

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE
CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI

XXXIII Ciclo
(Anni 2018-2021)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

**EFFETTI DEI DERIVATI PIASTRINICI SULLA MOTILITÀ DELLE
CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI.
RUOLO DELLE ACQUAPORINE.**

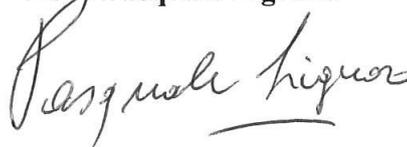
TUTOR/RELATORE

Chiar.mo
Prof. Pietro Formisano



CANDIDATO

Dott. Pasquale Liguoro



INDICE

Introduzione

1 Cellule staminali

1.1 Cellule staminali mesenchimali

1.2 Caratteristiche delle cellule staminali in vitro

1.3 Concentrato piastrinico (PRP)

1.4 Metodiche di preparazione

1.5 Produzione di gel piastrinico.

1.6 Meccanismo d'azione del PRP.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Isolamento e crescita delle cellule staminali mesenchimali ottenute da cane

2.2 Analisi tramite citometria a flusso

2.3 Preparazione del plasma ricco di piastrine umane (PRP)

2.4 Test di vitalità

2.5 Saggio di migrazione

2.6 Procedura immunoblot

2.7 Isolamento dell'RNA e PCR quantitativa in tempo reale (q-RT-PCR)

2.8 Analisi statistica

3 RISULTATI

3.1 Isolamento e caratterizzazione delle MSC

3.2 Il PRP umano promuove la vitalità e la migrazione di c-MSC

3.3 Gli AQP sono coinvolti nella migrazione c-MSC

4 CONCLUSIONI

5 BIBLIOGRAFIA

Introduzione

L'applicazione del Plasma ricco in piastrine umano (hPRP) nella rigenerazione dei tessuti è stata ampiamente descritta, come capacità delle piastrine di rilasciare un'elevata concentrazione di proteine coinvolte nel processo di guarigione delle ferite (Cabaro et al., 2018). Recenti evidenze hanno evidenziato la capacità dell'hPRP di aumentare la crescita e la motilità delle cellule staminali mesenchimali sottocutanee (D'Esposito et al., 2015). Tuttavia, molti aspetti dell'azione dell'hPRP sulla crescita, la migrazione e la riparazione dei tessuti delle MSC non sono stati ancora compresi.

Recenti evidenze hanno suggerito un ruolo cruciale per i canali d'acqua delle acquaporine (AQP) nella regolazione e nel supporto della migrazione cellulare. Evidenze sperimentali indicano anche che AQP5 svolge un ruolo importante nella migrazione delle cellule di cancro al seno umano (Hyun Jun Jung et al., 2011) e in "Non Small Cancel Lung Cell"

(NSCLC) (Elkhider A et al., 2020). E' stato dimostrato, inoltre, che AQP1 è coinvolto nella migrazione delle cellule endoteliali indotta da Epo (Maltaner RE. Et al., 2020). Tuttavia, la correlazione tra l'espressione cellulare degli AQP e la capacità di migrazione delle MSC non è stata ancora studiata

1.1 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Le cellule staminali adulte (Adult Stem Cells, ASCs) sono cellule staminali multipotenti residenti in specifici compartimenti tissutali, in grado di rinnovarsi e di differenziare in specifici tipi cellulari. Possiedono la capacità di mantenere l'omeostasi cellulare dei tessuti di origine, sia in condizioni fisiologiche che patologiche e sono fondamentali per il normale turnover cellulare. L'attività proliferativa può presentare variazioni quantitative da tessuto a tessuto: in tessuti a rapido rinnovamento (come le cellule ematopoietiche e gli epitelii) è più intensa, mentre in altri tessuti più stabili (osso, muscolo) essa è meno frequente e spesso legata a fenomeni di riparazione o rigenerazione post-traumatica (Weissman et al., 2001). Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSC) sono cellule staminali adulte multipotenti presenti a livello del tessuto osseo e che sono capaci di autorinnovarsi e differenziarsi in cellule specializzate del lineage mesenchimale (Fig1) come osteoblasti, condroblasti e adipociti

(DiMarino et al., 2013). Le MSC svolgono inoltre un importante ruolo come cellule di supporto della nicchia ematopoietica. Infatti, garantiscono un supporto meccanico e trofico al sistema cellulare ematopoietico secernendo proteine della matrice extracellulare come fibronectina, laminina, collagene e proteoglicani e producendo fattori di crescita ematopoietici tra cui chemochine e citochine (Devine and Hoffman 2000). Le MSC regolano il self-renewal, l'homing, la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC). Il fabbisogno delle MSC cambia drammaticamente in dipendenza di fattori come l'età dell'individuo (Caplan, 2004). Dalla nascita al decimo anno di età, l'aumento delle dimensioni delle diverse parti del corpo coinvolge la diretta conversione delle MSC in fenotipi differenziati. A differenza delle HSC, che mantengono dei titoli ed una potenza relativamente costanti dalla nascita alla tarda età, la quantità di MSC diminuisce di uno o due ordini di grandezza nel corso della vita dell'individuo, sottolineando così la diversa definizione e biologia funzionale delle MSC rispetto alle HSC (Bonyadi et al., 2003). Infatti, le MSC vengono mobilizzate dal midollo osseo in caso di danno tissutale, al fine di garantire la rigenerazione dei tessuti lesi; le HSC invece vengono continuamente mobilizzate dal midollo osseo in condizioni fisiologiche per rinnovare il pool di cellule

ematiche circolanti.

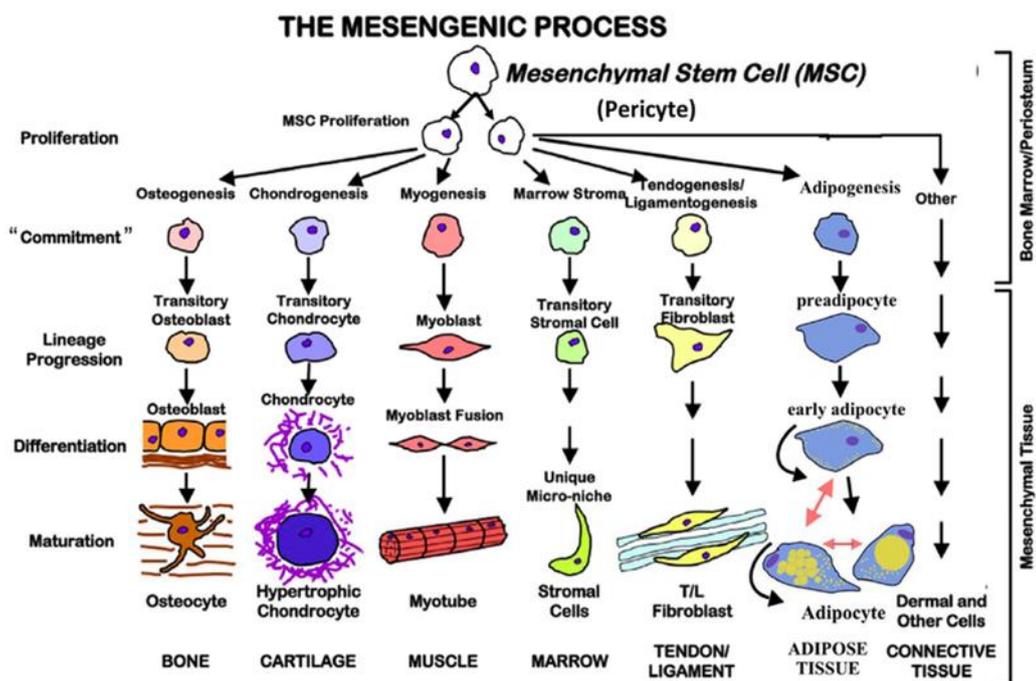


Figura 1: Il processo mesengenico contribuisce all'entrata delle cellule mesenchimali progenitrici in distinti lineage pathways (DiMarino et al., 2013)

Caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali in vitro.

Le cellule staminali mesenchimali sono contenute all'interno dello stroma midollare. Uno dei problemi che si incontrano nell'utilizzo in campo clinico di queste cellule è la loro scarsa presenza nel midollo (0.001%-0.01%) (Tondreau et al., 2005). Quindi, per poter essere utilizzate in alcune applicazioni cliniche, devono essere prelevate ed espanse in vitro per raggiungere un numero rilevante. Le MSC sono caratterizzate da una morfologia simil-fibroblastica, con un aspetto fusiforme ed un grosso nucleo tondeggiante. Le MSC possono essere caratterizzate sulla base dell'espressione di marker di superficie, ma non sono stati ancora identificati uno o più marker che in maniera univoca definiscano le MSC.

Per questo motivo, recentemente sono stati stabiliti da un'apposita commissione internazionale tre criteri ai quali le cellule devono rispondere per essere definite MSC (Dominici et al., 2006): 1. in condizioni standard di coltura, devono aderire alla plastica assumendo una morfologia simil-fibroblastica e devono essere dotate di un'estesa capacità proliferativa; 2. in opportune condizioni di coltura, le MSC devono essere in grado di differenziare nei lineage mesengenicici ovvero in osteoblasti, condroblasti ed adipociti; 3. le MSC devono essere negative per i marker delle staminali ematopoietiche CD11b,

CD33, CD34, CD45, CD133 e positive per CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD166. Con i successivi passaggi in vitro e a lungo termine, le cellule subiscono un arresto della crescita associato alla senescenza, noto come “senescenza replicativa” (Baxter et al., 2004). La senescenza replicativa è una caratteristica delle MSC coltivate in vitro, che limita la loro capacità di generare un ampio numero di cellule richieste per la terapia. Tale processo è legato a diversi fattori, tra cui il progressivo accorciamento dei telomeri durante continue subculture in vitro (Baxter et al., 2004), o l’assenza di attività telomerasica (Zimmermann et al., 2003). Non è ancora chiaro se l’assenza di attività telomerasica in cellule staminali mesenchimali dipenda dalla natura delle cellule stesse, dalle condizioni di coltura o dal metodo di isolamento (Jiang et al., 2002).

1.3 CONCENTRATO PIASTRINICO (PRP)

Il concentrato piastrinico o plasma arricchito di piastrine (PRP, Platelet Rich Plasma) è un prodotto ricavato dal sangue che si presenta come un concentrato autologo di piastrine sospese in un piccolo volume di plasma ed è pertanto considerato un emocomponente, secondo quanto definito dalla vigente normativa in materia (Marx, 2004; Sutter, 2004; Everts, 2007; Nixon, 2008; Maia, 2009). Il PRP, per essere definito tale, deve essere di origine autologa; in caso contrario la presenza di membrane cellulari di prodotti omologhi,

che fungerebbero da elementi antigenici, potrebbero scatenare una reazione immunitaria (Marx, 2004; Everts, 2007).

Le piastrine svolgono un ruolo fondamentale nell'emostasi e possiedono inoltre proprietà pro-infiammatorie, regolatrici e rigenerative mediate dall'interazione con alcune cellule (es. neutrofili, cellule endoteliali) e dalla liberazione di fattori di crescita (GFs), chemochine e altre molecole regolatrici (Chaer, 2006; Everts, 2007). Per questo motivo il PRP contiene numerose molecole che rivestono un ruolo fondamentale nel processo di riparazione dei tessuti; alcune di queste molecole sono fattori contenuti negli alfa granuli delle piastrine, altri invece sono proteine del sangue, come la fibrina, o della matrice extracellulare, come la fibronectina e la vitronectina (Everts, 2007; Nixon, 2008; Maia, 2009).

Numerosi studi sperimentali e clinici (Anitua, 2005; Carmona, 2006; Everts, 2007; Marx, 2004), realizzati in questi anni sia in medicina umana sia in medicina veterinaria, hanno permesso di investigare in modo approfondito l'efficacia del concentrato piastrinico e la possibilità di utilizzarlo routinariamente come supporto terapeutico per diverse patologie. Il vantaggio dell'impiego del PRP potrebbe essere dovuto alla concentrazione sopra-fisiologica di fattori di crescita che pare sia in grado di incrementare la velocità di riparazione delle ferite, di ridurre l'infiammazione associata al trauma e di ridurre al minimo

la produzione di tessuto cicatriziale.

1.4 Metodiche di preparazione.

Durante la fase infiammatoria la piastrina agisce su diversi fronti: ad esempio ha effetto antimicrobico,

d'induzione della cascata della coagulazione e di retrazione del coagulo, rilascia fattori di crescita e citochine. La secrezione di fattori di crescita è stimolata dalla cascata della coagulazione, pertanto il PRP deve essere ottenuto da sangue trattato con anticoagulante, in modo che le piastrine rimangano vitali un tempo sufficiente a consentire il trattamento.

Generalmente il trattamento con anticoagulante garantisce un mantenimento del PRP per circa otto ore, ma è comunque consigliabile effettuare il trattamento quanto prima (Marx, 2004). La preparazione del PRP deve avvenire in modo da separare efficacemente le piastrine dagli eritrociti e concentrarle senza danneggiare le piastrine stesse. Il metodo scelto è importante poiché i fattori di crescita contenuti all'interno degli alfa granuli si attivano nel momento in cui i granuli stessi si fondono con la membrana piastrinica (Marx, 2004; Everts, 2007). Questa fusione si può verificare anche nel caso in cui le piastrine vengano danneggiate durante la produzione del PRP. Applicando particolari trattamenti al sangue periferico è possibile ricavare diversi prodotti: PRP puro, PRP ricco di leucociti, PRP povero di leucociti ma ricco di fibrina, PRP ricco di leucociti e di fibrina (Dohan,

2009). Questi sistemi sono stati sviluppati in medicina umana e ciascuno presenta i propri vantaggi e svantaggi; pertanto non è ancora stato sviluppato un metodo ottimale per ottenere PRP da pazienti umani. È stato dimostrato che per la produzione di PRP in veterinaria ci si può avvalere degli stessi sistemi impiegati in umana senza modificare sostanzialmente i protocolli (Sutter, 2004; Carmona, 2006).

I sistemi manuali.

Attualmente i sistemi manuali comprendono il metodo dell'aferesi, il metodo del buffy coat e il "tube method". Il metodo dell'aferesi permette di ottenere, con l'ausilio di un'apposita macchina, una specifica componente del sangue. Generalmente è necessario un volume di sangue maggiore rispetto alle altre tecniche (circa 450ml). È molto efficace nel concentrare piastrine e fattori di crescita, presenta un bassissimo rischio di contaminazione batterica del prodotto (Sutter, 2004; Carmona, 2006) e l'unico svantaggio risiede nel fatto che sono richiesti operatori esperti e l'impiego di una tecnologia avanzata; pertanto, non è applicabile in ambito ambulatoriale. L'apparecchiatura impiegata immette il sangue in un circuito sterile e, mediante centrifugazione e filtrazione separa il plasma e le piastrine dagli altri emocomponenti. Le piastrine a questo punto vengono concentrate tramite un processo discontinuo di centrifugazione che consente il ricircolo del sangue in

modo da aumentare l'efficienza di raccolta di piastrine. Dopo l'aferesi è possibile filtrare le piastrine per ottenere una concentrazione ancora maggiore (Sutter,2004).

Il metodo del "buffy coat" consente mediante centrifugazione, la separazione del sangue in tre fasi (plasma povero, buffy coat ed eritrociti) e un'ottima concentrazione delle piastrine e dei leucociti.

In commercio sono reperibili kit monouso che permettono di ottenere il PRP in modo semplice e veloce; pertanto, sono adatti a un impiego ambulatoriale ma sono ancora molto costosi (Sutter, 2004; Carmona, 2006; Dohan, 2009). Inoltre presentano un rischio di contaminazione batterica maggiore, ma comunque limitato, rispetto a quello dell'aferesi (Sutter, 2004).

Il "tube method" manuale prevede la raccolta del sangue in apposite provette contenenti anticoagulante e la sua centrifugazione. Il sangue viene processato con diverse centrifugazioni a diverse velocità per ottenere la separazione degli emocomponenti. È una tecnica semplice ed economica, ma richiede il rispetto di una stretta asepsi per evitare le contaminazioni batteriche del prodotto.

La scelta della metodica per la preparazione del PRP dipende dalla capacità della tecnica di concentrare le piastrine e i singoli fattori di crescita; sono disponibili in commercio appositi kit ELISA (Quantikine, R&D System, Minneapolis USA) che consentono di dosare i singoli GFs (Everts,2006). In uno studio eseguito da Sutter nel 2004, il metodo

dell'afèresi e del buffy coat sono descritti come sistemi validi in egual misura per ottenere la concentrazione di piastrine e GFs utilizzando campioni di sangue intero equino. Il tube method consente la concentrazione di un minor numero di piastrine e fattori di crescita, rispetto al buffy coat e all'afèresi, ma anche di un minor numero di leucociti (Carmona, 2006; Dohan, 2009).

I sistemi semi-automatizzati.

In commercio sono disponibili numerosi sistemi semiautomatizzati per concentrare le piastrine e, normalmente, sono composti di un sistema di centrifugazione e di kit monouso.

Sono di norma più rapidi e pratici di quelli manuali. I diversi dispositivi di centrifugazione utilizzano la forza centrifuga e una tecnica di elutriazione contro corrente (consente di purificare una sostanza mediante aggiunta di un solvente alla soluzione iniziale che in seguito viene travasata per separare il prodotto desiderato dalle sostanze indesiderate non disciolte) oppure un sistema di separazione basato sul peso specifico. I primi sono dispositivi monouso e di conseguenza molto costosi. L'utilizzo del sistema di separazione basato sul peso specifico è molto diffuso anche nella pratica veterinaria. Questa tecnica mantiene la massa eritrocitaria durante la decantazione del plasma e del buffy coat poi, grazie alla centrifugazione, il PRP si concentra tra il plasma povero di piastrine sovrastante e il buffy coat leucocitario (Nixon, 2008). Solitamente i diversi dispositivi

disponibili in commercio permettono di ottenere dei PRP con concentrazioni piastriniche variabili da due a sei volte rispetto ai normali valori ematici. Tuttavia, poiché le piastrine sono suscettibili a ogni tipo di evento stressante, durante la fase di lavorazione e applicazione del PRP anche la concentrazione dei GFs può essere influenzata dalla manipolazione. Pertanto, sarebbe importante valutare non solo la capacità di concentrare la popolazione piastrinica nel prodotto finale, ma anche l'effettiva concentrazione dei singoli fattori crescita, per verificare che siano presenti in numero sufficiente a ottenere l'effetto terapeutico desiderato.

1.5 Produzione di gel piastrinico.

Addizionando trombina al concentrato piastrinico è possibile gelificare il composto: il prodotto che ne deriva ha una residua capacità adesiva, dovuta in gran parte ai livelli elevati di fibrinogeno (Nixon, 2008). Per evitare reazioni anticorpali legate all'utilizzo della trombina bovina, si utilizzano di norma metodi alternativi per ottenere gel piastrinico, come la trombina bovina sottoposta ad ulteriore purificazione, la trombina umana ricombinante, la trombina autologa o altre sostanze come il cloruro di calcio (Everts, 2007). Una volta ottenuto il gel può essere posizionato direttamente sulla lesione e fungere come supporto per l'applicazione di ulteriori medicinali (Everts, 2007). Il prodotto può essere aliquotato e congelato a meno 40° C per utilizzarlo in diverse applicazioni nel tempo. Il gel piastrinico

viene utilizzato anche in campo veterinario sottoforma di spray superficiale nelle ferite o nella riparazione della cartilagine, in modo da sfruttare le sue caratteristiche di autoaderenza e malleabilità (Nixon, 2008). Per il trattamento di lesioni tenodesmiche invece si preferisce utilizzare il concentrato piastrinico in forma liquida: il PRP viene infatti attivato dal contatto con il collagene e da altri fattori di attivazione apportati dalle piastrine presenti nel coagulo fisiologico (Nixon, 2008).

1.6 Meccanismo d'azione del PRP.

Il concentrato piastrinico, oltre ad essere fonte di GFs, mima lo stadio finale della cascata coagulativa: infatti, in presenza di trombina, è in grado di convertire il fibrinogeno in fibrina e stimolare ulteriormente l'aggregazione piastrinica (Nixon, 2008). In realtà non è corretto sostenere che in assoluto maggiori sono le concentrazioni di fattori di crescita nel PRP maggiore sarà l'efficacia del trattamento: per esercitare la loro funzione, i fattori di crescita devono legarsi a dei recettori target e, se questi sono già saturi, un incremento della quantità di GFs non darebbe alcun beneficio (Chaer, 2006). Nel corso di un trattamento con PRP è molto importante evitare di somministrare farmaci antinfiammatori ai pazienti, poiché l'azione di tali farmaci inibisce quella delle COX responsabili della sintesi di prostaglandine (PGs) e interferisce con il funzionamento piastrinico (Chaer, 2006). La concentrazione minima necessaria affinché un PRP possa esercitare un efficace effetto

terapeutico a livello tissutale è di 300x10 alla terza piastrine per microlitro (Maia, 2009). Il

PRP è un prodotto autologo, per cui è esente da rischi di trasmissione di malattie veicolate

dal sangue; inoltre ha un ph di 6.5-6.7 rispetto ad un ph di 7-7.2 di un coagulo maturo,

perciò potrebbe inibire la crescita batterica. Nonostante ciò, è di fondamentale importanza

rispettare i principi di sterilità durante la fase di preparazione e somministrazione del concentrato piastrinico (Marx, 2004; Nixon, 2008).

In conclusione, l'impiego di PRP presenta alcuni vantaggi che sono dati dalla sua natura autologa, dall'elevata concentrazione di fattori di crescita, dalla sicurezza del preparato, dal basso costo, dall'attrezzatura pratica e poco ingombrante e dalla facilità di preparazione e

applicazione. Lo svantaggio principale è costituito dalla scarsa ripetibilità del prodotto

ottenuto per quanto riguarda il contenuto in piastrine e leucociti (Marx, 2004; Nixon, 2008).

Utilizzo terapeutico del PRP.

L'utilizzo del concentrato piastrinico a scopo terapeutico rappresenta una tecnologia

relativamente nuova nel campo della medicina rigenerativa: il concetto che sta alla base

dell'uso clinico del concentrato piastrinico è basato sulla capacità delle piastrine di

rilasciare i fattori di crescita (peptidi che promuovono la proliferazione e la differenziazione

cellulare, la chemotassi e la migrazione di varie cellule coinvolte nei meccanismi di

guarigione tissutale). Attualmente, nell'uomo, il PRP viene impiegato con successo in

odontoiatria (Rodzman, 2007), chirurgia dei tessuti duri e molli (inclusa chirurgia

maxillofacciale, cardiovascolare e plastica), in ortopedia e per il trattamento delle ferite,

soprattutto piaghe da decubito (Max, 2004). Il PRP viene impiegato sempre con maggior frequenza e efficacia per il trattamento di molte patologie muscolo-scheletriche, sia acute che croniche: tendinopatie, tendinosi, strappi e fibrosi muscolare, stiramenti legamentosi, lassità di capsula articolare, artrite, artrofibrosi, difetti della cartilagine articolare, lesione ai menischi, sinoviti croniche e flogosi articolare. Oltre al beneficio apportato ai meccanismi di guarigione il PRP sembra anche avere le capacità di alleviare il dolore muscolo scheletrico, permettendo una precoce ripresa dell'attività fisica. Si suppone che quest'effetto sia apportato, almeno in parte, dalla serotonina presente nei granuli densi piastrinici (Everts, 2008). È stato notato inoltre che l'uso del concentrato piastrinico elimina la necessità di drenaggi e di bendaggi compressivi ed elastici al termine dell'operazione. Il PRP infine è anche usato nella riparazione retinica in pazienti con fori maculari idiopatici dato che aumenta la proliferazione cellulare durante la guarigione di lesioni retiniche (Korobelnik, 1966).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Isolamento e crescita delle cellule staminali mesenchimali ottenute da cane

La biopsia del tessuto adiposo sottocutaneo è stata ottenuta da una femmina bretona di taglia media di due anni sottoposta a isterectomia. La procedura è stata approvata dal Centro Servizi Veterinari dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Il campione di

tessuto adiposo è stato sottoposto a taglio meccanico e digerito enzimaticamente con una soluzione di collagenasi (1 mg / ml forma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37 ° C per 1 ora. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) contenute nella frazione vascolare stromale sono state ottenute dopo centrifugazione a 1.200 g per 5 min e piastrate in DMEM (mezzo di Eagle modificato da Dulbecco) -F12 (1:1) addizionato di 10% di siero bovino fetale (FBS) ed integrato con glutamina 2-mM, 100 unità / ml di penicillina e 100 unità / ml di streptomicina (Lonza Group Ltd, Basilea, Svizzera). Per valutare la crescita delle MSC (c-MSC), 1,5x10⁴ cellule sono state seminate in piastre di coltura da 12 pozzetti e contate dopo 24, 48 e 72 ore. Le cellule sono state contate con il contatore di cellule automatizzato TC10TM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) secondo il protocollo del produttore. La differenziazione adipogenica e osteogenica è stata eseguita come descritto in precedenza (D'Esposito et al 2020). La presenza di accumulo di lipidi è stata valutata con la colorazione Oil Red O (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), mentre la presenza di focolai di mineralizzazione è stata dimostrata dalla colorazione con Alizarin Red S (ARS) (Sigma-Aldrich, St.Louis , MO, USA). Le cellule differenziate sono state fotografate dal sistema di fotocamere digitali del microscopio Olympus DP20 (Olympus Corporation, Tokyo, Giappone).

2.2 Analisi tramite citometria a flusso

È stata condotta un'analisi citofluorimetrica per analizzare l'espressione dei marcatori delle cellule staminali mesenchimali sulle c-MSC. 2×10^5 cellule sono state incubate con anti CD-90 coniugato con FITC, anti CD-44 coniugato con PE e anti CD-45 coniugato con APC-Cy7 (tutti da BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e colorante / isotipo anticorpi abbinati in ambiente buio per 30 min a 4 C. Tutti i campioni sono stati elaborati da BD LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e analizzati con BD FACS Diva Software. 104 eventi per ogni campione sono stati acquisiti in tutte le analisi.

2.3 Preparazione del plasma ricco di piastrine umane (PRP)

Il plasma umano ricco di piastrine (hPRP) è stato ottenuto dal plasma di donatori di sangue sani, come descritto in precedenza (D'Esposito et al 2020) e conservato a -20 C. Per le preparazioni di gel piastrinico, i campioni di PRP sono stati incubati con gluconato di calcio (Galenica Senese - 10 mg / ml di concentrazione finale) per 1 ora a 37 ° C per consentire la formazione di coaguli (D'Esposito et al 2015). I terreni condizionati sono stati ottenuti incubando il gel hPRP per 48 ore con DMEM -F12 senza siero (1: 1) addizionato di 0,25% di albumina di siero bovino (BSA) (10% vol / vol in DMEM F12-BSA). Dopo l'incubazione, il terreno è stato raccolto e centrifugato a 14.000 g per rimuovere i detriti

cellulari e applicato su c-MSC.

2.4 Test di vitalità

5x10³ c-MSC sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in un terreno completo. Il

giorno seguente, le cellule sono state incubate in DMEM F12 (1:1) senza siero ed

addizionato di 0,25% BSA per 16 ore e incubate con mezzo condizionato da hPRP per 48 ore. La vitalità cellulare è stata valutata mediante il dosaggio della sulforodamina B

(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), come descritto in precedenza (Ambrosio et al 2017).

2.5 Saggio di migrazione

La migrazione cellulare è stata eseguita utilizzando membrane in policarbonato con pori

da 8 µm (Costar, Cambridge, MA, USA). 5x10⁴ c-MSC sono stati caricati nella camera

superiore del sistema transwell e il gel PRP è stato aggiunto alla camera inferiore in

DMEM F12 (1: 1) 0,25% BSA (10% vol / vol in DMEM F12-BSA), con o senza 100uM

cloruro di tetraetilammonio (TEAC-Sigma T2265, Saint Louis, USA). Le cellule sono state

lasciate migrare nella camera inferiore a 37 ° C in un'atmosfera di CO₂ al 5% satura di

H₂O per 48 ore. Alla fine dell'incubazione, le cellule che erano migrate nella parte inferiore

del filtro sono state fissate con glutaraldeide all'11% (G6257-1L, Sigma-Aldrich) per 15

minuti a temperatura ambiente, lavate tre volte con soluzione salina tamponata con fosfato

(PBS), e colorate con 0,1% di cristal violetto (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) -20% di

metanolo per 20 min a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi con PBS e completa essiccazione a temperatura ambiente, il cristal violetto è stato solubilizzato immergendo i filtri in citrato di sodio 0,1 M. La concentrazione del cristal violetto solubilizzato è stata valutata come assorbanza a 540 nm al GloMax® Discover Microplate Reader (Promega Corporation Madison, USA).

2.6 Procedura immunoblot

Per ottenere lisati proteici, le c-MSC sono state raccolte in tampone di lisi JS (HEPES 0,5M, MgCl 1M, NaCl 3M, EGTA 0,2M, 10% TRITON, 10% glicerolo) e centrifugate a 14.000 rpm per 30 min. La quantificazione delle proteine è stata determinata allo spettrofotometro Beckman Coulter (DU®530, Life Science UV / VIS) utilizzando il test Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye # 5000006). I lisati cellulari 20ug sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS e trasferiti sulle membrane Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, USA). Le membrane sono state bloccate per 1 ora in TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e NaCl 140 mM) contenente il 3% (p / v) di BSA e quindi incubate con i seguenti anticorpi: anti-AQP1 (ab15080, coniglio policlonale, Abcam) , anti-AQP5 (STJ111968, policlonale di coniglio, St John's Laboratory), Anti-p-ERK1 / 2 (# 9101, policlonale di coniglio, segnalazione cellulare), anti-p-AKT S473 (sc-7985-R, policlonale di

coniglio, SantaCruz), anti-p-FAK S910 (sc-16666, goat polyclonal, SantaCruz), anti-Vinculin (sc-73614, mouse monoclonal, SantaCruz). Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati: anti-coniglio (170-6515, Bio-Rad), anti-topo (170-6516, Bio-Rad), anti-capra (sc-2020, SantaCruz). I complessi antigene-anticorpo sono stati dimostrati mediante un kit di rilevamento chemiluminescente potenziato (LiteAblot®PLUS, EuroClone SpA, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore.

2.7 Isolamento dell'RNA e PCR quantitativa in tempo reale (q-RT-PCR)

L'RNA totale è stato isolato utilizzando la soluzione TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore. 500ug di RNA da ciascun campione sono state trascritte inversamente con SuperScript II Reverse Transcriptase con primer oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La PCR quantitativa in tempo reale è stata eseguita con iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA, USA). Le reazioni sono state eseguite utilizzando Platinum SYBR Green Quantitative PCR Super-UDG utilizzando un iCycler IQ multicolore Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). Tutte le reazioni sono state eseguite in duplicato e come riferimento interno è stata utilizzata la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Le sequenze di primer per i cani DLA12, DLA64 e GAPDH erano: DLA12 CAACCTCTGTGTCCTGGGTC in avanti e TACCTGGAGATGGGGAAGGA inverso; DLA64 avanti TGGCGGGTCAGGTAGATTTT e

retromarcia GATTACCTGGCCCTGGACG; GAPDH avanti ACAGTCAAGGCTGAGAACGG
e retromarcia CCACAACATACTCAGCACCCAGC. I cambi di piega sono stati calcolati con
la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.8 Analisi statistica.

Le analisi statistiche sono state eseguite con il software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). I risultati sono presentati come media \pm deviazione standard (SD). Per i confronti tra 2 gruppi, è stato utilizzato un test t a due code per campioni indipendenti. Confronti multipli tra tre gruppi sono stati effettuati utilizzando il test ANOVA con correzione di Tukey. un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3. Risultati

3.1 Isolamento e caratterizzazione delle MSC

Le MSC (c-MSC) sono state isolate dal tessuto adiposo sottocutaneo, piastrate e coltivate in condizioni di coltura, come descritto in Materiali e metodi. Si formava un monostrato di cellule di forma simile ai fibroblasti (Fig. 2A) e si verificava un aumento del numero di cellule di circa il 30% ogni 24 ore (Fig. 2B). Inoltre, le cellule sono state analizzate al FACS e risultate colorate positivamente per gli antigeni di superficie delle cellule progenitrici mesenchimali CD90 e CD44 e negativamente per il marker ematopoietico CD45 (Fig. 2C).

Inoltre, le c-MSC, in presenza di stimoli specifici, hanno mostrato capacità di differenziarsi sia negli adipociti che nelle cellule simil-osteoblastiche (dati non mostrati).

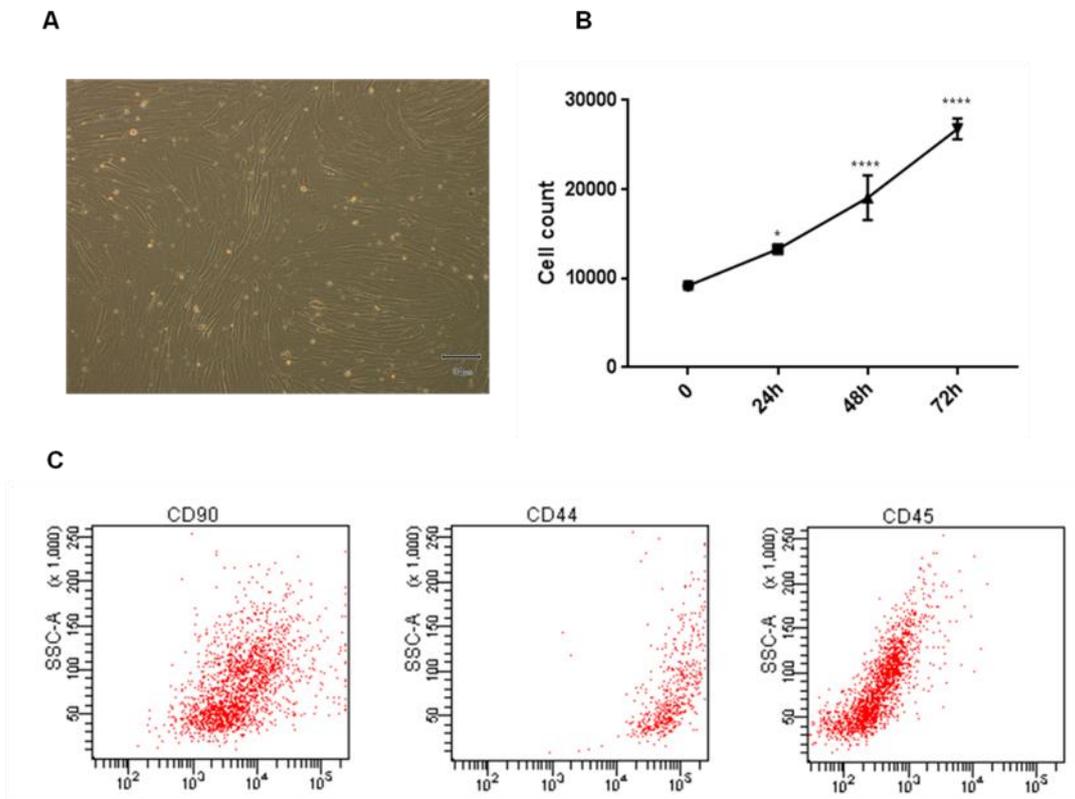


Figura 2: Isolamento e crescita di cellule staminali mesenchimali canine. A) Le c-MSC sono state isolate dal tessuto adiposo sottocutaneo di un cane femmina. B) Curva di crescita. c-MSC coltivate in DMEM-F12 20% FBS sono state contate a 24 ore, 48 ore e 72 ore. C) caratterizzazione delle c-MSC mediante citofluorimetro a flusso per CD90, CD44 e CD45. I dati ottenuti rappresentano la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata calcolata dal test Anova a una via, gli asterischi si riferiscono alla significatività statistica rispetto al punto zero (* $p < 0,05$, **** $p \leq 0,0001$).

3.2 Il PRP umano promuove la vitalità e la migrazione di c-MSC.

Sono stati studiati gli effetti dei fattori rilasciati da hPRP sulle c-MSC. In primo luogo, ci

siamo chiesti se hPRP potesse portare a reazioni immunitarie interspecie nelle c-MSC. A

questo scopo, abbiamo analizzato l'espressione della classe primaria dei geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC-I), DLA12 e DLA64 mediante PCR in tempo reale in c-MSK trattate con terreno condizionato hPRP al 10% per 48 ore. Le cellule non hanno mostrato un aumento dell'espressione di DLA12 e DLA64 rispetto alle cellule coltivate in mezzo privo di siero (0,25% BSA) o in condizioni di crescita standard (20% FBS), suggerendo l'assenza di reazioni immunoreattive indotte da hPRP (Fig.3). Quindi, hPRP aumenta la crescita e la motilità delle MSC umane (D'Esposito et al., 2015).

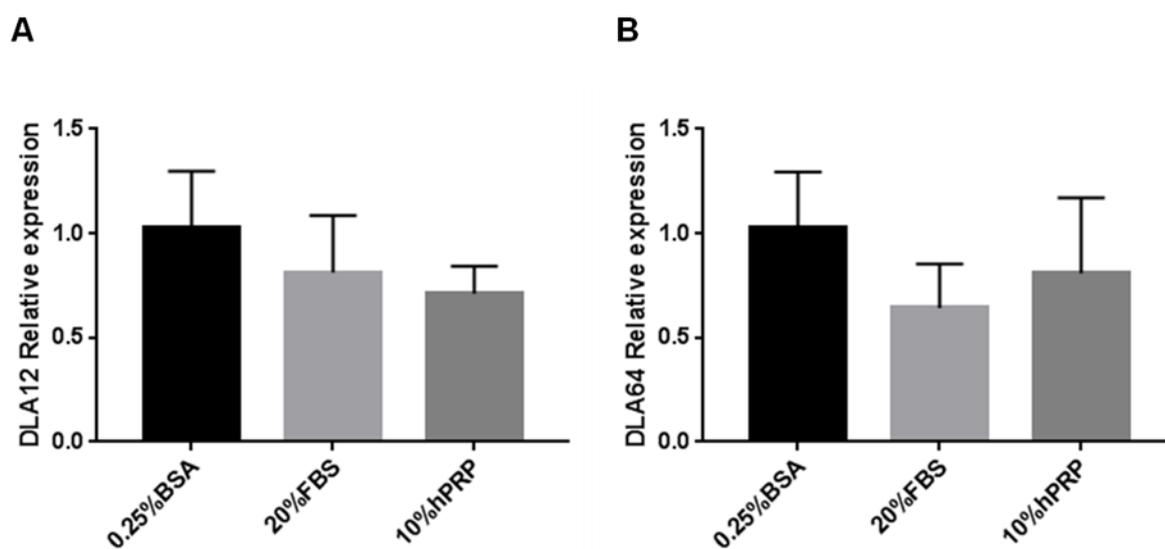


Figura 3: Effetto dell'hPRP sull'induzione dell'immureattività. Real time PCR. Le c-MSK trattate con il 10% di hPRP per 48 ore non hanno mostrato un aumento dell'espressione della classe primaria delle molecole del complesso principale di istocompatibilità (MHC-I), DLA12 e DLA64, suggerendo l'assenza di reazioni di immunoreattività.

Successivamente, abbiamo studiato gli effetti di hPRP sulle funzioni di c-MSK. Come mostrato nella figura 4, le c-MSK stimulate con il 10% di terreno condizionato da hPRP per

48 ore, hanno mostrato una vitalità paragonabile alle cellule coltivate con il 20% di FBS. In particolare, in presenza del 10% di hPRP o del 20% di FBS, la vitalità delle c-MSC era aumentata di quasi 1,4 volte, rispetto alle cellule in mezzo BSA allo 0,25% (Fig. 4).

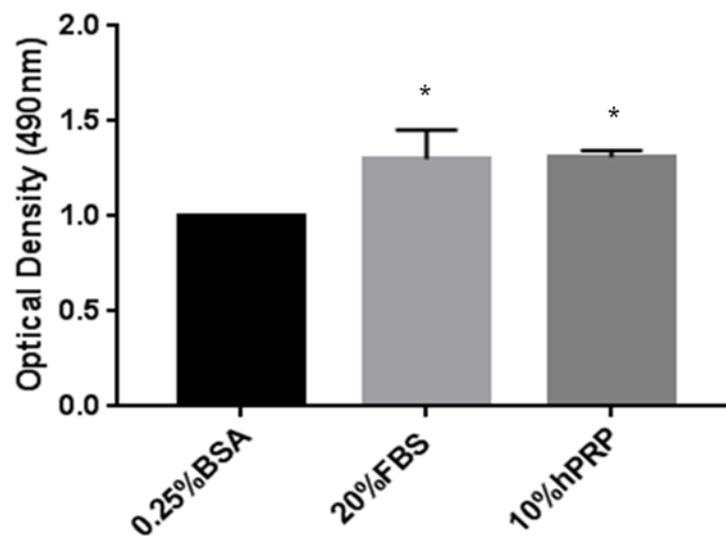


Figura 4: Saggio di sulforodamina. Le c-MSC trattate con il 10% di hPRP per 48 ore hanno mostrato un aumento della capacità di proliferazione rispetto al controllo negativo (0.25%BSA) e una capacità di proliferazione paragonabile rispetto alle c-MSC coltivate con 20% di FBS (controllo positivo). I dati ottenuti rappresentano la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata calcolata con il test One-way Anova, l'asterisco si riferisce alla significatività statistica rispetto alle cellule di controllo negative nel mezzo 0,25%BSA (* $p < 0,05$).

Abbiamo poi studiato la capacità di hPRP di promuovere la migrazione c-MSC. Pertanto, abbiamo eseguito un test di migrazione transwell riempiendo il fondo del piatto transwell con gel hPRP al 10% attivato in mezzo BSA allo 0,25% e seminando c-MSC nella camera superiore. Dopo 48 ore, le cellule che sono migrate attraverso il filtro sono state rilevate,

quantificate e fotografate. Come mostrato nella Figura 5, la presenza di hPRP ha aumentato la migrazione di c-MSc di circa 1,5 volte rispetto al controllo, indicando un ruolo dei fattori rilasciati da hPRP nella regolazione delle proprietà migratorie delle c-MSc.

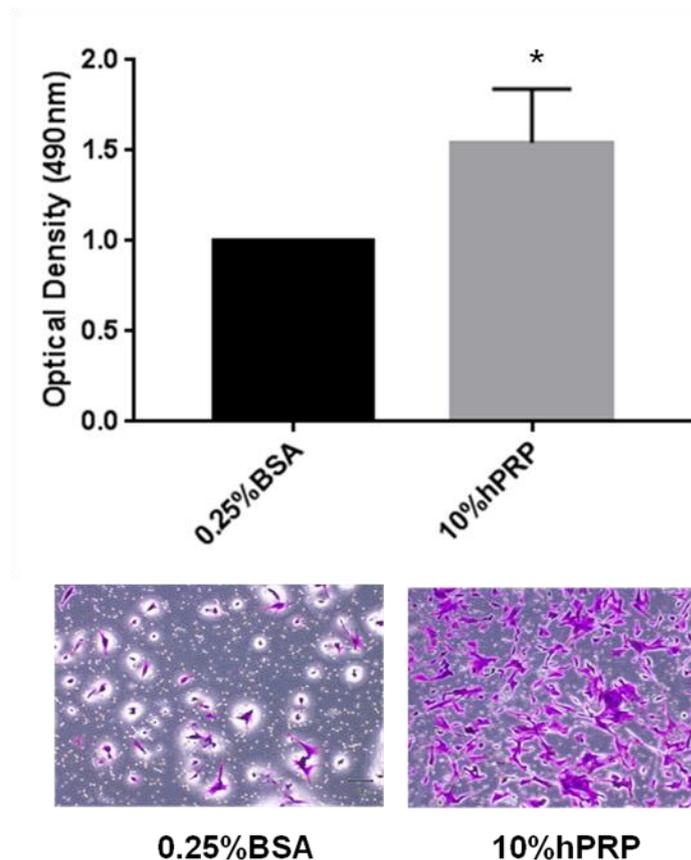


Figura 5: Test di tras migrazione. Le c-MSc piastrate su tranwell sono state stimulate con 10% hPRP per 48 ore. L'aumentata capacità delle cellule di migrare è stata dimostrata come assorbanza a 490 nm OD. Prima che le cellule venissero colorate con cristal violetto sono state fotografate. I dati ottenuti rappresentano la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata calcolata con il test t (* $p < 0,05$).

Ancora, abbiamo studiato se hPRP potesse portare all'attivazione di percorsi di segnalazione di crescita e migrazione nelle c-MSc. Gli esperimenti di immunoblot hanno rivelato che il 10% di hPRP ha aumentato i livelli di espressione di fosfo-ERK, fosfo-AKT e

fosfo-FAK rispetto alle cellule in mezzo BSA allo 0,25% e FBS al 20%, che rappresentano rispettivamente i controlli negativi e positivi (Figura 6). Pertanto, i nostri dati suggeriscono che i fattori rilasciati da hPRP sono in grado di sostenere la vitalità e la migrazione di c- MSC e attivare più “pathways” di segnalazione.

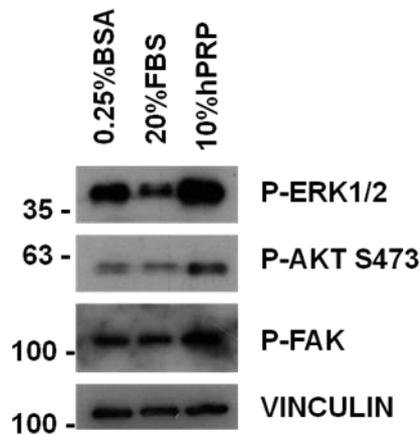


Figura 6: Western blot. Lo stato di fosforilazione delle vie di segnalazione è stato studiato mediante western blot. La fosforilazione di ERK, AKT e FAK risulta sovraregolata dopo stimolazione con 10%hPRP per 24 ore.

La motivazione per l'uso dei prodotti piastrinici si basa principalmente sulla produzione e il rilascio di molteplici fattori di crescita sulle piastrine.

Attivazione. I fattori primari associati alle piastrine includono Fattore di crescita della derivazione piastrinica d (PDGF) e crescita trasformante Fattore b (TGF-b), che è stato principalmente coinvolto nella proliferazione cellulare, chemiotassi e produzione di matrice extracellulare/angiogenesi (Lubkowska et al., 2012; Burnouf et al., 2013). Altri fattori di

crescita rilasciati dalle piastrine sono Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) 1 e 2 e

Fattore di crescita endoteliale vascolare. La motivazione per l'uso dei prodotti piastrinici si basa principalmente sulla produzione e il rilascio di molteplici fattori di crescita sulle

piastrine.

3.3 Gli AQP sono coinvolti nella migrazione c-MSC

Recenti evidenze hanno suggerito un ruolo cruciale per i canali d'acqua delle acquaporine

(AQP) nella regolazione e nel supporto della migrazione cellulare (Hyun Jun Jung et al.,

2011; Elkhider A et al., 2020; Maltaner RE. Et al., 2020). Tuttavia, il coinvolgimento degli

AQP nella migrazione delle c-MSC, così come la loro induzione da parte dell'hPRP, non

sono stati ancora studiati. Qui, abbiamo valutato i livelli di proteine AQP1 e AQP5 nelle c-

MSC trattate con il 10% di hPRP per 24 ore. È interessante notare che, come mostrato

nella Figura 7, la stimolazione di hPRP porta ad aumentare sia i livelli di AQP1 (Fig. 7A)

che AQP5 (Fig. 7B) nelle c-MSC, rispetto alle cellule di controllo coltivate in 0,25% BSA o

20% FBS.

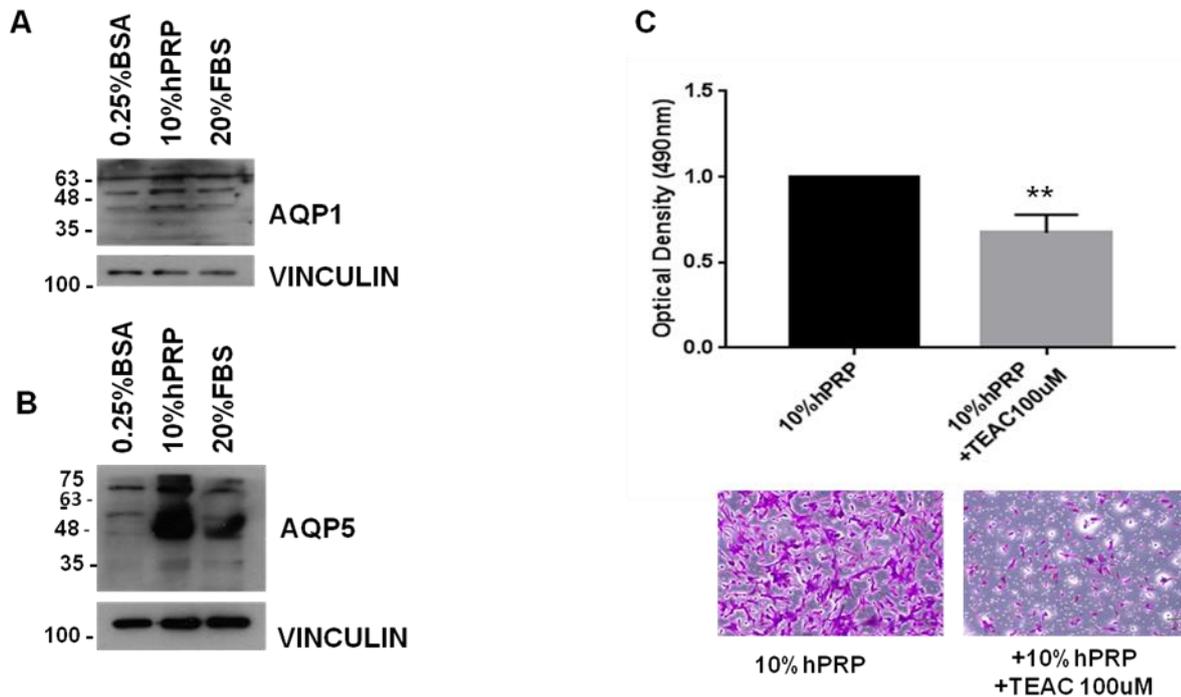


Figura 7: Coinvolgimento degli AQP nella regolazione della migrazione cellulare. A-B) I livelli di espressione di AQP1 e AQP5 sono sovraregolati nelle c-MSC dopo il trattamento con 10%hPRP per 48 ore. C) c-MSC trattate con il 10% di hPRP più TEAC 100uM mostrano una ridotta capacità di migrare rispetto alle c-MSC stimulate con il 10%hPRP. I dati ottenuti rappresentano la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata calcolata con il t test Unpaired (** $p < 0,05$).

Per dimostrare il coinvolgimento diretto degli AQP nella migrazione c-MSC indotta da

hPRP, è stato eseguito un saggio di migrazione transwell in presenza dell'inibitore di AQP

Tetraethylammoniumchloride (TEAC) (Brooks HL et al., 2000). 10, 50 e 100 uM TEAC non

ha compromesso la vitalità di c-MSC (Suppl. Fig. 1). Tuttavia, è interessante notare che, in

presenza di inibitore AQP, si è verificata una riduzione del 10% della migrazione indotta da

hPRP (Fig.7C).

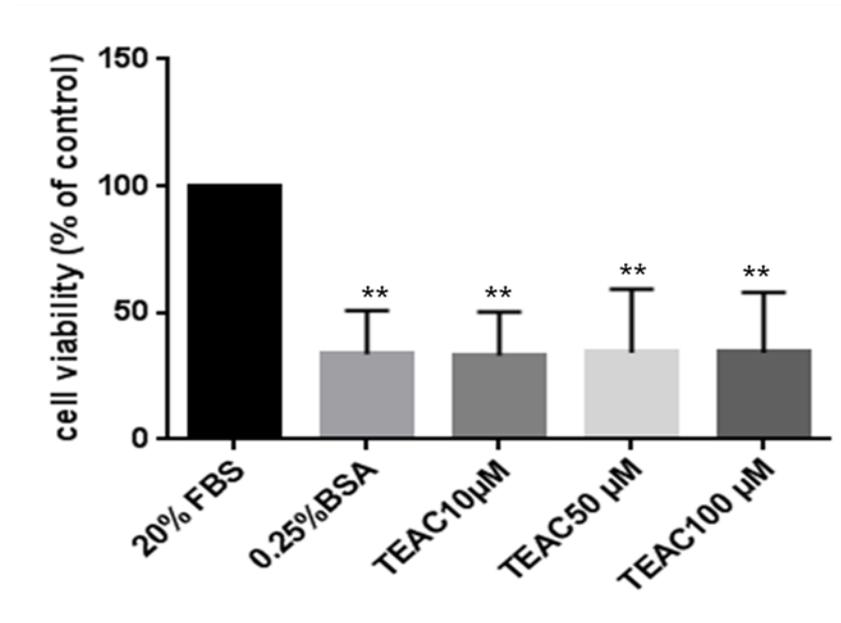


Figura Suppl 1: Test di vitalità. Le c-MSC trattate con diverse concentrazioni di TEAC mostrano il 25% di vitalità rispetto alle MSC coltivate nel 20% di FBS (controllo positivo) e una percentuale comparabile rispetto alle cellule coltivate in 0.25%BS. I dati ottenuti rappresentano la media \pm DS di quattro esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata calcolata con il test di comparazione multipla di Tukey, gli asterischi si riferiscono alla significatività statistica rispetto al controllo positivo FBS al 20% (** $p < 0,005$).

4. CONCLUSIONI

L'utilizzo di emocomponenti per uso non trasfusionale ha avuto un'enorme espansione negli ultimi venti anni, in parallelo al crescente interesse per le applicazioni in medicina rigenerativa. Dopo un periodo iniziale di vuoto normativo e di incertezza di indicazione terapeutica, attualmente, cominciano ad essere regolamentate sia le modalità di preparazione dei diversi emocomponenti che le linee guida e le raccomandazioni per l'utilizzo.

Un interessante settore in via di sviluppo per applicazioni di medicina rigenerativa è quello veterinario. Per animali di grossa taglia, l'utilizzo di PRP consente approcci terapeutici mirati in particolare lesioni tenodesmiche e di riparazioni di ferite complicate. Non sempre, tuttavia, è possibile ottenere emocomponenti "autologhi" o anche specie-specifici. In questo studio è stata valutata la possibilità di utilizzo di PRP umano (h-PRP) su cellule staminali mesenchimali canine (c-MSC) di tessuto adiposo sottocutaneo.

I risultati hanno indicato che h-PRP è in grado di stimolare sia la crescita che la motilità di c-MSC, inducendo specifici pathways molecolari, comuni anche alle MSC umane. Inoltre, per la prima volta, è stato dimostrato che il PRP induce l'espressione di AQP1 e AQP5, e che queste sono necessarie per la motilità cellulare. E' anche interessante notare che il

trattamento con h-PRP non induce l'espressione della classe primaria dei geni MHC-I

nelle cMSC, suggerendo un buon livello di compatibilità in caso di innesto.

In conclusione, malgrado l'utilizzo del PRP sia ormai consolidato per applicazioni in

medicina rigenerativa, il meccanismo d'azione resta ancora da essere studiato. In questo

lavoro originale di tesi è descritto il coinvolgimento delle acquaporine nella regolazione della motilità cellulare indotta dal PRP, che apre la strada ad ulteriori studi per la maggiore

comprensione dei meccanismi allo scopo di migliorare le attuali metodiche di preparazione

e le indicazioni per l'utilizzo.

BIBLIOGRAFIA

- **Ambrosio MR, D'Esposito V, Costa V, Liguoro D, Collina F, Cantile M, Prevete N, Passaro C, Mosca G, De Laurentiis M, Di Bonito M, Botti G, Franco R, Beguinot F, Ciccodicola A, Formisano P.** *Glucose impairs temoxifen responsiveness modulating connective tissue growth factor in breast cancer cells.* *Oncotarget.* 2017 Nov 20;8(65):109000-109017.
- **Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la fuente M, Nurden P, Nurden AT.** *Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and include VEGF and HGF production by human tendon cells in culture.* *J Orthop Res.* 2005 Mar; 23(2):281-6.
- **Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I.** *Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion.* *Stem Cells.* 2004;22(5):675-82.
- **Bonyadi M, Waldman SD, Liu D, Aubin JE, Grynblas MD, Stanford WL.** *Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependant osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5840-5.
- **Brooks HL, Regan JW, Yool AJ.** *Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region.* *Mol Pharmacol.* 2000 May;57(5):1021-6.
- **Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M.** *Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine.* *Blood Rev.* 2013 Mar;27(2):77-89.
- **Cabaro S, D'Esposito V, Gasparro R, Borriello F, Granata F, Mosca G, Passaretti F, Sammartino JC, Beguinot F, Sammartino G, Formisano P, Riccitiello F.** *White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds.* *Platelets.* 2018 Jul;29(5):463-467.
- **Caplan A.** *An interview with Arthur Caplan. Interview by Vicki Glaser.* *Rejuvenation Res.* Summer 2004;7(2):148-53.

- **Carmona L.** *¿Está incrementada la mortalidad cardiovascular en la artritis reumatoide? Posición en contra.* Reumatol Clin. 2006 Mar;2 Suppl 2:S49-51.
- **D'Esposito V,** Lecce M, Marenzi G, Cabaro S, Ambrosio MR, Sammartino G, Misso S, Migliaccio T, Liguoro P, Oriente F, Fortunato L, Beguinot F, Sammartino JC, Formisano P, Gasparro R. *Platelet-rich plasma counteracts detrimental effect of high-glucose concentrations on mesenchymal stem cells from Bichat fat pad.* J Tissue Eng Regen Med. 2020 May;14(5):701-713.
- **D'Esposito V,** Passaretti F, Perruolo G, Ambrosio MR, Valentino R, Oriente F, Raciti GA, Nigro C, Miele C, Sammartino G, Beguinot F, Formisano P. *Platelet-Rich Plasma Increases Growth and Motility of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Controls Adipocyte Secretory Function.* J Cell Biochem. 2015 Oct; 116(10):2408-18.
- **Devine SM,** Hoffman R. *Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation.* Curr Opin Hematol. 2000 Nov;7(6):358-63.
- **Dimarino AM,** Caplan AI, Bonfield TL. *Mesenchymal stem cells in tissue repair.* Front Immunol. 2013 Sep 4;4:201.
- **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;8(4):315-7.
- **Elkhider A,** Wang B, Ouyang X, Al-Azab M, Walana W, Sun X, Li H, Yang Y, Wei J, Li X. *Aquaporin 5 promotes tumor migration and angiogenesis in non-small cell lung cancer cell line H1299.* Oncol Lett. 2020 Mar;19(3):1665-1672.
- **Everts PA,** Overdevest EP, Jakimowicz JJ, Oosterbos CJ, Schönberger JP, Knappe JT, van Zundert A. *The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery, a review.* Surg Endosc. 2007 Nov;21(11):2063-8.
- **Jiang TJ,** Su H, Zhou Zg. *Isolation and purification of islets in non-obese diabetic mice.* Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2002 Fe 28;27(1):85-7.
- **Jung JH,** Park JY, Jeon HS, Kwon TH. *Aquaporin-5: a marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells.* PLoS One. 2011;6(12):e28492.

- **Korobelnik JF, Hannouche D, Belayachi N, Branger M, Guez JE, Hoang-Xuan T.** *Autologous platelet concentrate as an adjunct in macular hole healing: a pilot study.* Ophthalmology. 1996 Apr;103(4):590-4.
- **Lubkowska A, Dolegowska B, Banfi G.** *Growth factor content in PRP and their applicability in medicine.* J Biol Regul Homeost Agents. Apr-Jun 2012;26(2 Suppl 1):3S-22S.
- **Maltaneri RE, Schiappacasse A, Chamorro ME, Nesse AB, Vittori DC.** *Aquaporin-1 plays a key role in erythropoietin-induced endothelial cell migration.* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020 Jan;1867(1):118569.
- **Marx RE.** *Platelet-rich plasma: evidence to support its use.* J Oral Maxillofac Surg. 2004 Apr;62(4):489-96.
- **Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL.** *Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis.* Am J Vet Res. 2008 Jul;69(7):928-37.
- **Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L.** *Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, OCT4 expression, and plasticity.* Stem Cells. 2005 Sep;23(8):1105-12.
- **Weissman S.** *More observations about the NICU.* Acad Med. 2001 Oct;76(10):979.
- **Zimmerman M.** *Autonomic tone and atrial fibrillation.* J Cardiovasc Electrophysiol. 2002 Jun;14(6):565-6.