellula; il *side scatter* (SS), o *scatter* della luce a 90°, deriva invece dalla granulosità della particella ed è quindi proporzionale alla complessità strutturale della cellula (figura 3.1).



**Figura 3.1.** SS versus FS della popolazione linfocitaria. Attorno ad ogni popolazione di interesse sono stati creati i *gate* che danno la possibilità di analizzare selettivamente una popolazione cellulare in base a caratteristiche morfologiche e/o immunologiche.

Ulteriori informazioni si ottengono con la marcatura delle cellule. Questa tecnica si basa sull'immunofluorescenza di fluorocromi coniugati agli anticorpi anti antigene specifico. Si può effettuare una marcatura simultanea di 3, 4 o più anticorpi legati a diversi fluorocromi con conseguente aumento del numero di informazioni deducibili da una singola lettura. Il fluorocromo è una sostanza capace di assorbire la luce ad una determinata lunghezza d'onda e di emetterla ad una lunghezza d'onda superiore. I più comuni sono: isotiocianato di fluoresceina (FITC), ficoeritrina (PE), allofococianina (APC), PE-Cy7 (figura 3.2).



**Figura 3.2.** Esempio di marcatura simultanea con due fluorocromi (APC e FITC). Nel riquadro Q1 si posizionano le cellule APC+ FITC-, in Q4 le FITC+ APC- e in Q2 si trovano le cellule che co-esprimono i due antigeni di superficie coniugati ai fluorocromi.

Per caratterizzare le MSC si è valutata l'espressione di antigeni di superficie, inclusi CD 105, CD 90, CD 45 e CD 34, come proposto dell'ISCT. L'analisi è stata effettuata ad ogni passaggio, da P0 a P5. I seguenti epitopi sono stati marcati con anti anticorpi umani: CD 31-FITC, CD 34-PECy7, CD 45-APC, CD 105-PE, CD 44-FITC, CD 90-FITC (Beckam Coulter), SSEA4-APC (RD Systems, Minneapolis, USA, <http://www.rndsystems.com>) e CD 117-PE (Caltag Laboratories, Bangkok, Thailand, <http://www.amsthailand.com>).

100.000 cellule, dopo lavaggio con fisiologica, sono state incubate per 15 minuti al buio a temperatura ambiente con gli anticorpi monoclonali, il loro eccesso è stato poi rimosso con un lavaggio. 10.000 eventi sono stati acquisiti con il citofluorimetro (FACSCalibur, Becton Dickinson Company) e analizzati con Cell Quest software.

L'attività delle aldeidi deidrogenasi (ALDH), proposte come nuovo marker per l'identificazione e l'isolamento dei progenitori ematopoietici, è stata valutata con l'ausilio dell'Aldefluor kit (STEMCELL Technologies). 100.000 cellule sono state sospese nell'Aldefluor assay buffer dove si è aggiunto il substrato Aldefluor, la sospensione è stata poi incubata per 60 minuti a 37°C. Le MSC sono state inoltre marcate con CD 105-PE, CD 34-PECy7, CD 45-APC e, dopo un lavaggio con fisiologica, analizzate al citofluorimetro. Per ogni analisi è stato allestito il controllo negativo costituito da cellule trattate con uno specifico inibitore dell'ALDH, il DEAB.

### **3.8 Effetto immunomodulante delle AT e UC MSC nei diversi mezzi di coltura**

#### **3.8.1 Co-culture di AT e UC MSC con linfociti T attivati**

A fine P3 le MSC, espanse nelle quattro condizioni di coltura (FBS 10%, hPRP 10% e hPPP 3% con e senza cocktail), sono state piastrate nei pozzetti delle piastre da 96 e 24 in concentrazioni decrescenti (20.000, 10.000, 1.000, 100, 0 MSC e 120.000, 60.000, 6.000, 600 e 0 MSC rispettivamente e in triplicato). Dopo 24 ore la proliferazione è stata bloccata con mitomicina C (10 µg/ml; Sigma-Aldrich) per 2 ore. Una volta rimosso l'inibitore si sono aggiunti i linfociti T (100.000 nel pozzetto della piastra da 96 e 600.000 nell'inserito applicato al pozzetto della piastra da 24) ottenuti con la procedura già illustrata, così da avere i seguenti rapporti MSC:linfociti: 1:5, 1:10, 1:100, 1:100 e 0:100.000. L'attivazione linfocitaria è stata indotta con fitoemagglutinina (PHA, 5 µg/ml; Roche. <http://www.roche.it>). Dopo cinque giorni dall'allestimento della co-cultura è stata aggiunta la BrdU, e il giorno successivo i linfociti T (100 µl per pozzetto) sono stati trasferiti in piastra nera con fondo trasparente per completare il test di proliferazione secondo le specifiche del produttore.

### **3.9 Cellule CIK versus UC MSC**

Al quattordicesimo-sedicesimo giorno di coltura, se la percentuale di CD 3+ CD 56+ risultava superiore al 30%, si procedeva con il test di citotossicità e l'allestimento di co-culture tra UC MSC espanse in presenza di FBS al 10% e cellule CIK secondo i protocolli di seguito descritti.

#### **3.9.1 Effetto citotossico delle cellule CIK versus UC MSC rispetto ad un target tumorale**

Nei pozzetti della piastra da 96 sono state piastrate 100.000, 50.000, 20.000, 10.000 e 5.000 cellule CIK in X VIVO in triplicato. Sono state poi aggiunte 5.000 K562 o UC MSC in precedenza marcate per 30 minuti con Calceina AM (3,5  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) e risospese in X VIVO dopo un lavaggio con fisiologica. Questo ha consentito di avere dei rapporti cellule CIK:MSC/K562 pari a 20:1, 10:1, 4:1, 2:1 e 1:1.

La Calceina è una sostanza fluorescente in grado di diffondere attraverso la membrana cellulare, quindi, in caso di lisi della cellula, nel surnatante sarà possibile rilevare la sua presenza mediante misurazione fluorimetrica ( $\lambda_{eccitazione}$  485 nm,  $\lambda_{emissione}$  535 nm).

E' stato necessario predisporre dei pozzetti con solo cellule target, tre per la valutazione del rilascio massimo e tre per quantificare l'espulsione fisiologica del marcatore tramite trasporto attivo.

Dopo quattro ore di incubazione a 37 °C al 5% di CO<sub>2</sub>, in tre pozzetti con le sole cellule target si è aggiunto Triton X (Sigma-Aldrich) al 3%, un detergente in grado di lisare le cellule così da determinazione il rilascio massimo. La piastra è stata poi centrifugata a 400 g e il surnatante trasferito in piastra nera con fondo trasparente per la misurazione della fluorescenza al FluoroCount.

La percentuale di Calceina rilasciata, indice dell'azione citotossica delle cellule CIK sulle cellule target, K562 o UC MSC, è stata calcolata con l'ausilio della seguente formula:

$$\% \text{ calceina rilasciata} = \frac{(\text{lettura pozzetto}) - (\text{lettura bianco})}{(\text{lettura rilascio max}) - (\text{lettura bianco})} \times 100$$

### 3.9.2 Co-culture tra UC MSC e cellule CIK

Nei pozzetti delle piastre da 6 e 24 sono state seminate in DMEM supplementato con FBS (10%) 1.000.000, 500.000, 250.000, 100.000, 50.000 UC MSC e 200.000, 100.000, 50.000, 20.000 e 1.0000 rispettivamente. Dopo 24 ore, la proliferazione è stata bloccata esponendo le cellule per 3 ore a mitomicina C (10 µg/ml). Eseguiti due lavaggi con fisiologica, sono state aggiunte le CIK sospese in DMEM con FBS al 10% e IL2 (500 U/ml): 1.000.000 nei pozzetti della piastra da 6 e 200.000 negli inserti posizionati sulla piastra da 24. Per le CIK si è reso necessario l'utilizzo di DMEM addizionato con FBS (10%) in quanto l'X-VIVO non supportava la crescita delle cellule mesenchimali.

Dopo sei giorni di co-cultura si è proceduto con: 1) conta delle cellule in sospensione in camera di *Burker* con l'ausilio del Tripan Blu (Sigma-Aldrich) per determinare la percentuale di riduzione delle CIK esposte alle UC MSC:

$$100 - (100 \times \text{n}^\circ \text{ CIK esposte ad UC MSC} / \text{n}^\circ \text{ CIK non esposte})$$

2) allestimento dei test di citotossicità secondo la procedura già descritta usando come cellule target le K562; 3) analisi citofluorimetrica delle CIK marcando con CD 4, CD 56, CD 8 e CD 3; 4) dopo rimozione della sospensione cellulare, le UC MSC sono state fissate e colorate con ematossilina-eosina seguendo il protocollo precedentemente descritto.



---

## 4. Risultati

---

### 4.1 Cellule stromali mesenchimali derivate da tessuto adiposo

#### 4.1.1 Effetto di un *pool* di sette citochine sulla proliferazione delle AT MSC

Per identificare i fattori di crescita più efficaci per l'espansione delle AT MSC in condizioni *FBS-free*, le mesenchimali, a fine P0, sono state esposte per 72 ore a concentrazioni variabili delle singole citochine e a loro combinazioni.

In presenza di bFGF l'intensità di fluorescenza della BrdU incorporata nel DNA neosintetizzato delle AT MSC, qui assunto come indice di proliferazione, quadruplicava (circa 4,1. Figura 4.1 A) rispetto al riferimento rappresentato dall'espansione in hPPP al 3%, e risultava superiore a quella indotta da FBS (2,6) e simile a quella di hPRP (3,5). Combinato con l'EGF, bFGF ne potenziava l'effetto in modo dose dipendente, ma senza innescare sinergia (figura 4.1 B).

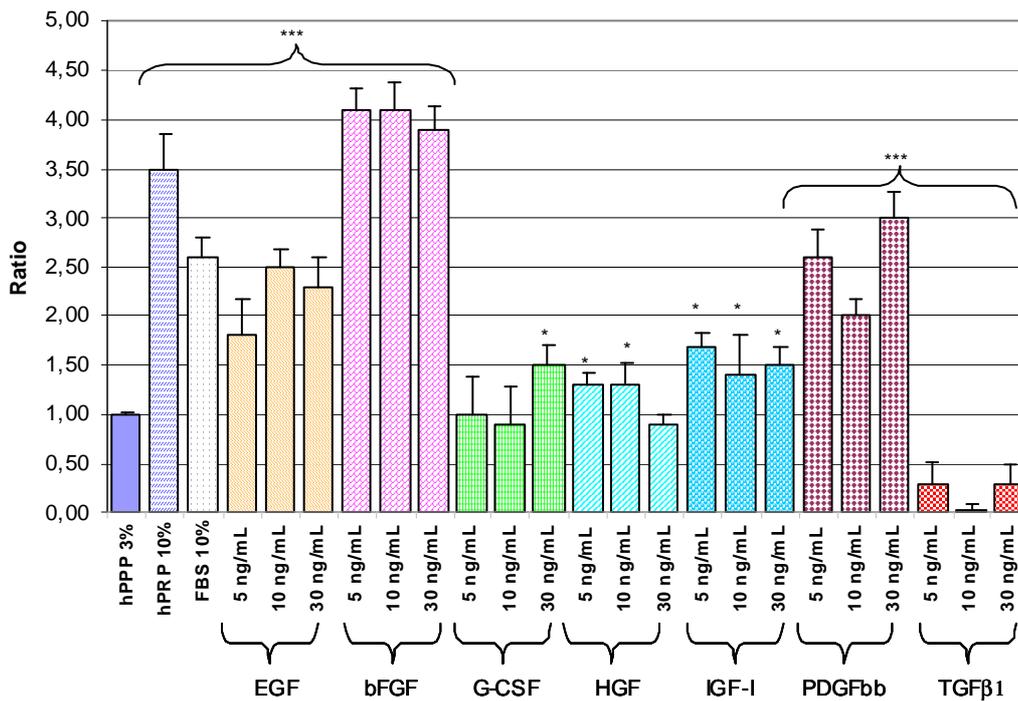
EGF e PDGFbb aumentavano la proliferazione di 2,5 e 3,0 volte quando aggiunti in concentrazione pari a 10 e 30 ng/ml rispettivamente, mostrando un risultato sovrapponibile all'FBS, ma inferiore all'hPRP. Solo quando i due fattori di crescita venivano aggiunti insieme (EGF a 10 ng/ml e PDGFbb a 5 o 10 ng/ml) si registrava una proliferazione paragonabile a quella di hPRP. In presenza di alte concentrazioni di PDGFbb si notava un effetto inibitorio sulla crescita indotta da EGF, probabilmente per l'instaurarsi di un meccanismo di *feedback* negativo.

G-CSF e HGF non avevano effetto sulla proliferazione. HGF, però, se combinato con EGF, bloccava la stimolazione indotta da quest'ultimo; al contrario G-CSF non interferiva (figura 4.1 A e B).

IGF I quasi raddoppiava (1,7) la proliferazione confermando quanto riportato in letteratura (Longobardi et al. 2006; Yangxin et al. 2007); addizionato con EGF ne potenziava l'effetto in modo dose dipendente raggiungendo un indice di proliferazione di circa 3,2.

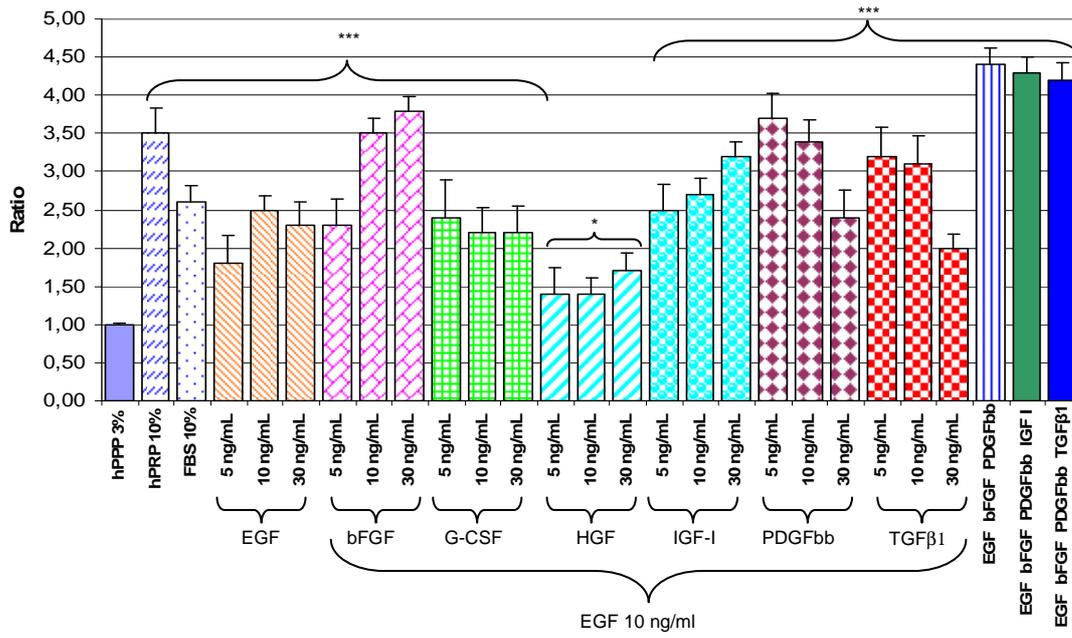
TGF  $\beta$ 1 inibiva la crescita tanto da abolire la proliferazione, ma solo quando aggiunto da solo, con EGF ne incrementava l'effetto proliferativo. Infatti, l'intensità di fluorescenza passava da 2,5 volte in presenza del solo EGF a 3,2 volte con TGF  $\beta$ 1 a 5 ng/ml, a concentrazioni maggiori sembrava ripristinarsi l'inibizione.

La massima proliferazione si riscontrava quando erano simultaneamente presenti EGF, bFGF e PDGFbb alla concentrazione di 10 ng/ml, la crescita era più che quadruplicata (4,4). L'ulteriore aggiunta di IGF I e TGF $\beta$ 1 non comportava aumenti, probabilmente i primi avevano già indotto la risposta cellulare massima (figura 4.1 B).



Supplementi		Rapporto ± SD
hPPP 3%		1.00±0.02
hPRP 10%		3.50±0.34
FBS 10%		2.60±0.21
EGF	5 ng/mL	1.80±0.37
	10 ng/mL	2.50±0.18
	30 ng/mL	2.30±0.30
bFGF	5 ng/mL	4.10±0.21
	10 ng/mL	4.10±0.27
	30 ng/mL	3.90±0.23
G-CSF	5 ng/mL	1.00±0.39
	10 ng/mL	0.90±0.37
	30 ng/mL	1.50±0.21
HGF	5 ng/mL	1.30±0.11
	10 ng/mL	1.30±0.22
	30 ng/mL	0.90±0.10
IGF-I	5 ng/mL	1.70±0.14
	10 ng/mL	1.40±0.42
	30 ng/mL	1.50±0.20
PDGFbb	5 ng/mL	2.60±0.27
	10 ng/mL	2.00±0.19
	30 ng/mL	3.00±0.27
TGF β1	5 ng/mL	0.30±0.23
	10 ng/mL	0.03±0.05
	30 ng/mL	0.30±0.20

A



		Supplementi	Rapporto ± SD
		hPPP 3%	1,00±0.02
		hPRP 10%	3,50±0.34
		FBS 10%	2,60±0.21
EGF 10 ng/ml	EGF	5 ng/mL	1,80±0.37
		10 ng/mL	2,50±0.18
		30 ng/mL	2,30±0.30
	bFGF	5 ng/mL	2,30±0.34
		10 ng/mL	3,50±0.20
		30 ng/mL	3,80±0.19
	G-CSF	5 ng/mL	2,40±0.50
		10 ng/mL	2,20±0.32
		30 ng/mL	2,20±0.35
	HGF	5 ng/mL	1,40±0.35
		10 ng/mL	1,40±0.21
		30 ng/mL	1,70±0.23
	IGF-I	5 ng/mL	2,50±0.33
		10 ng/mL	2,70±0.22
		30 ng/mL	3,20±0.19
	PDGFbb	5 ng/mL	3,70±0.32
		10 ng/mL	3,40±0.27
		30 ng/mL	2,40±0.36
	TGFβ1	5 ng/mL	3,20±0.38
		10 ng/mL	3,10±0.36
		30 ng/mL	2,00±0.18
		EGF bFGF PDGFbb	4,40±0.21
		EGF bFGF PDGFbb IGF I	4,30±0.20
		EGF bFGF PDGFbb TGFβ1	4,20±0.23

**B**

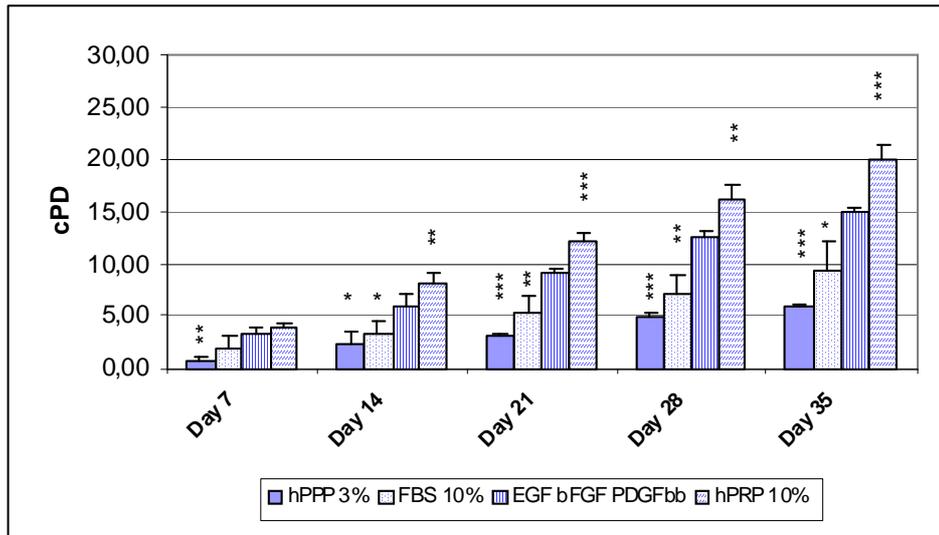
**Figura 4.1.** I grafici riportano gli indici di proliferazione in funzione delle concentrazioni delle citochine aggiunte. **A.** L'indice di crescita deriva dal rapporto tra l'intensità di fluorescenza delle AT MSC espanso per 72 ore in presenza di hPPP al 3%, o FBS (10%), o hPRP (10%), o hPPP addizionato con le citochine e quella derivata dall'espansione in hPPP (3%). **B.** L'indice è dato dal rapporto tra la fluorescenza delle AT MSC espanso per 72 ore nel mezzo supplementato con FBS (10%), o hPRP (10%) o hPPP (3%) in presenza di EGF (10 ng/ml) più i fattori di crescita, e la fluorescenza del riferimento rappresentato dalla proliferazione indotta nel mezzo con solo il 3% di hPPP (n=4, tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato). L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'espansione delle AT MSC in presenza di hPPP con la crescita registrata nelle altre condizioni di coltura. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; dove non specificato la differenza non è significativa per p<0,05.

#### **4.1.2 Effetto a lungo termine del cocktail citochinico a base di EGF-bFGF-PDGFbb e ruolo di MEK 1/2 sulla proliferazione delle AT MSC**

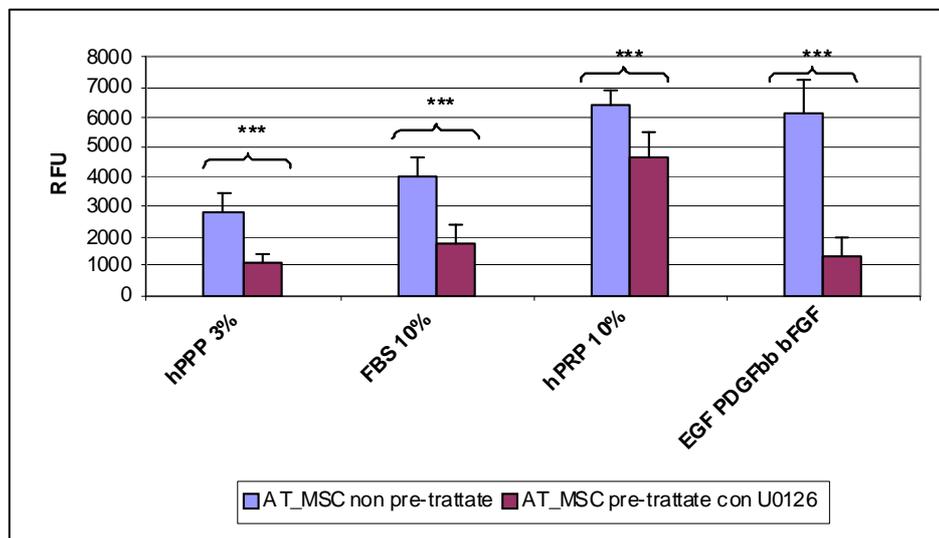
L'associazione di EGF-bFGF-PDGFbb favoriva l'espansione delle AT MSC in modo maggiore del solo hPPP al 3%, come provano i rispettivi cPD che, dopo 35 giorni di coltura (fine P5), erano rispettivamente di  $15,0 \pm 0,5$  e  $6,0 \pm 0,2$ . L'espansione risultava più marcata di quella indotta dalla presenza di FBS ( $9,4 \pm 2,8$ ), ma significativamente più bassa di quella dovuta all'hPRP ( $20,0 \pm 1,2$ ) (figura 4.2 A).

Questo appare in contrasto con i risultati dello studio di definizione del cocktail, ma i metodi usati nei due esperimenti per la rilevazione della proliferazione erano differenti (saggio fluorimetrico contro conta in camera di *Burker*), e i protocolli d'acquisizione dei dati presentavano tempi diversi di esposizione ai supplementi (72 ore nel primo e una settimana con cambio mezzo nel secondo). E' ipotizzabile anche che l'azione delle citochine si instauri più velocemente rispetto a quella di hPRP, ma che permanga meno.

Per chiarire se le MAP kinasi fossero coinvolte nella proliferazione indotta dai quattro supplementi, si è esaminato l'effetto di un inibitore (U0126) delle suddette kinasi sulla proliferazione delle AT MSC. Il pre-trattamento con U0126, che blocca l'attivazione di ERK MEK-dipendente, non aboliva completamente l'espansione delle mesenchimali nelle quattro condizioni di coltura (FBS 10%, hPRP 10% e hPPP 3% con e senza cocktail). Si riscontrava un'apprezzabile proliferazione residua in presenza di hPRP, probabilmente questo supplemento, essendo particolarmente ricco di fattori di crescita, è in grado di attivare altre vie di controllo della proliferazione. Da sottolineare come l'effetto proliferativo di EGF-bFGF-PDGFbb fosse notevolmente ridimensionato dall'inibitore di MEK 1/2, e che permanevano valori di proliferazione analoghi a quelli osservati con hPPP (figura 4.2 B).



A



B

**Figura 4.2. A.** Espansione delle AT MSC in presenza di hPPP (3%, n=5) con e senza cocktail (EGF, bFGF, PDGFbb a 10 ng/ml, n=5), o FBS (10%, n=6) o hPRP 10%, n=6). Le MSC una volta a settimana per 35 giorni sono state staccate con tripsina-EDTA e contate per determinare il cPD medio espresso come media±SD. L'analisi statistica è stata eseguita con il test *t student* confrontando l'espansione in presenza del cocktail con quella negli altri supplementi. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; dove non specificato la differenza non è significativa per p<0,05. **B.** Ruolo di MEK1/2 sull'espansione delle AT MSC esposte per 48 ore a fine P1 a mezzi addizionati con hPPP (3%) in presenza o meno del cocktail, o con FBS 10% o con hPRP 10%. L'espansione, misurata con metodo fluorimetrico sulla base delle BrdU incorporata nel DNA neosintetizzato, è stata paragonata alla crescita delle stesse MSC non trattate con U0126 nelle stesse condizioni di coltura. L'analisi statistica è stata eseguita con il test *t student* confrontando l'espansione delle AT MSC pre-trattate con l'inibitore con quelle non esposte a U0126. \*\*\* p<0,001. RFU= *relative fluorescence unit*.

### 4.1.3 Immunofenotipo delle AT MSC

L'espressione degli antigeni di superficie permette una rapida identificazione di una popolazione cellulare ed è diffusamente usato in immunologia ed ematologia.

Per identificare le MSC, il *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* dell'ISCT ha proposto che queste cellule esprimano il CD 105 e il CD 90 ( $\geq 95\%$ ) e che manchino dei marker ematopoietici (CD 45, CD 34  $\leq 2\%$ ).

L'espressione dei marker di superficie è stata analizzata al citofluorimetro ad ogni passaggio per tutte le quattro condizioni di coltura. Tutte le AT MSC sono risultate altamente positive (84-96 %) per il CD 105, CD 90 e CD 44 già a fine P1 e la loro espressione si è mantenuta costante fino al P5 (tabella 4.1). La percentuale di cellule esprimenti il CD 31 (marker endoteliale), il CD 34 e CD 45 (marker ematopoietici) e il CD 117 c-kit è risultata del 3% solo a fine P1 e negativa nei passaggi successivi. Questi dati confermano l'isolamento di una popolazione estremamente omogenea in tutte le condizioni di coltura, e che il cocktail non influenza in modo significativo l'espressione dei marker caratteristici delle mesenchimali.

L'aldeide deidrogenasi per le AT MSC espanse in FBS e hPPP si manteneva costante tra P1 e P5. In presenza di hPRP e del cocktail citochinico l'enzima era invece significativamente più espresso rispetto al mezzo supplementato con FBS ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  rispettivamente), ma durante l'espansione si assisteva ad un calo che risultava significativo solo per hPRP. Le percentuali di cellule CD 45- CD 105+ ALDH+ erano comunque basse, se paragonate alle HSC ( $\geq 80\%$ ), per poter utilizzare quest'enzima come marker identificativo delle mesenchimali in tutte le condizioni di crescita in esame.

	Fine P1	Fine P5	
<b>CD 45- CD 105+ CD 90+</b>			
FBS	85.15 ± 9.14	94.5 ± 3.00	
hPRP	91.77 ± 7.71	95.54 ± 1.80	
hPPP	95.77 ± 1.83	97.01 ± 0.32	
EGF bFGF PDGFbb	95.77 ± 1.83	95.24 ± 2.30	
<b>CD 45- CD 105+ CD 44+</b>			
FBS	84.56 ± 8.40	94.56 ± 3.00	
hPRP	90.99 ± 8.71	94.85 ± 4.10	
hPPP	95.11 ± 0.88	96.04 ± 2.35	
EGF bFGF PDGFbb	95.44 ± 0.95	93.69 ± 0.28	
<b>CD 45- CD 105+ ADLH+</b>			
FBS	24.20 ± 10.78	ns	16.89 ± 3.67
hPRP	** 49.42 ± 7,97	**	24.83 ± 9.00
hPPP	34.83 ± 11.85	ns	29.50 ± 0.71
EGF bFGF PDGFbb	* 44.81 ± 9.95	ns	28.05 ± 3.53

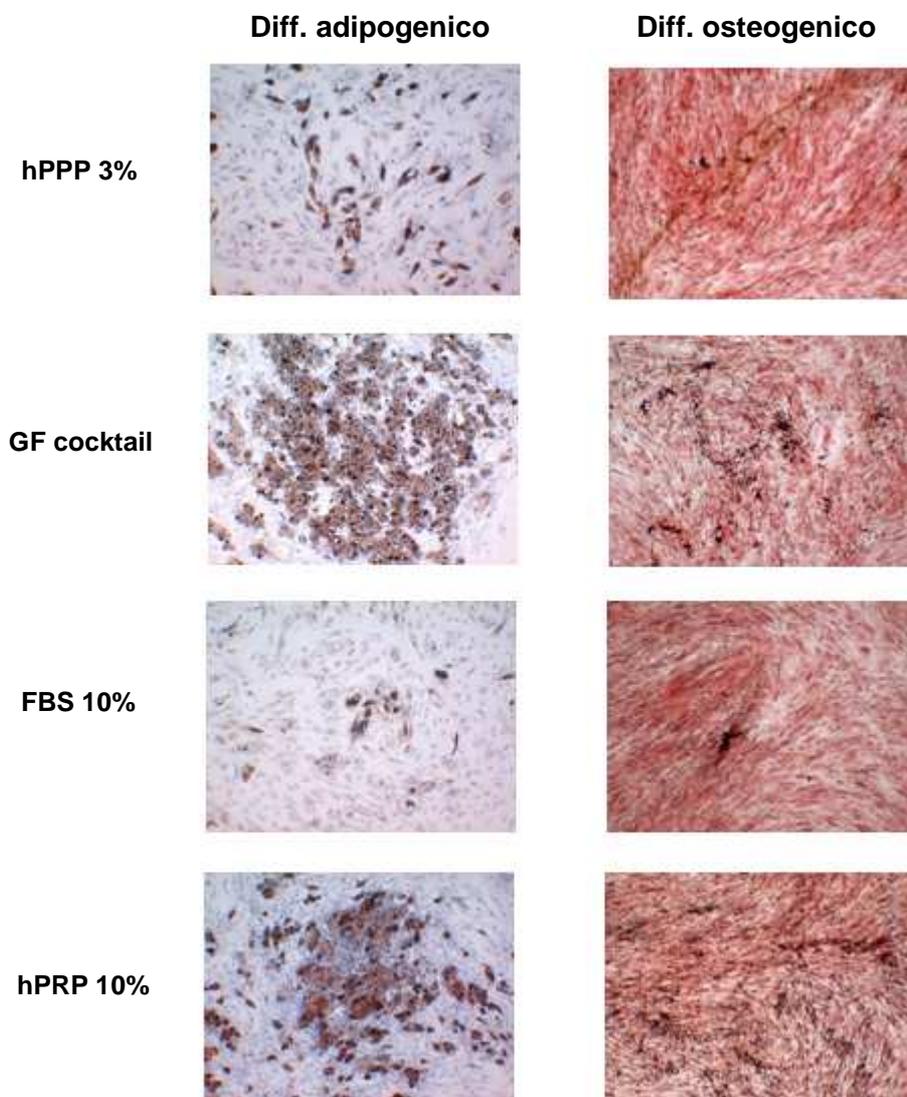
**Tabella 4.1.** Confronto dell'espressione dei marker di superficie caratteristici delle MSC (CD 105, CD 90, CD 44) coltivate in presenza di FBS (10%; n=6), o hPRP (10%; n=6), o hPPP (3%; n=5), o hPPP (3%) con EGF, bFGF, PDGFbb (10 ng/ml; n=5). I dati, analizzati al citofluorimetro a fine P1 e P5, hanno evidenziato un'espressione alta e costante già a fine P1 e l'ottenimento di una popolazione omogenea di AT MSC in tutte le condizioni di crescita. E' stato inoltre presa in esame la possibilità di usare l'espressione dell'ALDH come marker di identificazione delle AT MSC in combinazione con CD 45 e CD 105. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'espressione a fine P1 dell'ALDH nelle AT MSC espanse in presenza di FBS con quella nelle mesenchimali coltivate negli altri supplementi. La differenza non è risultata significativa per p<0,05 tra FBS e hPPP, \* p<0,05; \*\* p<0,01. E' stata eseguita l'analisi anche tra l'espressione di ALDH a fine P1 e quella a fine P5 delle AT MSC coltivate con lo stesso supplemento. ns= non significativo per p<0,05; \*\* p<0,01.

#### 4.1.4 Capacità differenziativa

La potenzialità differenziativa è stata valutata in senso adipogenico ed osteogenico a fine P2, cioè dopo 14 giorni di esposizione alle quattro diverse condizioni di coltura, in condizioni standard usando lo stesso mezzo differenziativo supplementato con FBS e gli specifici fattori differenziativi.

La capacità differenziativa è stata confermata in tutti i campioni verso le due linee, ma il numero di colonie di adipociti e l'ammontare della mineralizzazione dipendeva dal tipo di supplemento al quale le AT MSC erano state esposte. hPRP e il cocktail di citochine aumentavano le potenzialità differenziative, mentre l'FBS induceva una minore potenzialità differenziativa se paragonato all'effetto indotto da

hPPP. Questo risultato suggerisce che i fattori di crescita definiti nelle fasi iniziali dello studio e quelli presenti in hPRP favoriscono l'osteogenesi, e stimolano l'attivazione dei *pathway* coinvolti nel differenziamento adipogenico (figura 4.3).

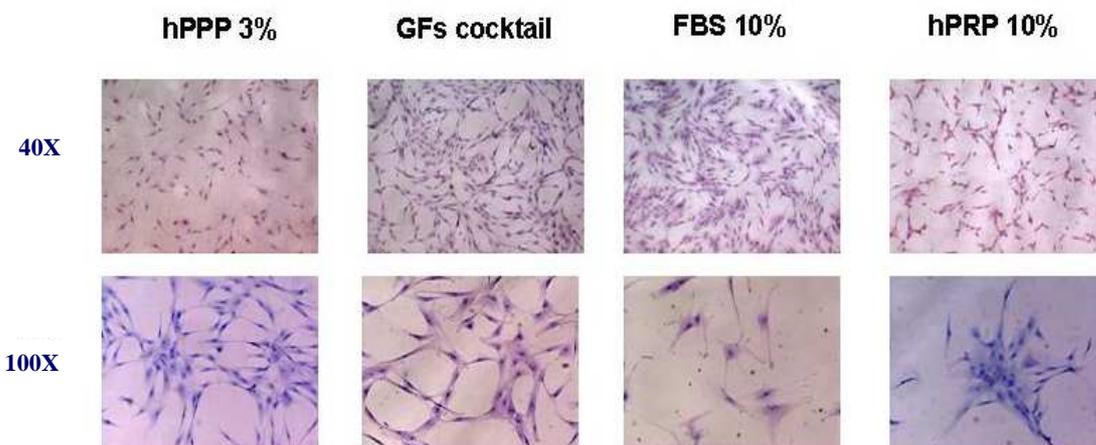


**Figura 4.3.** Differenziamento delle AT MSC in senso adipogenico ed osteogenico dopo 14 giorni di esposizione a hPPP (3%), o EGF, bFGF, PDGFbb (10 ng/ml), o FBS (10%) o hPRP (10%). Il differenziamento è stato rilevato con Oil Red O e la colorazione di von Kossa rispettivamente, dopo 21 giorni di coltura nel mezzo differenziativo. Ingrandimento 40X.

#### 4.1.5 Morfologia delle AT MSC

I mezzi di coltura influenzavano la morfologia delle mesenchimali isolate da tessuto adiposo. Quelle cresciute in hPPP e hPRP mostravano la caratteristica morfologia fibroblastoide, ma apparivano più piccole rispetto a quelle espanse nel

mezzo supplementato con le citochine o con FBS (figura 4.4). In più, quelle esposte al siero bovino assumevano un'aspetto più allargato e cuboide. A fine P5, in tutte le condizioni di coltura testate, le dimensioni e la forma non mostravano variazioni qualitative apprezzabili rispetto al P1.

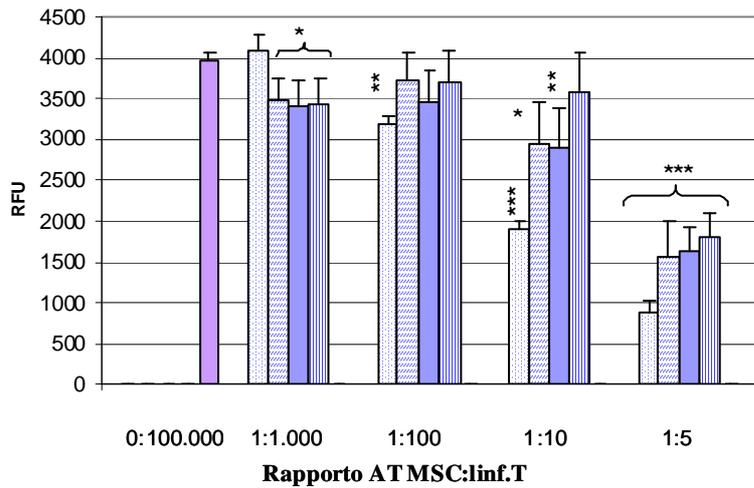


**Figura 4.4.** A fine P1 la morfologia delle AT MSC, espanse in presenza di hPPP (3%), o EGF, bFGF, PDGFbb (10 ng/ml), o FBS (10%) o hPRP (10%), è stata valutata tramite la colorazione con ematossilina-eosina (ingrandimenti 40X e 100X).

#### 4.1.6 Immunomodulazione

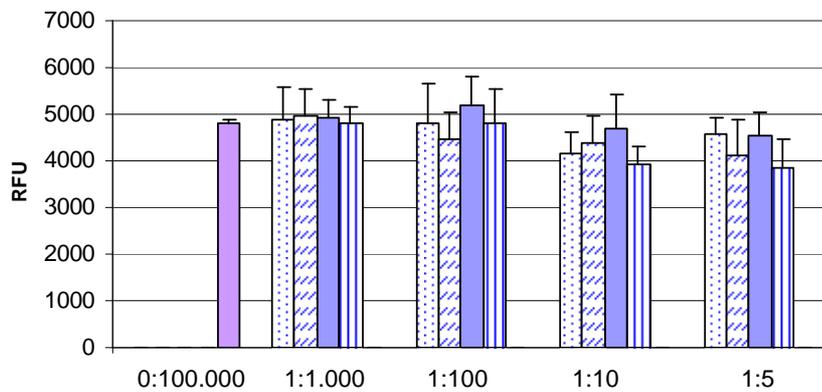
In letteratura è riportato che la capacità immunosoppressiva delle MSC a carico delle cellule T si esplica con il blocco della loro proliferazione. In presenza del cocktail citochinico, di hPPP e hPRP, l'effetto antiproliferativo era più marcato quando il rapporto tra mesenchimali e linfociti T era pari a 1:5; mentre con il siero animale l'azione si riscontrava a un rapporto di 1:10 (figura 4.5 A), probabilmente le condizioni FBS-free, inducendo la maturazione cellulare, riducono le potenzialità immunomodulanti con conseguente aumento del numero di AT MSC da somministrare per avere un effetto comparabile a quello dell'FBS.

Quando le due tipologie cellulari venivano separate da un inserto non si registrava alcun blocco della proliferazione linfocitaria (figura 4.5 B), in contrasto con quanto riportato in letteratura dove si sostiene che l'effetto immunosoppressivo è mediato da fattori solubili.



■ T cells  
  FBS 10%  
  hPRP 10%  
  hPPP 3%  
  EGF bFGF PDGFbb

**A**



■ T cells  
  FBS 10%  
  hPRP 10%  
  hPPP 3%  
  EGF bFGF PDGFbb

**B**

**Figura 4.5.** Effetto immunomodulante delle AT MSC espunte nelle quattro condizioni di coltura quando poste, a fine P3, in co-coltura con linfociti T attivati con PHA. **A.** Popolazioni cellulari a contatto (n=4). **B.** Popolazioni cellulari separate da *transwell* (n=4). L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'attivazione dei linfociti T con quella delle stesse cellule T coltivate per 6 giorni in presenza di un numero variabile di AT MSC espunte per 21 giorni ai 4 diversi supplementi. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; dove non specificato la differenza non è significativa per p<0,05.

## 4.2 Cellule stromali mesenchimali derivate da cordone ombelicale

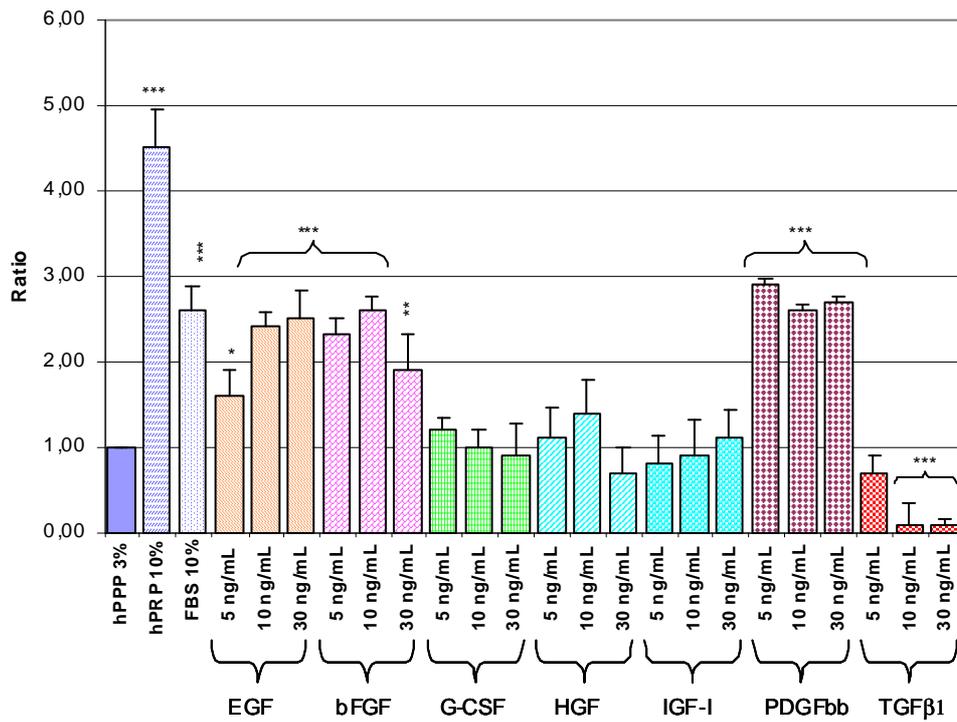
### 4.2.1 Effetto di un *pool* di sette citochine sulla proliferazione delle UC MSC

Nell'espansione delle UC MSC, EGF, bFGF e PDGFb aumentavano l'intensità di fluorescenza del substrato fluorogenico associato alla BrdU incorporata nel DNA neosintetizzato rispettivamente di 2,5, 2,6 e 2,9 volte rispetto al controllo rappresentato dal mezzo supplementato con hPPP al 3%. L'effetto era simile a quello registrato in presenza di FBS (2,6), ma nettamente inferiore a quello indotto da hPRP (4,5 volte. Figura 4.6 A). Solamente quando EGF e PDGFbb venivano aggiunti insieme la proliferazione era comparabile a quella dovuta a hPRP (figura 4.6 B). La combinazione di EGF e bFGF aveva invece un effetto moderato, forse per la bassa espressione del recettore per l'FGF sulla superficie delle UC MSC.

HGF e G-CSF non influenzavano la crescita sia quando aggiunti singolarmente (figura 4.6 A), che con EGF (figura 4.6 B).

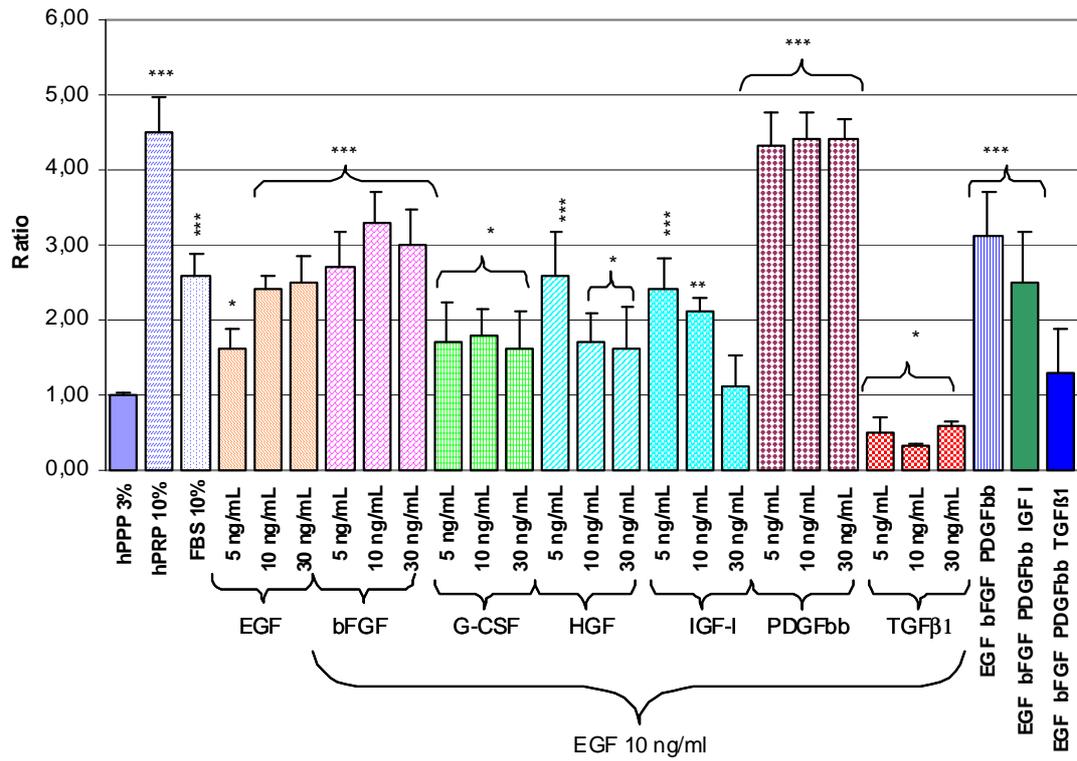
Un effetto inibitorio sull'EGF veniva registrato per IGF I, in contrasto con quanto riferito da Thomas (et al. 1999). Questo potrebbe essere dovuto all'assenza dell'FBS da lui usato, e/o alla bassa espressione dello specifico recettore, e/o alla mancanza della via del segnale associata alla proliferazione.

TGF $\beta$ 1 inibiva in modo significativo la crescita sia quando usato da solo (0,1) sia con EGF (0,3) o in associazione con EGF-bFGF-PDGFbb (1,3). Questo sembra contraddire quanto riportato da Longobardi (et al. 2006), che però aveva utilizzato BM MSC isolate da topo e FBS.



Supplementi		Rapporto ± SD
hPPP 3%		1,00±0.01
hPRP 10%		4,50±0.46
FBS 10%		2,60±0.27
EGF	5 ng/mL	1,60±0.29
	10 ng/mL	2,40±0.18
	30 ng/mL	2,50±0.35
bFGF	5 ng/mL	2,30±0.21
	10 ng/mL	2,60±0.17
	30 ng/mL	1,90±0.41
G-CSF	5 ng/mL	1,20±0.15
	10 ng/mL	1,00±0.21
	30 ng/mL	0,90±0.37
HGF	5 ng/mL	1,10±0.36
	10 ng/mL	1,40±0.37
	30 ng/mL	0,70±0.31
IGF-I	5 ng/mL	0,80±0.35
	10 ng/mL	0,90±0.41
	30 ng/mL	1,10±0.34
PDGFbb	5 ng/mL	2,90±0.06
	10 ng/mL	2,60±0.06
	30 ng/mL	2,70±0.07
TGFβ1	5 ng/mL	0,70±0.21
	10 ng/mL	0,10±0.24
	30 ng/mL	0,10±0.06

A



		Supplementi	Rapporto ± SD
		hPPP 3%	1,00±0.01
		hPRP 10%	4,50±0.46
		FBS 10%	2,60±0.27
EGF 10 ng/ml	EGF	5 ng/mL	1,60±0.29
		10 ng/mL	2,40±0.18
		30 ng/mL	2,50±0.35
	bFGF	5 ng/mL	2,70±0.49
		10 ng/mL	3,30±0.40
		30 ng/mL	3,00±0.46
	G-CSF	5 ng/mL	1,70±0.50
		10 ng/mL	1,80±0.35
		30 ng/mL	1,60±0.52
	HGF	5 ng/mL	2,60±0.57
		10 ng/mL	1,70±0.37
		30 ng/mL	1,60±0.57
	IGF-I	5 ng/mL	2,40±0.42
		10 ng/mL	2,10±0.18
		30 ng/mL	1,10±0.42
	PDGFbb	5 ng/mL	4,30±0.45
		10 ng/mL	4,41±0.34
		30 ng/mL	4,40±0.27
	TGFβ1	5 ng/mL	0,50±0.18
		10 ng/mL	0,30±0.02
		30 ng/mL	0,60±0.03
		EGF bFGF PDGFbb	3,10±0.59
		EGF bFGF PDGFbb IGF I	2,50±0.66
		EGF bFGF PDGFbb TGFβ1	1,30±0.55

**B**

**Figura 4.6.** I grafici riportano gli indici di proliferazione in funzione delle concentrazioni delle citochine aggiunte. **A.** L'indice di crescita deriva dal rapporto tra l'intensità di fluorescenza delle UC MSC espanse per 72 ore in presenza di hPPP al 3%, o FBS (10%), o hPRP (10%), o hPPP addizionato con le citochine e quella derivata dell'espansione in hPPP (3%). **B.** L'indice è dato dal rapporto tra la fluorescenza delle UC MSC espanse per 72 ore nel mezzo supplementato con FBS (10%), o hPRP (10%) o hPPP in presenza di EGF (10 ng/ml) più i fattori di crescita, e la fluorescenza del riferimento rappresentato dalla proliferazione indotta nel mezzo con solo il 3% di hPPP (n=4, tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato). L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'espansione delle AT MSC in presenza di hPPP con la crescita registrata nelle altre condizioni di coltura. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; dove non specificato la differenza non è significativa per p<0,05.

#### 4.2.2 Effetto a lungo termine del cocktail citochinico a base di EGF-PDGFbb e ruolo di MEK 1/2 sulla proliferazione delle UC MSC

Il cocktail di citochine messo a punto favoriva maggiormente l'espansione delle UC MSC rispetto a hPPP (17,7±1,3 e 12,0±2,1 a fine P5 rispettivamente), e mostrava un cPD medio simile a quello indotto dall'FBS al 10% (17,4±1,2). L'espansione era comunque inferiore a quella in presenza di hPRP (23,5±1,5. Figura 4.7 A).

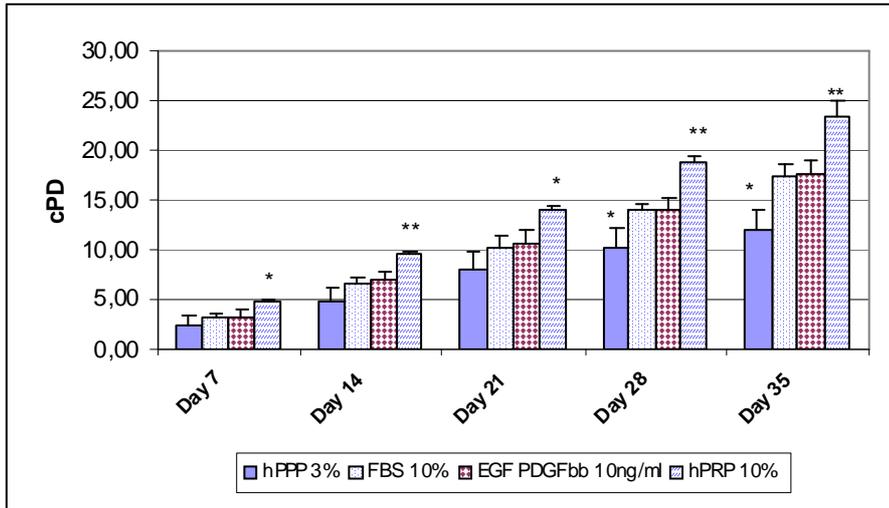
Questo sembra contraddire i risultati forniti dallo studio preliminare per la definizione del cocktail ottimale, le spiegazioni potrebbero essere quelle già illustrate per le AT MSC al punto 4.1.2.

E' da sottolineare che i cPD delle UC MSC sono stati più alti di quelle delle AT MSC a parità di mezzo usato (tabella 4.2), questo conferma quanto riportato in letteratura sulla maggiore capacità proliferativa delle mesenchimali derivate da cordone ombelicale.

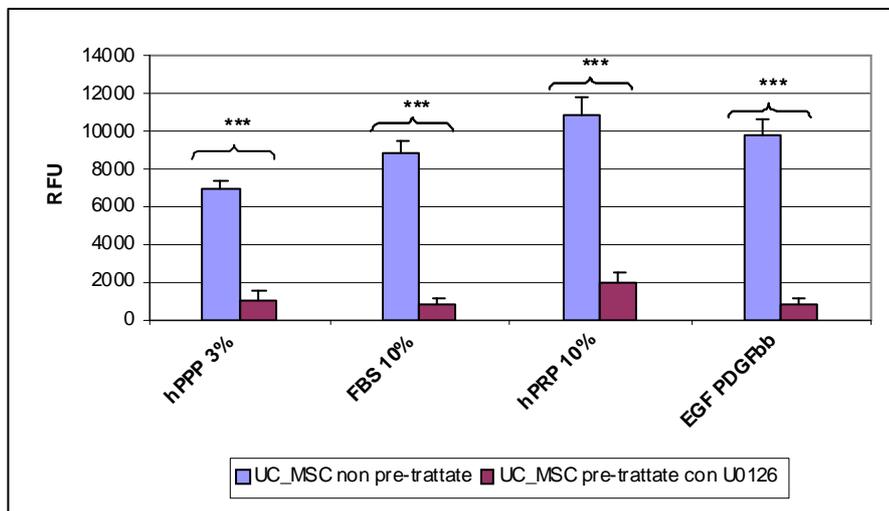
Supplementi	AT MSC	UC MSC
FBS	9,4±2,8	17,4±1,2 **
hPRP	20,0±1,2	23,5±1,5 **
hPPP	6,0±0,2	12,0±2,1 *
citochine	15,0±0,5	17,7±1,3 *

**Tabella 4.2.** Confronto tra i cPD medi a fine P5 delle AT e UC MSC espanse nelle quattro condizioni di coltura. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'espansione delle AT e UC MSC coltivate nel medesimo supplemento. \* p<0,05; \*\* p<0,01.

Il pre-trattamento con U0126, per inibire la via di proliferazione di MEK1/2, causava una drastica diminuzione dell'espansione in tutte le condizioni di coltura, suggerendo la priorità di questa cascata del segnale sulla crescita delle UC MSC e la mancanza di altre vie attive ipotizzabili invece per le AT MSC. (figura 4.7 B).



A



B

**Figura 4.7. A.** Espansione delle UC MSC in presenza di hPPP (3%, n=5) con e senza citochine (EGF, PDGFbb a 10 ng/ml, n=5), o FBS (10%, n=6) o hPRP 10%, n=6). Le MSC una volta a settimana per 35 giorni sono state staccate con tripsina-EDTA e contate per determinare il cPD medio espresso come media $\pm$ SD. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'espansione in presenza del cocktail con quella negli altri supplementi. \* p<0,05; \*\* p<0,01; dove non specificato la differenza non è significativa per p<0,05. **B.** Ruolo di MEK1/2 sull'espansione delle UC MSC esposte per 48 ore a fine P1 a mezzi addizionati con hPPP (3%) in presenza o meno del cocktail, o con FBS 10% o con hPRP 10%. L'espansione, misurata con metodo fluorimetrico sulla base delle BrdU incorporata nel DNA neosintetizzato, è stata paragonata alla crescita delle stesse MSC non trattate con U0126 nelle stesse condizioni di coltura. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'espansione delle UC MSC pre-trattate con l'inibitore con quelle non esposte a U0126. \*\*\* p<0,001. RFU= *relative fluorescence unit*.

#### 4.2.4 Immunofenotipo delle UC MSC

L'espressione dei marker di superficie evidenziava, come per le AT MSC, l'ottenimento di una popolazione CD 45-, CD 105+, CD 90+ e CD 44+ omogenea in tutte le condizioni in esame già a fine P1 (tabella 4.3).

Il valore di ALDH citosolica in tutte le condizioni di crescita era di circa il 30% e non subiva variazioni significative da P1 a P5. Questi risultati confermano quanto già visto con le AT MSC, ossia che questo enzima non è idoneo all'identificazione e all'isolamento delle mesenchimali.

	Fine P1		Fine P5
<b>CD 45- CD 105+ CD 90+</b>			
FBS	95.08 ± 2.88		94.35 ± 3.32
hPRP	95.86 ± 2.19		94.33 ± 2.60
hPPP	95.48 ± 2.09		95.37 ± 3.45
EGF PDGFbb	95.98 ± 1.38		93.89 ± 5.49
<b>CD 45- CD 105+ CD 44+</b>			
FBS	93.15 ± 2.56		90.02 ± 4.71
hPRP	94.55 ± 2.10		93.16 ± 2.86
hPPP	88.16 ± 4.47		87.76 ± 5.97
EGF PDGFbb	89.66 ± 2.35		87.66 ± 0.80
<b>CD 45- CD 105+ ADLH+</b>			
FBS	33.33 ± 2.89	ns	39.40 ± 0.86
hPRP	27.83 ± 3.26	ns	21.98 ± 4.28
hPPP	27.63 ± 6.54	ns	32.39 ± 10.45
EGF PDGFbb	36.75 ± 11.85	ns	24.63 ± 9.34

**Tabella 4.3.** Confronto dell'espressione dei maker di superficie caratteristici delle MSC (CD 105, CD 90, CD 44) coltivate in presenza di FBS (10%, n=6), o hPRP (10%, n=6), o hPPP (3%, n=5), o hPPP (3%) con EGF e PDGFbb (10 ng/ml, n=5). I dati, analizzati al citofluorimetro a fine P1 e P5, mostrano un'espressione alta e costante già a fine P1 e l'ottenimento di una popolazione omogenea di UC MSC in tutte le condizioni di crescita. L'espressione dell'ALDH in combinazione con CD 45 e CD 105 non risulta idoneo per l'identificazione delle UC MSC. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'espressione a fine P1 dell'ALDH nelle UC MSC espanse in presenza di FBS con quella nelle mesenchimali coltivate negli altri supplementi. La differenza non è risultata significativa per  $p < 0,05$ . E' stata eseguita anche l'analisi tra l'espressione di ALDH a fine P1 e quella a fine P5 delle UC MSC coltivate con lo stesso supplemento. ns= non significativo per  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5 Capacità differenziativa

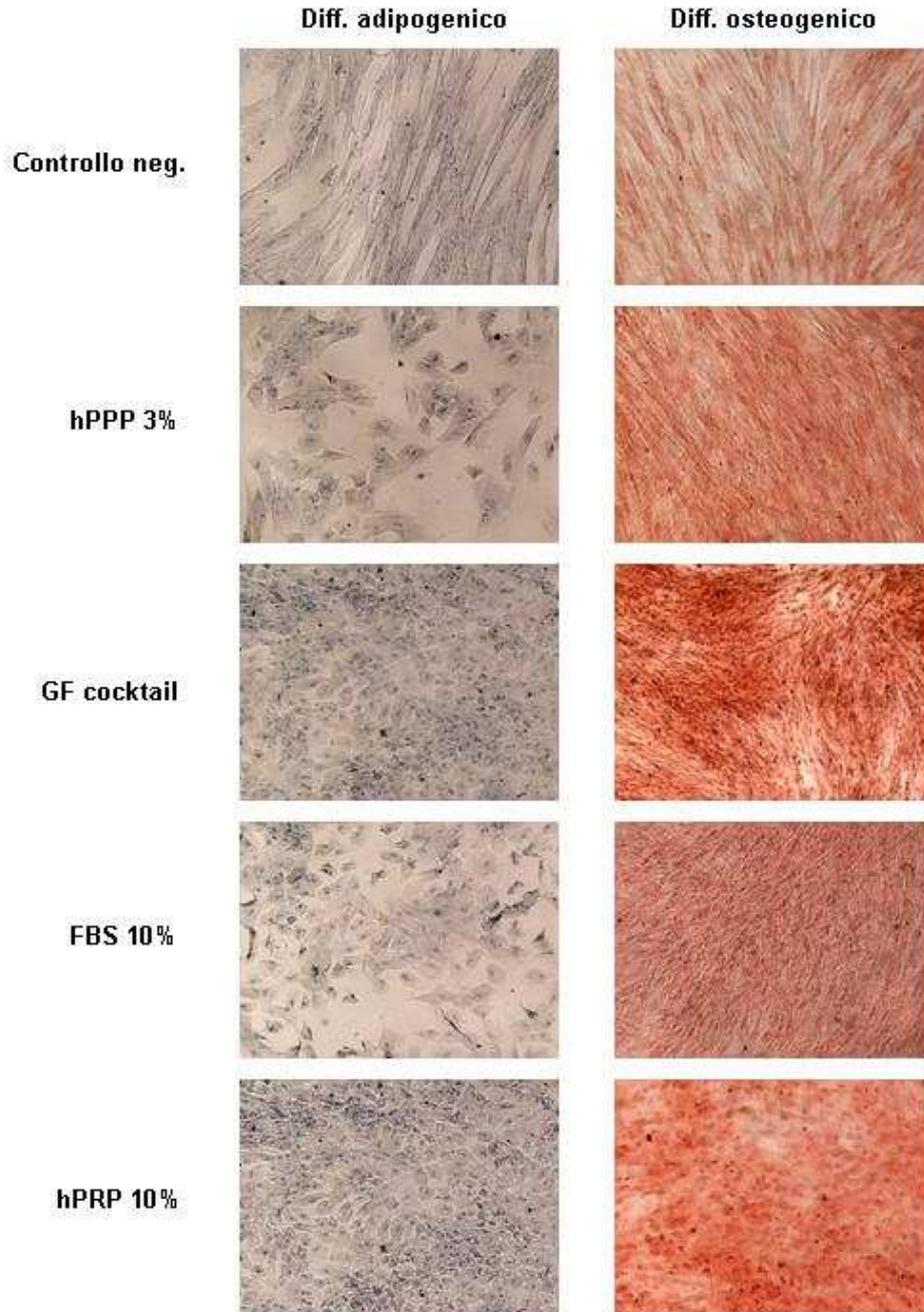
L'esposizione delle UC MSC ai mezzi differenziativi non induceva la comparsa dei classici segni di differenziamento sia in senso adipogenico che osteogenico in nessuna delle quattro condizioni di coltura (figura 4.8).

Nell'osteogenesi la colorazione di von Kossa era negativa, non registrando alcun deposito di idrossiapatite.

Nell'adipogenesi si riscontrava un cambiamento morfologico, un allargamento e arrotondamento delle cellule rispetto al controllo negativo, ma senza lo sviluppo di vacuoli lipidici.

Questi risultati potrebbero confermare che le UC MSC sono cellule in uno stadio immaturo rispetto alle mesenchimali isolate da AT e BM, e che potrebbero perciò necessitare di protocolli differenziativi più specifici con fattori aggiuntivi, aumento dei tempi di esposizione, ecc.

E' da sottolineare che il cocktail forniva risultati in linea con gli altri mezzi d'espansione, non inducendo maturazione o differenziamento rilevabile.



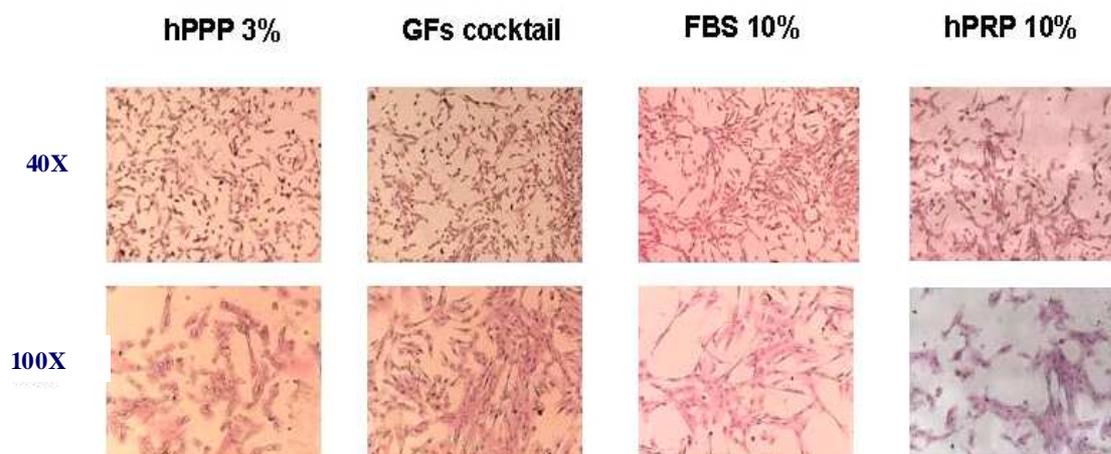
**Figura 4.8.** Differenziamento delle UC MSC in senso adipogenico ed osteogenico dopo 14 giorni di esposizione a hPPP (3%), o EGF e PDGFbb (10 ng/ml), o FBS (10%) o hPRP (10%). Il differenziamento è stato rilevato con Oil Red O e la colorazione di von Kossa rispettivamente, dopo 21 giorni di coltura con il mezzo differenziativo. Ingrandimento 40X.

#### 4.2.6 Morfologia delle UC MSC

La morfologia cellulare era simile in presenza di hPRP e hPPP con e senza citochine, le cellule apparivano più piccole e arrotondate rispetto a quelle espanse in FBS dove assumevano una forma stellata e più affusolata (figura 4.9).

Queste caratteristiche permanevano senza variazioni significative fino a P5.

Rispetto le AT MSC, le UC MSC in presenza di hPPP, citochine e hPRP assumevano un aspetto meno fibroblastoide, mentre in FBS non si riscontrava la forma allargata indice di senescenza.



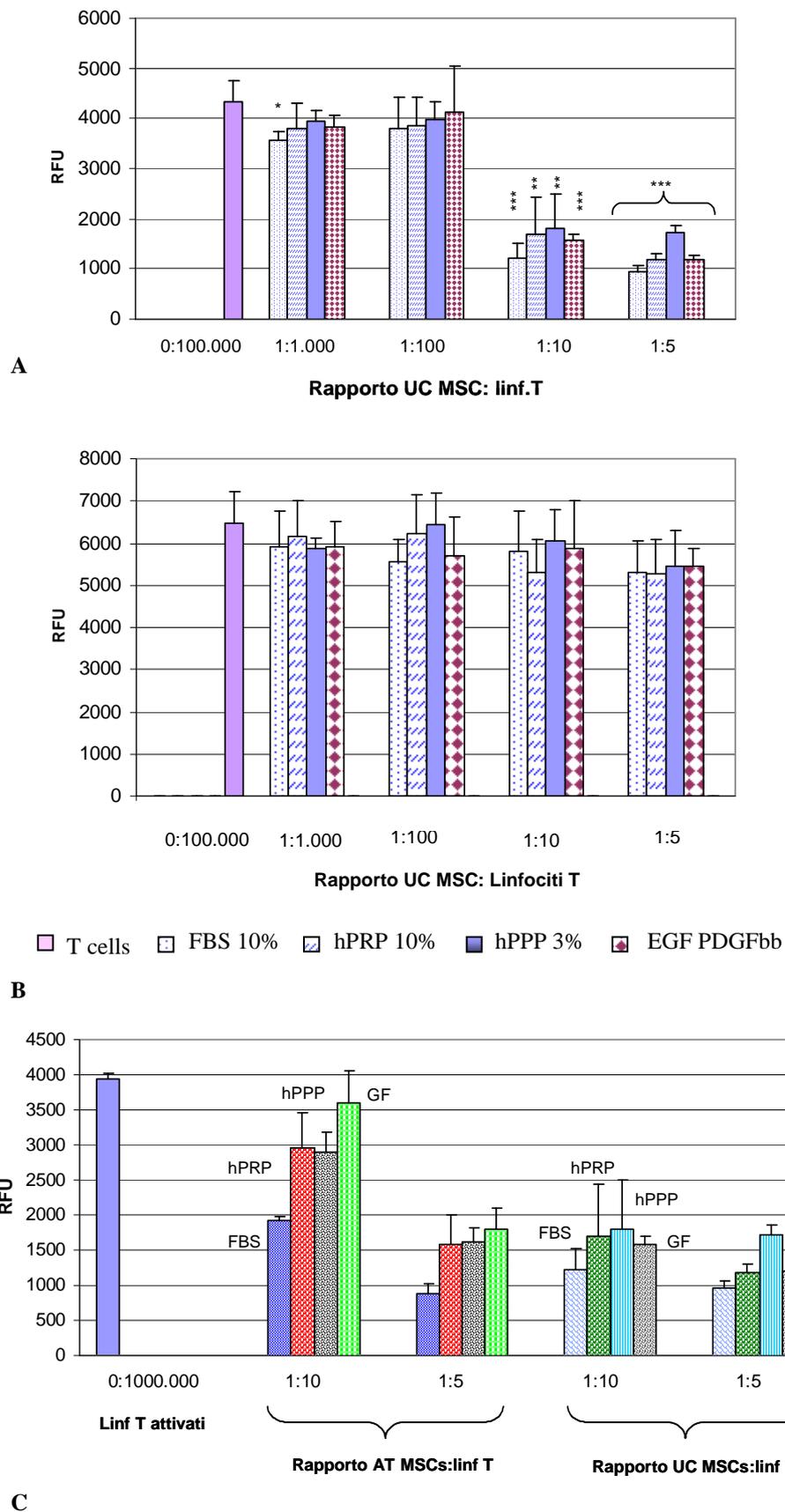
**Figur 4.9.** A fine P1 la morfologia delle UC MSC, espanse in presenza di hPPP (3%), o EGF e PDGFbb (10 ng/ml), o FBS (10%) o hPRP (10%), è stata valutata tramite la colorazione con ematossilina-eosina (ingrandimenti 40X e 100X).

#### 4.2.7 Immunomodulazione

L'effetto immunomodulante svolto sui linfociti T dalle UC MSC è stato valutato misurandone la proliferazione sulla base della BrdU incorporata nel DNA neosintetizzato.

Esso risultava confermato in tutte le condizioni di coltura ed era significativo quando il rapporto mesenchimali-cellule T era pari a 1:10 (figura 4.10 A). L'immunomodulazione si otteneva, quindi, ad un rapporto più basso rispetto alle AT MSC (figura 4.10 C). In altri termini per avere lo stesso effetto era necessaria la somministrazione di un numero inferiore di UC MSC, che risultano così più immunocompetenti delle mesenchimali isolate da AT.

Quando tra le due linee cellulari si interponeva un inserto, i linfociti T, in presenza di PHA, di attivavano in ugual misura in tutte le condizioni esaminate (figura 4.10 B). Il risultato conferma quanto già riscontrato per le AT MSC e suggerisce che l'immunosoppressione sia mediata prima di tutto dal contatto cellulare.



**Figura 4.10.** Effetto immunomodulante delle AT MSC espanse nelle quattro condizioni di coltura quando poste, a fine P3, in co-cultura con linfociti T attivati con PHA. **A.** Popolazioni cellulari a contatto (n=4). **B.** Popolazioni cellulari separate da *transwell* (n=4). L'analisi statistica è stata eseguita con il test *t student* confrontando l'attivazione dei linfociti T con quella delle stesse cellule T coltivate per 6 giorni in

presenza di un numero variabile di AT MSC esposte per 21 giorni ai 4 diversi supplementi. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; dove non specificato la differenza non è significativa per  $p < 0,05$ . C. Confronto della capacità immunosoppressiva delle AT e UC MSC espanse nei diversi mezzi di coltura. Per l'analisi statistica far riferimento alle figure 4.5 A e 4.10 A.

### 4.3 Relazione tra cellule CIK e UC MSC

Le cellule CIK sono linfociti con attività citotossica NK-simile, per questo usate in preparazioni linfocitarie arricchite di cellule CD 3+ CD 56+ per l'immunoterapia dei tumori.

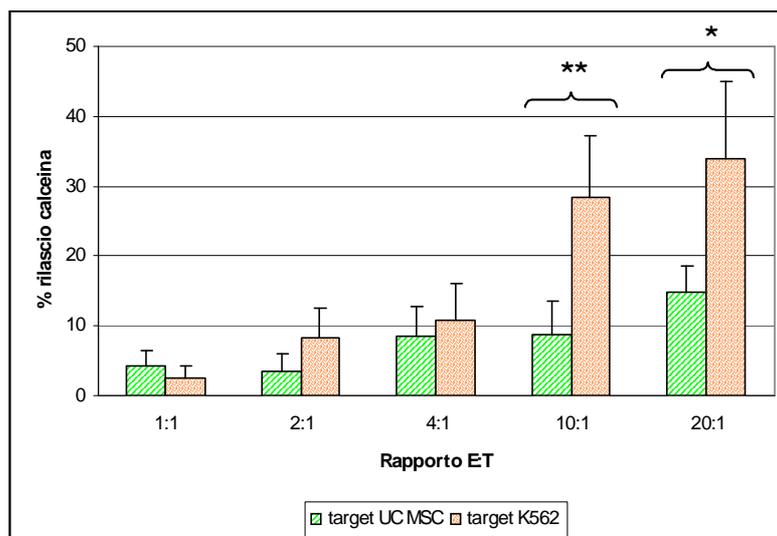
Le mesenchimali, visto la loro capacità immunomodulante, sono invece applicate nella prevenzione/trattamento della GvHD.

Questi due trattamenti rappresentano “farmaci” di nuova generazione nella terapia anticancro e per essi si pone il problema di possibili interazioni scomode e controproducenti. Per questo si è andato ad indagare il loro reciproco effetto. Per semplicità d'esposizione d'ora in poi si parlerà di cellule CIK intendendo la sospensione linfocitaria arricchita in CD 3+ CD 56+ dopo espansione *ex vivo*.

#### 4.3.1 Effetto delle cellule CIK sulle UC MSC

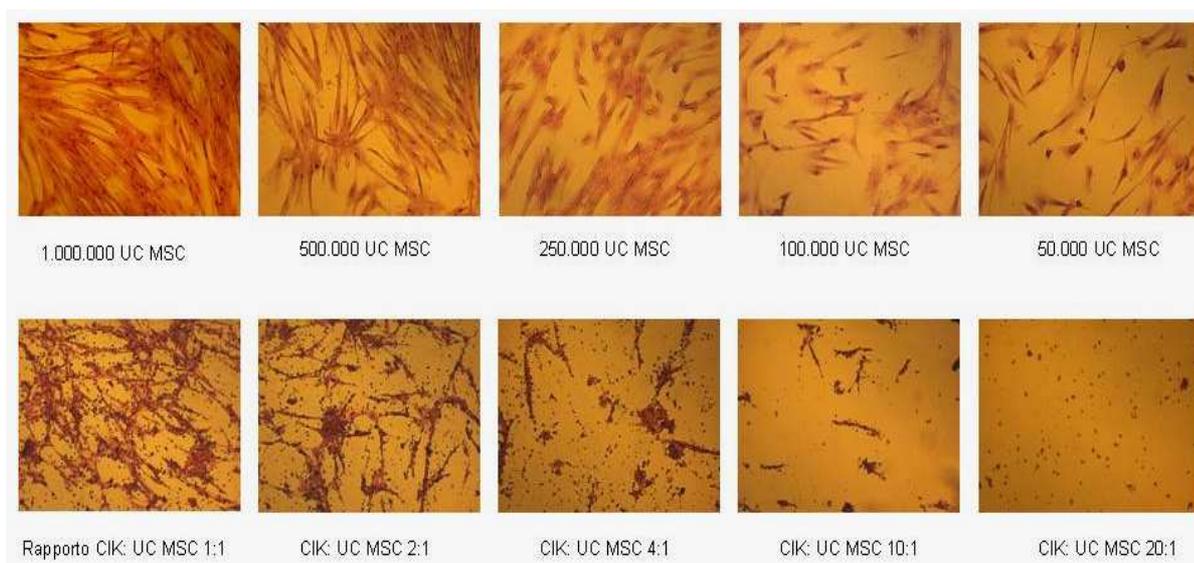
Sulle mesenchimali isolate da UC ed espanse in presenza di FBS, a fine P2, è stato testato l'effetto di cellule CIK stimulate *in vitro* con INF  $\gamma$ , anti CD3 e IL2. Si è optato per campioni che al 14°-16° giorno di espansione si trovassero in fase logaritmica di crescita e presentassero una percentuale di CIK superiore al 30%.

A breve termine, dopo 4 ore di co-coltura, è stato riscontrato un effetto citotossico delle CIK nei confronti delle UC MSC (figura 4.11), con un massimo del rilascio di calceina del  $15,0 \pm 4,0\%$  quando il rapporto CIK: UC MSC era pari a 20:1. E' da sottolineare che la citotossicità era comunque inferiore di quella a carico delle K562, una linea tumorale stabilizzata di leucemia mieloide cronica, dove l'azione citotossica era rilevante già ad un rapporto di 10:1 (circa 30%).



**Figura 4.11.** Azione citotossica delle cellule CIK (E=effettrici) espressa in termini di percentuale di calceina AM rilasciata dalle cellule target (T=target), UC MSC e K562, dopo co-coltura di 4 ore. La fluorescenza è stata rilevata a  $\lambda_{exc}$  485 nm,  $\lambda_{em}$  535 nm. L'esperimento è stato condotto a rapporti diversi di cellule effettrici/target e in triplicato (n=5). L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando l'azione citotossica svolta dalle cellule CIK sulle UC MSC con quella a carico delle K562. \* p<0,05; \*\* p<0,01; agli altri rapporti la differenza non è risultata significativa per p<0,05.

Per valutare l'effetto a lungo termine la co-coltura è stata prolungata a 6 giorni e, una volta rimosse le CIK in sospensione, le UC MSC sono state fissate e colorate. Al microscopio era apprezzabile la progressiva diminuzione del numero di mesenchimali all'aumentare del rapporto CIK: UC MSC, fino alla loro scomparsa ad un rapporto pari a 20:1 (figura 4.12).

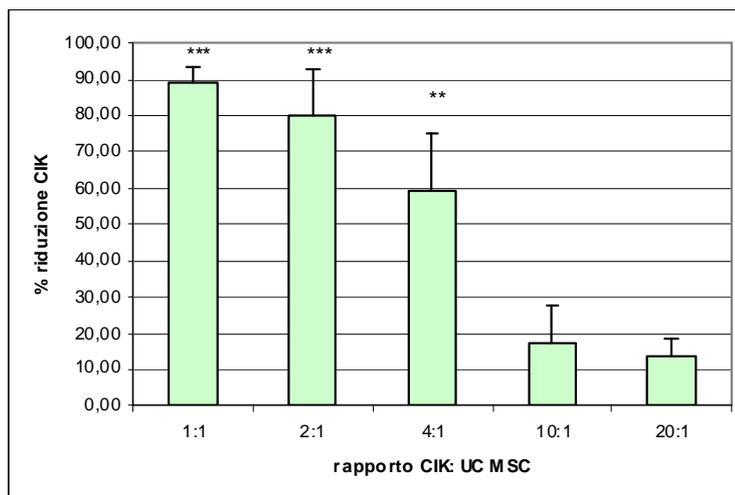


**Figura 4.12.** UC MSC espanso in FBS sottoposto (sotto) e non (sopra) a co-cultura con CIK per 6 giorni e a vari rapporti. Colorazione effettuata con ematosilina-eosina, ingrandimento 100x.

La lisi non era rilevabile quando le due popolazioni venivano separate da un inserto. Il contatto cellulare e il tempo di esposizione sono quindi fondamentali per l'azione citotossica delle CIK sulle MSC.

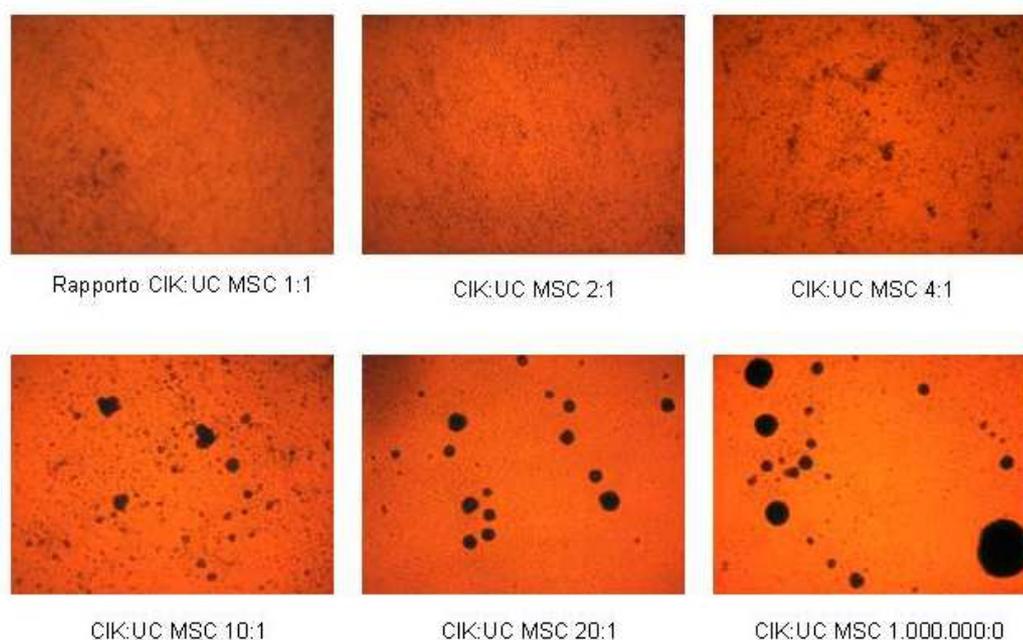
#### 4.3.2 Effetto delle UC MSC sulle cellule CIK

Dopo co-cultura di 6 giorni con UC MSC, le CIK sono state contate in camera di *Burker*. Questo ha consentito di evidenziare che, al diminuire del rapporto CIK: UC MSC, il numero di cellule in sospensione si riduceva progressivamente; si registrava infatti una riduzione dell'88,8±4,4 % al rapporto 1:1 e di solo il 13,5±5,1 % a 20:1 (figura 4.13).



**Figura 4.13.** Il grafico rappresenta la riduzione del numero di CIK poste in co-cultura con un numero variabile di UC MSC (n=5). L'analisi statistica è stata eseguita con il test t *student* confrontando la riduzione riscontrata al rapporto CIK: UC MSC pari a 20:1 con quella calcolata agli altri rapporti. \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; dove non specificato la differenza non è significativa per p<0,05.

Al microscopio si osservava inoltre che, al diminuire del numero di mesenchimali presenti, il numero e le dimensioni dei *cluster* di CIK aumentava (figura 4.14).



**Figura 4.14.** Progressiva aumento del numero e delle dimensioni dei *cluster* di CIK in presenza di un numero decrescente di UC MSC. Ingrandimento 40X.

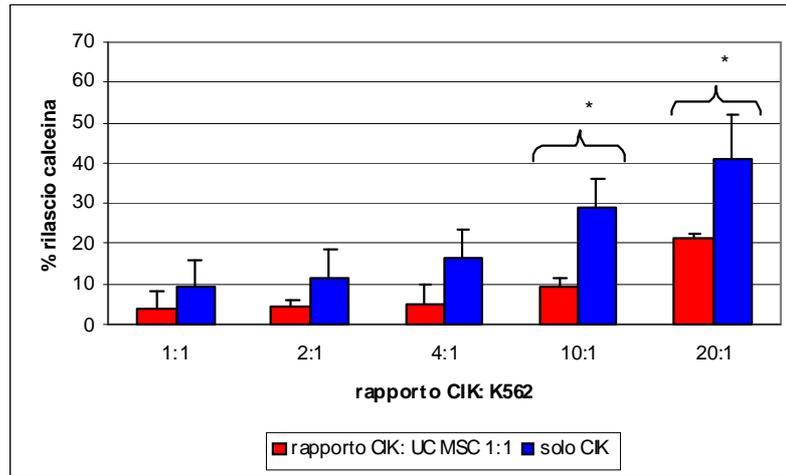
L'effetto veniva annullato quando tra le due popolazioni si interponeva un inserto. Ancora una volta l'azione è prima di tutto mediata dal contatto cellula-cellula.

L'analisi citofluorimetrica sulla sospensione ha evidenziato che l'azione delle UC MSC non era diretta contro una specifica sottopopolazione della stessa sospensione, infatti le percentuali di cellule CD 3+ CD 56+ (CIK), CD 3- CD 56+ (NK), CD 3+ CD 4+ (T *helper*) e CD 3+ CD 8+ (T citotossici), che la costituiscono, permanevano costanti indipendentemente dai rapporti usati (tabella 4.4). Stesso risultato quando è stato ottenuto quando era presente l'inserito.

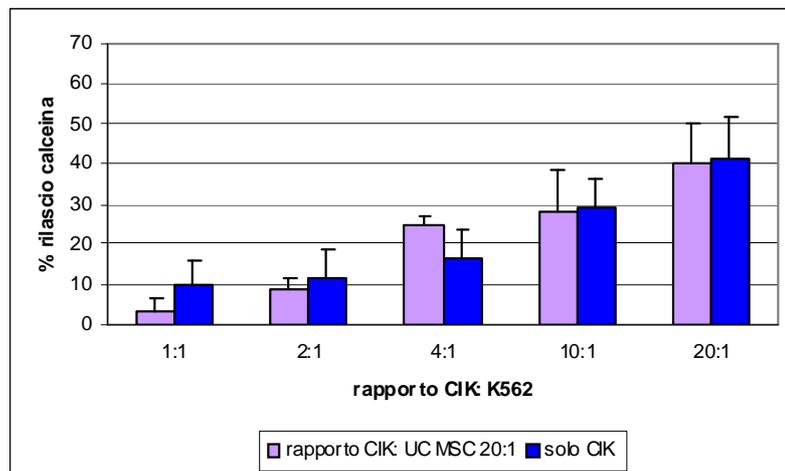
Rapporto CIK: UC MSC	CD3+	CD3+ CD4+	CD3+ CD8+	CD3+ CD56+	CD3- CD56+
1:1	84,97 ± 9,02	26,42 ± 8,83	60,60 ± 7,02	45,35 ± 4,43	9,41 ± 4,43
2:1	84,58 ± 7,96	28,74 ± 7,60	58,15 ± 8,23	43,03 ± 3,65	9,26 ± 5,78
4:1	84,31 ± 10,11	26,86 ± 7,03	57,87 ± 10,71	42,96 ± 7,42	10,35 ± 7,15
10:1	86,38 ± 8,98	24,80 ± 5,82	57,95 ± 11,46	47,50 ± 6,78	11,27 ± 9,94
20:1	78,26 ± 13,10	22,46 ± 7,10	62,59 ± 8,57	48,88 ± 7,41	12,02 ± 10,73
1.000.000:0	81,98 ± 11,88	21,24 ± 7,54	61,01 ± 0,87	43,80 ± 6,18	12,60 ± 10,33

**Tabella 4.4.** Confronto dell'espressione dei marker linfocitari di superficie delle CIK esposte per 6 giorni ad un numero variabile di UC MSC (n=5). L'analisi statistica eseguita con il test t *student*, confrontando l'espressione dei marker di superficie in assenza di mesenchimali e in presenza di UC MSC a vari rapporti, non ha rivelato differenze significative per  $p < 0,05$ .

Un altro aspetto che è stato valutato è relativo all'andamento della citotossicità delle CIK dopo 6 giorni di coltura a contatto con le UC MSC. Si è riscontrata una diminuzione della capacità citotossica al diminuire del rapporto CIK: UC MSC, in altri termini l'esposizione ad un numero crescente di mesenchimali riduceva la capacità citotossica delle cellule CIK (figura 4.15). Ai rapporti CIK: UC MSC pari a 1:1, 2:1 e 4:1 l'azione citotossica sulle K562 raggiungeva un valore di circa il 20% quando le cellule effettrici erano 20 a 1 rispetto alle target, ed era comunque inferiore a quella delle CIK coltivate in assenza di mesenchimali (in media 40%. Figura 4.15 A). Quando le CIK erano in numero superiore (10:1 e 20:1 rispetto alle mesenchimali), l'effetto sulle cellule tumorali era dose dipendente con andamento confrontabile a quello delle CIK non esposte alle UC MSC (figura 4.15 B).



**A**



**B**

**Figura 4.15.** Effetto citotossico sulle K562 svolto dalle CIK co-coltivate a rapporti variabili con UC MSC per 6 giorni. **A.** Rapporto CIK:UC MSC pari a 1:1. L'analisi statistica è stata eseguita con il test *t student* confrontando l'azione citotossica sulle K562 svolta dalle cellule CIK non esposte alle mesenchimali e quella delle CIK coltivate in presenza di UC MSC. \*  $p < 0,05$ ; dove non specificato la differenza non è significativa per  $p < 0,05$ . **B.** Rapporto CIK:UC MSC pari a 20:1. La stessa analisi statistica non ha evidenziato differenze significative per  $p < 0,05$ .



---

## 5. Discussione

---

Questo studio ha preso in considerazione le cellule stromali mesenchimali, cellule multipotenti, ubiquitarie nel corpo umano, capaci di differenziarsi in cellule di origine mesodermica, ectodermica ed endodermica in presenza di opportune condizioni, in grado di favorire l'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche prevenendo e/o controllando la GvHD dopo trapianto allogenico.

Sebbene le terapie a base di MSC derivate da midollo osseo, la prima e più studiata fonte d'isolamento delle mesenchimali, abbiano rappresentato per anni un target promettente per l'ingegneria tissutale e la terapia cellulare somatica e genica, ultimamente sono state sollevate delle riserve sul loro utilizzo: il prelievo invasivo, la bassa frequenza destinata a diminuire ulteriormente con l'età, così come la capacità proliferativa e differenziativa.

Per bypassare queste limitazioni si sono prese in considerazione e messe a confronto due fonti alternative: 1) il tessuto adiposo, contenete MSC adulte con frequenza e capacità proliferativa maggiori rispetto al BM; 2) il cordone ombelicale, dove sono state isolate MSC dalle caratteristiche più "primitive" di quelle adulte da BM, cariotipicamente più stabili, più proliferanti, ma meno inclini al differenziamento probabilmente per la loro età ontogenica.

Per queste due fonti sono stati messi a punto dei cocktail citochinici al fine di garantire l'ottenimento di un numero di cellule sufficiente per un'applicazione clinica in assenza di derivati animali, come l'FBS associato al rischio di reazioni immunitarie e trasmissione di malattie virali e prioniche, o di supplementi dalla composizione variabile e non standardizzabile come il lisato piastrinico o hPRP.

In letteratura si trovano numerosi studi sull'effetto dei singoli fattori di crescita sulle MSC, ma la loro comparazione è ardua a causa dei diversi protocolli usati che differiscono per fonte, densità di semina, mezzo di controllo, intervallo di concentrazione delle citochine, tempo di esposizione e saggio usato per testare la proliferazione; inoltre, tutti prevedono la presenza di FBS. In questo studio, per la prima volta, è stato valutato l'effetto di un *pool* di fattori di crescita (EGF, bFGF, G-CSF, HGF, IGF I, PDGFbb e TGFβ1) con protocolli sperimentali standard in modo da

definire le condizioni ottimali per l'espansione delle AT e UC MSC in assenza di FBS. A questo scopo è stato utilizzato un mezzo base costituito da DMEM e hPPP al 3 %, un supplemento umano che supporta la crescita delle MSC minimizzando l'apoptosi, e che permette l'azione delle citochine per le quali è fondamentale la presenza di un siero (Krampera et al. 2005).

Esponendo le AT MSC a concentrazioni variabili (da 5 a 30 ng/ml) delle singole citochine, si è evidenziato un andamento crescente della proliferazione passando da IGF I < EGF < PDGFbb < bFGF, con un indice di crescita compreso tra 1,5 (IGF I a 30 ng/ml) e 4,1 (bFGF 5 ng/ml) rispetto all'espansione indotta dal mezzo base con solo hPPP. La proliferazione legata a bFGF risulta superiore anche a quella di FBS e hPRP. Al contrario TGFβ1 ha un effetto inibitorio, nessun effetto è stato riscontrato aggiungendo HGF come già osservato da Neuss (et al. 2004) e Forte (et al. 2006). Combinando le citochine con EGF (10 ng/ml), il fattore di crescita più studiato e meglio caratterizzato al fine di valutare eventuali sinergie, si è registrato un potenziamento dell'effetto indotto da EGF in presenza di IGF I, bFGF, PDGFbb e TGFβ1, ma inferiore a quello riscontrato con il solo bFGF. Un risultato migliore si ottiene con l'aggiunta simultanea di EGF, bFGF e PDGFbb, ma non un effetto sinergico, probabilmente per l'instaurarsi di meccanismi di saturazione a livello della cascata di trasduzione del segnale con conseguente raggiungimento delle risposta cellulare massima e innesco di *feedback* negativi. G-CSF sembra non agire sulla proliferazione, questo potrebbe confermare l'ipotesi di Tatsumi (et al. 2008) secondo il quale l'aumento delle BM MSC di topo, dopo somministrazione di G-CSF, potrebbe essere legato all'inibizione del loro differenziamento con conseguente incremento di MSC indifferenziate.

Sulle UC MSC si registra un effetto sovrapponibile alle AT MSC per EGF e PDGFbb, ma non per bFGF, questo potrebbe essere dovuto alla bassa espressione dello specifico recettore di superficie o alla via del segnale non attiva. Stessa ipotesi potrebbe spiegare l'assenza di crescita con IGF I. Anche sulle UC MSC G-CSF e HGF non presentano azione mitogenica e TGFβ1 la inibisce. L'effetto di EGF viene ancora una volta potenziato da PDGFbb, in misura maggiore rispetto alle MSC adulte, suggerendo il ruolo chiave delle vie del segnale associate a queste citochine nell'espansione delle MSC più "primitive". Confermato è invece l'effetto inibitorio di TGFβ1; mentre, a differenza di quanto visto per le AT MSC, G-CSF e IGF I ad alte concentrazioni deprimono la proliferazione dovuta ad EGF.

Questi risultati contrastanti tra AT e UC MSC, sono un'ulteriore prova delle non equivalenze tra mesenchimali derivate da tessuti diversi e da donatori d'età differente. UC e AT MSC rispondono spesso in modo diverso sia qualitativamente che quantitativamente alle citochine aggiunte, suggerendo per le UC MSC un sistema di risposta agli stimoli esterni non ancora maturo e in evoluzione.

Una volta definiti i cocktail citochinici per le AT e UC MSC, sulla base dell'incorporazione della BrdU nel DNA neosintetizzato e costituiti rispettivamente da hPPP al 3% e EGF-bFGF-PDGFbb e EGF-PDGFbb, il passo successivo è stato verificare il loro effetto sulle caratteristiche salienti delle MSC (espressione dei marker di superficie, replicazione, capacità differenziativa ed immunomodulante) al fine di garantire l'ottenimento di un prodotto sicuro per il paziente in vista di una futura applicazione *in vivo*.

I risultati presentati dimostrano che partendo da circa 100-150 cm<sup>3</sup> di AT e 20-30 cm di UC, quantità di materiale che consentono l'isolamento a fine P0 di 2-3 milioni di cellule, si possono ottenere dopo 21 giorni di coltura in presenza dei cocktail testati un numero di MSC sufficiente per un uso clinico, ad esempio, per il trattamento della GvHD (2\*10<sup>6</sup> cellule/kg, che significa 140\*10<sup>6</sup> mesenchimali per un paziente dal peso medio di 70 kg). L'ottenimento di un numero così alto di cellule in un periodo relativamente breve, riduce inoltre la manipolazione, il rischio di inquinamento e di senescenza. Questo risultato, alla luce dei cPD medi, è raggiungibile anche con l'FBS, ma solo per le UC MSC e non per le AT. Al contrario, con hPRP il *quorum* di cellule sarebbe più che garantito per entrambi le fonti. Questo supplemento richiederebbe, per ottenere una quantità di lisato piastrinico autologo sufficiente per l'espansione nelle condizioni qui adottate, un volume di sangue decisamente alto (1-1,2 litri) contro i 150-200 ml di sangue necessari per gli 80-90 ml di hPPP. Questi dati sembrano contraddire quanto visto con lo studio preliminare per la definizione dei cocktail, dove quest'ultimi davano indici di crescita superiori o paragonabili a hPRP. Si deve però tener presente che i metodi di rilevazione della proliferazione e i tempi di esposizione alle citochine sono diversi nelle due tipologie di esperimenti. Nel primo si è ricorsi ad un'analisi fluorimetrica dopo 72 ore dall'aggiunta dei GF; nel secondo sono state effettuate una volta a settimana conte in camera di *Burker*. E' anche ipotizzabile che l'effetto dei fattori di crescita si instauri prima e permanga meno di quello indotto da hPRP.

La risposta mitogenica coinvolge due protein-kinasi specifiche, MEK1 e MEK2, che partecipano alla cascata del segnale delle protein-kinasi che controllano la crescita

e il differenziamento cellulare. In particolare, per le UC MSC l'inibizione di MEK 1/2 abbatta significativamente la proliferazione indotta da tutti i supplementi testati, suggerendo la priorità di questa via nel mediare la risposta mitogenica massima. Per le AT MSC si riscontra un risultato analogo in presenza del cocktail , di hPPP e FBS, mentre con hPRP c'è un'apprezzabile proliferazione residua da imputare al fatto che il lisato piastrino, essendo particolarmente ricco di citochine, chemochine, ecc., stimola altre vie del segnale attive sulle MSC adulte e piuttosto che su quelle isolate da UC.

Secondo l'ISCT per poter parlare di mesenchimali è necessario che le cellule esprimano specifici antigeni di superficie (CD 105, CD  $\geq 90-95\%$ ) e che si registri l'assenza di CD 45 e CD 34 ( $\leq 2\%$ ). Sia per le AT che le UC MSC le condizioni di crescita testate consentono di ottenere una popolazione omogenea già a fine P1, che poi si mantiene tale per tutta la durata della coltura (35 giorni). Costante resta anche la morfologia tra fine P1 e P5 nei diversi mezzi: fibroblastoide in hPRP, hPPP e in presenza di EGF-bFGF-PDGFbb, allargate e cuboidi in FBS per le AT MSC; più piccole in hPRP, hPPP e nel cocktail, simil-fibroblastica in FBS per le UC MSC. Da sottolineare sono le differenze nelle dimensioni tra AT e UC MSC, più piccole quelle isolate da cordone ombelicale, e il fatto che l'FBS xenogenico induca variazioni morfologiche in termini di dimensioni e forma rispetto ai sieri umani.

Le ALDH sono enzimi responsabili dell'ossidazione delle aldeidi in acidi carbossilici e rendono le cellule resistenti agli agenti alchilanti. Livelli superiori all'80% sono stati identificati nelle HSC (Storm et al. 1999, 2005; Christ et al. 2007), per questo sono state proposte come marker per l'identificazione e l'isolamento delle CD34+ e come indice di staminalità. Per le AT e UC MSC la percentuale di cellule ALDH+ nella popolazione CD 45- CD 105+ si mantiene sotto il 50%, in contrasto con quanto riferito da Mitchell (et al. 2006) che riporta un valore superiore al 70% per cellule staminali umane derivate da lipoaspirato; da sottolineare che Mitchell non valuta però la contemporanea espressione di ALDH, CD 105 e CD45. Visto l'espressione poco rilevante registrata si ritiene che, per le AT e UC MSC, l'ALDH non possa essere usato come marker identificativo di queste cellule.

L'osservazione dei dati suggerisce anche altre conclusioni. Nelle AT MSC l'espressione dell'ALDH a fine P1 è tra il 35 e 45 % quando il mezzo è supplementato con plasmidi umani e citochine, più bassa in FBS (circa il 24%). Questo potrebbe essere una conseguenza dell'uso di siero animale xenogenico su cellule umane, che risultano così meno resistenti all'attacco di agenti alchilanti. Questi composti planari sono

responsabili di mutazioni e danni al DNA che potrebbero tradursi in senescenza, modifiche morfologiche come la forma cuboide riscontrata in presenza di FBS. A fine P5 la percentuale di ALDH delle AT MSC coltivate in presenza dei plasmi umani diminuisce portandosi a valori compresi tra 25 e 30%, probabilmente è un effetto del tempo in coltura. Nell'UC MSC l'espressione dell'ALDH non subisce invece variazioni significative in tutte le condizioni di coltura, la percentuale è compresa tra 28 e 37% a fine P1 e 22-39% a fine P5. Si può concludere che non esistano sostanziali differenze tra le AT e UC MSC per quanto riguarda l'espressione di questa classe di enzimi.

Dal punto di vista differenziativo si riscontra un comportamento diametralmente opposto: le AT MSC differenziano sia in senso adipogenico che osteogenico, le UC MSC no. La capacità differenziativa è confermata per le AT MSC esposte ai quattro supplementi, anche se in grado diverso. Quelle coltivate in presenza di FBS non mostrano un marcato fenotipo osteogenico, probabilmente il differenziamento è in uno stadio prematuro non rilevabile con la colorazione di von Kossa che evidenzia la mineralizzazione, marker di osteoblasti maturi. Anche il differenziamento adipogenico è debole in FBS, mentre l'esposizione a EGF-bFGF-PDGFbb o hPRP aumenta notevolmente il numero di colonie di adipociti ed è riscontrabile la mineralizzazione; probabilmente i fattori di crescita stimolano l'attivazione dei *pathway* coinvolti nel differenziamento adipogenico ed osteogenico.

L'utilizzo di cellule mesenchimali "indirizzate" al differenziamento adipogenico potrebbe rappresentare una promettente risorsa in chirurgia plastica e ricostruttiva per la ricostruzione del seno dopo mastectomia, per la riparazione di difetti tissutali e subdemicici conseguenti a traumi, interventi chirurgici, ustioni e per il trattamento delle fistole in pazienti affetti da malattia di Crohn.

L'ingegneria tissutale offre future prospettive anche per la riparazione-ricostruzione ossea. Im e colleghi (2005) hanno riferito per le AT MSC una potenzialità osteogenica inferiore alle altre MSC adulte, questo è stato confermato anche da uno studio *in vivo* su modello animale (Hui et al. 2005). Con il cocktail definito, che predispone le AT MSC anche all'osteogenesi, questo "problema" potrebbe essere superato, garantendo un numero sufficiente di precursori osteogenici per il popolamento di uno *scaffold*.

Il cocktail potrebbe essere somministrato anche *in loco* su di una ferita, ad esempio una frattura, per facilitare una riparazione incompleta o assente. EGF, bFGF,

PDGFbb svolgono infatti un ruolo cruciale nella migrazione, proliferazione e differenziamento delle MSC, questi eventi stanno alla base del delicato meccanismo di riparazione che gioca sull'integrazione di più eventi molecolari mediati da citochine. In condizioni normali dopo un danno la ferita è ipossica e ciò richiama cellule dai tessuti adiacenti, come cellule dell'infiammazione e piastrine che, una volta attivate, rilasciano il contenuto dei loro granuli inclusi numerosi fattori di crescita (come EGF e PDGF). Alte concentrazioni di citochine richiamano le MSC *in situ* e le inducono a proliferare e differenziarsi. In più, le stesse mesenchimali secernono numerose citochine che aumentano la migrazione e la proliferazione di cheratinociti, monociti/macrofagi, cellule endoteliali e progenitori, e che inducono l'angiogenesi.

Le UC MSC, in tutte le condizioni di coltura, sono refrattarie al differenziamento. Si notano solo variazioni morfologiche, forma allargata e tondeggiante, ma mancano i caratteristici marker differenziativi (vacuoli lipidici e depositi di idrossiapatite). Anche in letteratura ci sono risultati contrastanti in merito alla capacità differenziativa delle UC MSC, spiegabile con la loro età ontogenica, l'assenza di vie del segnale attivate che potrebbero richiedere condizioni di induzione del differenziamento più specifiche (ad esempio, concentrazioni diverse dei fattori differenziativi, tempi più lunghi di esposizione, ecc.).

Le UC MSC risultano però più immunocompetenti delle AT MSC. L'effetto immunomodulante a carico dei linfociti T attivati con PHA, si registra per le prime ad un rapporto MSC: cellule T pari a 1:10 e a 1:5 per le seconde, il che significa che per avere lo stesso effetto è necessario somministrare un numero superiore (doppio) di AT MSC. Da sottolineare poi che la capacità immunomodulante delle UC MSC non è influenzata dalle condizioni di coltura, mentre nelle AT MSC risulta più marcata in FBS; probabilmente i fattori di crescita, inducendo la maturazione e predisponendo le cellule al differenziamento, compromettono le potenzialità immunomodulanti. Quando *in vitro* tra mesenchimali e linfociti si interpone una "barriera" che ne impedisce il contatto "fisico", non è apprezzabile alcun blocco significativo della proliferazione delle cellule T. Si può concludere che il contatto cellulare sia la condizione necessaria per attivare i meccanismi di immunosoppressione come la produzione di fattori solubili.

Se le AT MSC espanse nel cocktail meglio si prestano in medicina ricostruttiva, le UC MSC sono più indicate per le applicazioni in campo ematologico, come nella prevenzione/trattamento della GvHD, grave complicanza che insorge dopo trapianto

allogeneico di HSC somministrate in caso di leucemia. Nella cura di questa patologia, accanto ai trattamenti ormai consolidati, radio-chemioterapia e trapianto di HSC, negli ultimi anni sono scese in campo le terapie di ultima generazione rappresentate da preparazioni linfocitarie arricchite *ex vivo* di cellule CIK, caratterizzate dall'azione antitumorale in virtù delle loro proprietà citotossiche. UC MSC e CIK sono "farmaci" all'avanguardia nella terapia anticancro per i quali si pone il problema di possibili interazioni controproducenti. Lo studio del loro reciproco effetto ha infatti evidenziato che le UC MSC sopprimono le CIK in modo dose dipendente, fino all'89% quando sono in rapporto 1:1 e in contatto tra loro. La soppressione è aspecifica, non colpisce infatti una specifica sottopopolazione cellulare della preparazione. Inoltre, comporta una riduzione del potere citotossico-antitumorale anch'esso dose dipendente, apprezzabile quando i rapporti CIK: UC MSC sono pari a 1:1, 2:1 e 4:1. Da parte loro le CIK lisano le UC MSC, anche questo effetto è legato al rapporto CIK/mesenchimali e al tempo di contatto. Una spiegazione potrebbe risiedere nella bassa espressione sulle MSC di MHC I, un recettore che inibisce l'attivazione delle cellule NK citotossiche, la sua carenza potrebbe mantenere "aggressive" anche le CIK verso le MSC.

Questi risultati suggeriscono, in un contesto clinico, la somministrazione in due tempi dei due "farmaci": prima le UC MSC per supportare l'emopoiesi post trapianto e prevenire la GvHD, e poi le CIK per eliminare le cellule neoplastiche residue dopo radio-chemioterapia.

Da quanto detto possiamo concludere che:

- 1) una fonte non vale l'altra. MSC isolate da AT o UC hanno caratteristiche peculiari e differiscono per morfologia, capacità proliferativa, differenziativa e azione immunomodulante;
- 2) i cocktail definiti consentono l'ottenimento di popolazioni omogenee e in numero sufficiente per l'applicazione clinica delle AT e UC MSC. In medicina ricostruttiva potrebbero essere usate le mesenchimali isolate da AT, visto la capacità del cocktail di indurre il differenziamento adipogenico ed osteogenico. Le UC MSC, risultate più immunocompetenti delle MSC adulte, potrebbero rappresentare un'ottima risorsa in campo ematologico per la GvHD. Inoltre, l'utilizzo sequenziale di UC MSC e

cellule CIK consentirebbe di sfruttare le potenzialità terapeutiche dei due trattamenti.

## Ringraziamenti

Ringrazio la Fondazione Progetto Ematologia e il Dipartimento di Ematologia diretto dal Prof. Rodeghiero (Ospedale San Bortolo di Vicenza) che hanno reso possibile la realizzazione di questo studio.

Un sincero ringraziamento alla Dott.ssa Conconi per la sua disponibilità nel visionare la tesi e per i suoi preziosi suggerimenti per migliorarla.



Ringrazio la “tribù” del Laboratorio di Terapie Cellulari per i momenti di studio...e non solo!!...di questi ultimi tre anni:  
Dott. Madeo, Silvia, Ilaria S, Laura, Sofia, Simona, Eleonora, Ilaria G,  
Francesca, Giuditta, Giuliana, Manuela, Costantino, Elena C, Antonio, Elisabetta,  
Martina ed Elena A.



## Bibliografia

Aggarwal S, Pittenger M. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005. 105, 1815-1822.

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term amniotic membrane is high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Developmental Biology* 2007; 7:11.

Amado LC. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. 102: 11474-11479.

Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, Bambi F, Scali G, Castelli D, Rasini V, Soldati G, Moccetti T. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*. 2007, 5:55.

Augello A. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005. 35, 1482-1490.

Augello A. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(4): 1175-86.

Barsh D, Yao R, Tuan R. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007; 25:1384-1392.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002; 30(1):42-8.

Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22:625-634.

Battula VL , Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schede B, Just L, Skutella T, Buhning HJ. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 2007; 75: 279–291.

Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Kluter H. Human alternative of fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 2009.

Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology* 2006, 7:14 1471-2121.

Breithbach M. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007. 110: 1362-1369.

Bühring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for prospective isolation of human MSC. *Ann. New York Academy of Sciences*, 2007, 1106:262-271.

Campagnoli C, Roberts IAG, Kumarc S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 2001. Vol 98, N° 8, 2396-2402.

Cananzi M, Atala A, De Coppi P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Ethics, Bioscience and Life* 2009, Vol 4, n°1.

Cao C, Dong Y. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells. 2005; 19:642-647.

Chabannes D. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007. 110, 3691-3694.

Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Davis SG, Jiang L, Ramos JS, Sanberg PR, Zigova T, Willing AE. Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005; 23:1560-1570.

Chiou Michael, Yue Xu, Michael T. Longaker. Mitogenic and chondrogenic effects of Fibroblast Growth Factor-2 in adipose-derived Mesenchymal Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343 2006; 644–652.

Christ O, Lucke K, Leung K, Hamilton M, Eaves A, Smith C, Eaves C. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica* 2007; 92:1165-1172.

Conconi MT, Lora S, Menti AM, Carampin P, Parnigotto PP. In vitro evaluation of poly[bis(ethyl planato)phosphazene] as a scaffold for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006, 12(4): 811-9.

Conrad C, Gottgens B, Kinston B. GATA transcription in a small rhodamine 123(low) CD34+ subpopulation of a peripheral blood-derived CD34(-) CD105(+) mesenchymal cell line. *Exp. Hematol.* 2002; 30:887-895.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2006; 354. 1813-26.

Corcione A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006. 107, 367-372.

Dai Y. HIF-1 alpha induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2007. 42: 1036-1044.

Deng W. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSb mice. *DNA Cell Biol.* 2005; 24, 458-463.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174:101-109.

Di Nicola M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogeni stimuli. *Blood* 2002. 99; 35838-3843.

Djouad F. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102, 3837-3844.

Djouad F. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 2007. 25, 2025-2032.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, Vol.8, No. 4, 315-317.

Eliopoulos N. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005; 106, 4057-4065.

Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone marrow Transplantation* 1997, 20, 265-271.

Feurer M. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nature Med.* 2003. 9, 1151-1157.

Fielder J, Brill C, Blum W, Brenner R. IGF I and IGF II stimulate directed cell migration of bone marrow-derived human mesenchymal progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345 2006; 1177-1183.

Forte G., Minieri M., Cossa P., Antenucci D., Sala M., Gnocchi V., Fiaccamento R., Carotenuto F., De Vito P., Baldini P.M., Prat M., Di Nardo P. Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells* 2006; 24:23-33.

Franc S, Rousseau JC, Garrone R, van der Rest M, Moradi-Ameli M. Microfibrillar composition of umbilical cord matrix: characterization of fibrillin, collagen VI and intact collagen V. *Placenta* 1998, 19, 95-104.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22:649-658.

Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22:617-624.

Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007, Vol 109, No 4.

Gerdoni E. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in EAE. *Ann. Neurol.* 2007; 61(3): 219-27.

Goodwin HS, Bickness AR, Chien SN, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neuronal marker. *Biology of blood and marrow transplantation* 2001, 7:581-588.

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursor. *Blood* 1994, 84, 4164-4173.

Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STR-1-positive human bone marrow stromal precursor under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995; Vol. 85, N° 4: 929-940.

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

Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, Watzek G. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 2004; 15(1), 29-35.

Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, Pei X. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *International Journal of Hematology* 2003, 78:256-261.

Horwitz EM. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med.* 1999. 5: 309-313.

Horwitz EM. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001. 97: 1227-1231.

Horwitz EM. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2002. 99: 8932-8937.

Hui JH, Li L, Teo YH et al. Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng* 2005;11:904-912.

Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:845-853.

Jiang XX. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005. 105; 4120-4126.

Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Iranian biomedical journal* 2006, 10 (4): 175-184.

Kamihata H. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation* 2001. 104: 1046-1052.

Kang Y.J., Jeon E.S., Song H.Y., Woo J.S., Jung J.S., Kim Y.K., Kim J.H. Role of c-Jun N-terminal Kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2005; 95: 1135-1145.

Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007; 25:319-331.

- Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone marrow Transplantation* 2006, 37, 967-976.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24:1294-1301.
- Kocaoemer A, Kern S, Uter H, Bieback K. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma are suitable alternatives to Fetal Calf Serum for the expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cell* 2007; 25:1270-1278.
- Kogler G. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp. Hematol.* 2005. 33, 573-583.
- Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, Scarpa A, Dazzi F, Pizzolo G, and Vinante F. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow Mesenchymal Stem Cells: induced cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*, 2005; Vol.106, n° 1.
- Krampera M. Role for interferon- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006. 24, 386-398.
- Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galie M, Rigotti G, Mosna F, Tinelli M, Lovato L, Anghileri E, Andreini A, Pizzolo G, Sbarbati A, Bonetti B. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 2007; Vol 40, 382-390.
- Kratchmarova I, Blagoev B, Sorensen M, Kassen M, Mann M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005; Vol 308, 1472.
- Kuroda R. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage Res Soc.* 2007. 15: 226-231
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S. Circulating skeletal stem cells. *Journal Cell. Biol.* 2001; 153:1133-1140.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004, Vol 103, N°5, 1669-1675.
- Lee RH. Multipotent stromal cells from human bone marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103, 17438-17443.
- Li Y, Yu X, Lin S, Li X, Zhang S, Song Y. Insulin-like growth factor I enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356 2007; 780-784.
- Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, Horton WA, Moses HL and Spagnoli A. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the presence or absence of TGF- signalling. *Journal of Bone and Mineral research* 2006; Vol. 21, N°4.

Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91(8).

Mareschi K, Biasis E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; 86:1099-1100.

Masiero L, Gazzola MV, Destro R, Messina C, Piccoli M, Castello F, Zanon GF, Gamba PG, Zanesco L, De Coppi P. Biology and plasticity of BM- and UC blood-derived human CD 133+ stem cells: a promising source for clinical application. *Cytotherapy* 2006, 6, 75.

Mareschi K, Ferrefo I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006, 97: 744-754.

Meisel R. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004. 103, 4619-4621.

Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Easa KA, Hildreth T, Troyer D. Matrix cells from Wharton's jelly from neurons and glia. *Stem Cells* 2003; 21:50-60.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd E, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, and Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24:376-385.

Miura M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Dis.* 2006. 12: 514-522.

Morandi F. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class-I-restricted T cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cell* 2008. 26, 1275-1287.

Nauta AJ. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006; 108, 2114-2120.

Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Dechent W Functional expression of HGF and HGF-Receptor/c-met in adult human Mesenchymal Stem Cells suggests a rule in cell migration, tissue repair and wound healing. *Stem cells* 2004; 22:405-414.

Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmiopathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. PDGF, TGF  $\beta$  and FGF signalling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signalling pathways in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. *Blood* 2008. Vol 112, N° 2.

Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004, 22:377-384.

Park K, Lee Y, Kang K. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Journal of veterinary science* 2006, 7(4), 343-348.

- Perry A, Spees JL, Prockop DJ. Expanded human CD 133 cells from bone marrow differentiate into multiple cell phenotypes in culture and in immunodeficient mice. *Cytherapy* 2005, 7, 89.
- Prins HJ, Rozemuller H, Vonk-Griffioen S, Verweij VG, Dhert W, Slaper-Cortenbach I, Martens AC. Bone forming capacity of mesenchymal stromal cells when cultured in the presence of human platelet lysate as substitute for fetal bovine serum. *Tissue Eng.* 2009.
- Pugh CW. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Med.* 2003. 9: 677-684.
- Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 2002, 30, 783-791.
- Raffaghello L. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008. 26, 151-162.
- Ramasamy R. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007. 83, 71-76.
- Ren G. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008. 2, 141-150.
- Ringden O, Le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *APMIS* 2005; 113: 813-830.
- Ries C, Egea V, Karow M, Koeb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 2007; 109(9): 4055-63.
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21: 105-110.
- Sato K. Nitric oxide plays critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2006. 109, 228-234.
- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005; 23:220-229.
- Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25:818-827.
- Sessarego N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Moggi M, Raviolo V, Lituania M, Kunkl A, Ferlazzo G, Dagna Bricarelli F, Uccelli A, Frasson F. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica* 2008; 93(3).
- Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop D. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *Journal of bone and mineral research* 2004, Vol 19, No 2.
- Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt F, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005; 23:1357-1366.

Shi YY, Nacamuli RP, Salim A. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast. Reconstr. Surg.* 2005; 116:1686-1696.

Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Physiology* 2005; 203:398–409.

Sordi V. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005; 106, 419-427.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AP, Baxevas CN, Papamichail M. Interaction between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *STEM CELLS* 2006; 24:74-85.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari M, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interaction: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006. 107, 1484-1490.

Saggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. MSC inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008. Vol 111, n° 3.

Selmani Z. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and induce CD4 CD25 FOXP3 regulatory T cells. *Stem Cells* 2008. 26, 212-222.

Spees JL, Gregory CA, Singh H et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 2004; 9:747–756.

Standal T, Ablidgaard N, Fagerli U, Stordal B, Hjetner O, Borset M, Sundan A. HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma. *Blood* 2007; Vol. 109, N° 7.

Storms RW, Trujillo AP, Springer JB et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9118 –9123.

Storms RW, Green PD, Safford KM et al. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood* 2005; 106:95–102.

Studený M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- $\beta$  delivery into tumors. *Cancer Res.* 2002; 62, 3603-3608.

Tamana K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal Growth Factor as a candidate for ex vivo expansion of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2006; 24:686–695.

Tatsumi K, Otami H, Sato D, Enoki C, Iwasaka T, Imamura H, Taniuchi S, Kaneko K, Adachi Y, Ikehara S. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circulation Journal* 2008; Vol. 72: 1351-1358.

Thomas T, Gori F, Spelberg TC, Khosla S, Riggs B, Conover CA. Response of Biopotential Human Marrow Stromal Cells to Insulin-Like Growth Factors: effect on binding protein

production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 1999; Vol 140, N° 11.

Togel F. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005; 289, F31-F42.

Toma C. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002. 105: 93-98.

Tondreau T, Meuleman N, Delforge N. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct-4 expression and plasticity. *Stem Cells* 2005; 23:1105-1112.

Traggiai E. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells* 2008. 26, 562-569.

Troyer DL, Weiss ML. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2007.

Urbanek K. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor system that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ. Res.* 2005. 97: 663-673.

Valina C. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2007. 28: 2667-2677.

Van Laar JM, Tyndall A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune disease. *Rheumatology* 2006; 45, 1187-1193.

Xu M. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol. Cell Cardiol.* 2007. 42: 441-448.

Wagner W, Roderburg C, Ho AD. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2007; 25: 2638-2647.

Wakitani S. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: these case report involving nine defects in five knees. *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 2007. 1: 74-79.

Wexler SH, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology* 2003, 121, 368-374.

Yanez R, Lamana ML, Castro JG, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24:2582-2591.

Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 2005; 23:3-9.

Zaky SH, Ottonello A, Strada P, Cancedda R, Mastrogiacomo M. Platelet lysate favours in vitro expansion of human bone marrow stromal cells for bone and cartilage engineering. *Journal Tissue Eng. Regen. Med.* 2008; 2(8):472-81.

Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, LeBoff MS, Glowacki J. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging cell.* 2008; 7(3): 335-343.

Zimmermann S. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 2003; 17, 1146-1149.

Zvaifler NJ, Mutachieva LM, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000, 2:477-488.