



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

*Dottorato di Ricerca in Epatologia Sperimentale e Clinica
(26° ciclo)*

Coordinatore Prof. Eugenio Gaudio

Tesi di Dottorato

“Definizione della nicchia staminale nella colecisti normale e patologica: isolamento, caratterizzazione, differenziazione, dimostrazione dell’abilità delle cellule staminali isolate di rigenerare il tessuto epatico in modelli sperimentali di danno epatico ed efficace criopreservazione.”

*Dottorando Dott. Raffaele Gentile
Tutor Prof. Domenico Alvaro*

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

	PAGINA
SOMMARIO	3-4
INTRODUZIONE	6-10
OBIETTIVI DELLO STUDIO	11
MATERIALI E METODI	12-25
RISULTATI	25-34
DISCUSSIONE	35-42
CONCLUSIONI	43-45
BIBLIOGRAFIA	46-51
PARTE ICONOGRAFICA	52-69
PARTE SUPPLEMENTARE	70-72

SOMMARIO

All'interno delle ghiandole peribiliari dell'albero biliare umano adulto sono state evidenziate cellule staminali che esprimono marcatori di endoderma primitivo. Le stesse cellule hanno dimostrato di possedere la capacità di differenziarsi *in vitro* e *in vivo* in epatociti e colangiociti maturi e isole pancreatiche funzionanti. Nulla è finora conosciuto sull'esistenza di cellule staminali/progenitrici nella colecisti umana. Gli obiettivi dello studio sono stati la caratterizzazione della nicchia staminale della colecisti umana, la possibilità di isolare cellule staminali di origine endodermica dalla colecisti umana normale o patologica e la definizione delle condizioni ideali per la loro criopreservazione. N° 19 colecisti sono state ottenute da donatori cadavere adulti esenti da patologie epato-bilio-pancreatiche attraverso il Consorzio Regionale Trapianti d'Organo del Lazio (Italia). N°14 colecisti patologiche sono state prelevate da pazienti affetti da litiasi sintomatica o da pazienti affetti da litiasi asintomatica sottoposti ad exeresi chirurgica in corso di chirurgia bariatrica. Il tessuto colecistico è stato digerito con collagenasi e DNAsi e la sospensione cellulare è stata sottoposta ad immunoselezione per un marcatore di cellule staminali di origine endodermica (EpCAM-Epithelial Cell Adhesion Molecule). Le colture cellulari ottenute sono state mantenute in coltura in Kubota's Medium (KM), un mezzo di coltura privo di fattori di crescita sviluppato per l'espansione di cellule staminali epatiche *in vitro*. La valutazione della multi potenzialità è stata effettuata *in vitro* utilizzando mezzi di coltura a base di KM arricchiti con fattori di crescita e di induzione specifici per i diversi destini maturi di derivazione endodermica (epatociti, colangiociti, isole pancreatiche). **Risultati:** La colecisti non contiene ghiandole peribiliari, tuttavia, all'interno delle cripte della mucosa colecisti umana sono state individuate popolazione cellulari che esprimono marcatori di cellule progenitrici bilio-

pancreatiche (SOX17, PDX1, EpCAM) e di cellule di endoderma primitivo (CXCR4). I risultati dell'analisi morfologica e fenotipica della colecisti patologica sono paragonabili a quelli ottenuti nelle colecisti normali. Cellule immunoselezionate per EpCAM dalla colecisti umana si espandono clonogenicamente su plastica e in un mezzo privo di siero adattato per progenitori endodermici (KM). Cellule isolate dalle colonie, dopo un mese di coltura in KM, sono state trasferite in tre distinti medium bidimensionali ed hanno dato origine a colonie cellulari con caratteristiche epatocitarie, colangiocitarie e di insule pancreatiche funzionanti. Abbiamo condotto studi pre-clinici in modelli sperimentali di epatopatie (topi immunodeficienti SCID) trattati per 7 settimane con tetracloruro di carbonio (CCL4) attraverso l'utilizzo di cellule staminali/progenitrici della colecisti umana (human gallbladder stem/progenitor cells, hGSCs). Al termine gli animali sono stati sacrificati e dopo aver valutato l'attecchimento, la proliferazione, la differenziazione *in vivo*, abbiamo dimostrato, analizzando i test funzionali sul siero dei topi sacrificati, che solo i topi trattati con le hGSCs mostrano un miglioramento degli indici sierologici di funzionalità epatica. Al fine di individuare la migliore strategia per la criopreservazione delle hGSCs, è stato condotto uno studio in cui sono state analizzate soluzioni criopreservanti con diversa composizione. E' stata identificata una metodica efficace per il congelamento di cellule staminali/progenitrici, comprese le hGSCs. Le hGSCs sono facilmente isolabili da tessuti umani di donatori di ogni età ed immediatamente utilizzabili per la creazione di banche di cellule staminali/progenitrici che possono essere conservate e utilizzate in pazienti con grave e letale compromissione della funzione del fegato, i quali spesso non sopravvivono all'attesa del trapianto di fegato.

Abbreviazioni

hGSCs, human Gallbladder stem/progenitor cells; **hBTSCs**, human Biliary tree stem/progenitor cells; **GPB**, ghiandole peribiliari; **CD133**, prominina 1; **CK**, citocheratina; **CXCR4**, chemochina (C-X-C motif) recettore 4; **EpCAM**, molecola di adesione cellulare epiteliale; **ESC**, cellule staminali embrionali; **K**, cheratina; **LGR5**, recettore ricco di leucina accoppiato a protein G 5; **MUC**, mucina; **NANOG**, homeobox Nanog; **NCAM**, molecola di adesione cellulare neuronale; **NGN3**, neurogenina 3; **OCT4**, homeobox 1 POU classe 5; **PDX1**, homeobox pancreatico e duodenale 1; **PROX1**, protein homeobox prospero 1; **RT-PCR**, real-time reazione a catena polimerasica; **SALL**, proteina sal-like; **SCID**, immunodeficienza severa combinata; **SOX**, HMG box correlate a Sry; **ITGB4**, integrina beta 4; **TGF**, fattore di crescita trasformante; **VEGF**, fattore di crescita cellulare endoteliale; **CXCR4**, chemochina (C-X-C motif) recettore 4; **FOXA2**, forkhead box a2; **HES1**, a member of the basic helix-loop-helix family of transcription factors and a transcriptional repressor of genes requiring an HLH protein for their transcription; **DMSO**, dimetil-solfossido; **CRF**, velocità di congelamento; **GMP**, good manufacturing practice.

Introduzione

L'albero biliare è una complessa rete di dotti interconnessi, di diametro crescente, che si sviluppa dal canale di Hering al coledoco^[1]. Il sistema biliare comprende i dotti biliari intraepatici, che iniziano a livello dei canali di Hering e continuano con i duttuli biliari, i dotti interlobulari, i dotti settali e segmentali^[1], e i dotti biliari extraepatici, dotti ramificati che connettono il fegato e il pancreas all'intestino. I dotti biliari extraepatici consistono nel dotto epatico comune, colecisti, dotto cistico, dotto biliare e dotto epato-pancreatico comune. Il dotto epatico comune continua da dove i dotti epatici destro e sinistro fuoriescono dall'ilo epatico. Entrambi i dotti, intraepatico ed extraepatico, sono rivestiti da cellule epiteliali mature, dette colangiociti, che sono costruttivamente quiescenti. I colangiociti poggiano su una membrana basale, circondata da tessuto connettivo, matrice extracellulare e plesso peribiliare^[1,2]. Queste cellule sono specializzate per agire come un interfaccia con l'ambiente ostile imposto dalla bile^[3,4] e sono morfologicamente e funzionalmente eterogenei, ma con pattern fenotipici che implicano un singolo lineage maturativo^[5-9].

Lungo l'albero biliare extraepatico elementi ghiandolari sono stati descritti sia nella specie umana che in altre specie animali^[7]. Le ghiandole peribiliari (GPB) extraepatiche sono ghiandole tubulo-alveolari con acini mucinosi e sierosi, disperse nella parete dei dotti biliari^[7]. Alcuni lobuli ghiandolari si trovano in sede extramurale nel connettivo peribiliare. Le GPB comunicano con il lume biliare, attraverso condotti che si aprono con regolarità in piccoli diverticoli della superficie mucosa dei dotti biliari^[7]. Al di fuori della produzione di muco, le funzioni delle ghiandole peribiliari non sono note. L'espressione di enzimi pancreatici nelle ghiandole peribiliari, sia

nell'embrione che nella vita adulta^[10], suggerisce che le GPB contengano popolazioni di cellule progenitrici che sono il serbatoio delle cellule staminali endodermiche nella vita adulta che danno origine al sistema epato-bilio-pancreatico nella vita fetale. Le GPB extraepatiche originano come evaginazioni sacciformi del lume dei dotti biliari extra-epatici (DBEE) che si ramificano nel mesenchima circostante. Dopo la nascita, le GPB sono disperse attraverso l'intera estensione dei dotti biliari, a partire dai dotti segmentali sino al dotto epato-pancreatico comune, con l'esclusione della colecisti.

Durante lo sviluppo verso l'età adulta i dotti biliari extraepatici si allungano con conseguente localizzazione delle ghiandole peribiliari in gruppi distinti, in particolare nei punti di ramificazione dei dotti, e lo spazio tra gli orifizi delle ghiandole aumenta^[7]. Il numero di acini ghiandolari raggiunge il livello massimo entro il primo anno di vita, rimanendo successivamente notevolmente costante nella vita adulta. I dotti biliari extraepatici sono funzionalmente attivi per quanto riguarda il flusso della bile a partire dalla 12^a settimana di gestazione. L'albero biliare umano deriva dall'allungamento e modellamento della porzione caudale del diverticolo epatico determinati dalla proliferazione endodermica^[11-13] (Fig 1).

La colecisti e il dotto cistico si sviluppano come una struttura tubulare (pars cistica) derivante dal diverticolo epatico^[11-13]. Durante la quarta, e soprattutto la quinta settimana di gestazione, prossimalmente e distalmente, il diverticolo epatico si allunga ed in combinazione con la proliferazione delle cellule endodermiche, dà origine al dotto biliare e al dotto epatico^[11,12]. Durante l'ottava settimana di gestazione la giunzione bilio-pancreatica è evidente e migra nella parete del duodeno. Durante l'undicesima settimana di gestazione, la colecisti si dilata e le ghiandole peribiliari extraepatiche cominciano a svilupparsi nel dotto cistico, nel dotto biliare ed epatico^[11,12]. La proliferazione endoderma si verifica in parallelo con l'invasione del

mesenchima circostante e con la formazione della placca duttale determinando l'organogenesi epatica. L'organogenesi epatica procede attraverso un processo dinamico di ramificazione controllato dal forte signaling di Hedgehog che lega il tessuto connettivo-vascolare in formazione e le cellule endodermiche in differenziazione^[11-14]. I segnali che guidano l'organo-tessuto genesi epatica e biliare, attraverso il processo di ramificazioni successive, non sono ben compresi, ma implicano forti segnali epitelio-mesenchimali e l'influenza degli stimoli delle forze meccaniche^[15,16]. Ci sono solo pochi studi che suggeriscono la presenza di cellule staminali nell'albero biliare extraepatico e che queste persistano nell'età adulta. Ad esempio, culture di cellule della colecisti di topo differenziano in cellule simil-epatocitarie *in vitro*^[17]. Inoltre è stata dimostrata la possibile rigenerazione del dotto biliare extraepatico a seguito dell'inserzione di un tubo di polimero riassorbibile nella sede del dotto biliare di suino undici settimane dopo l'intervento chirurgico^[18]. Più di recente, l'analisi genetica di mutanti SOX17 ha rivelato che il fattore di trascrizione SOX 17 funziona come un "interruttore", inducendo alternativamente la differenziazione del tessuto endodermico in vie biliari o in pancreas a seconda della particolare conformazione assunta dalla proteina^[19]. Da un punto di vista morfogenetico, lo sviluppo iniziale dei tessuti pancreatico e biliare è molto simile^[19-22]. Un fattore di trascrizione determinante dello sviluppo pancreatico, ed in particolare della componente endocrina pancreatica, a partire dalle cellule progenitrici endodermiche è PDX1^[19-22]. È stato recentemente scoperto che i dotti biliari extraepatici murini contengono cellule β -pancreatiche che esprimono insulina e C-peptide e mostrano risposta alla somministrazione di glucosio^[23,24]. Studi istologici indicano che le cellule β -pancreatiche originano direttamente dall'epitelio dei dotti biliari in una fase tardiva dell'embriogenesi^[22,25]. Altri tipi di cellule endocrine

(producenti somatostatina e polipeptidi pancreatici) si trovano in stretta contiguità con le cellule beta derivate dai dotti biliari^[25]. La presenza di uno stretto rapporto dal punto vista embriologico, anatomico, funzionale e filogenetico tra pancreas e vie biliari è suggerita anche da studi condotti su alcuni vertebrati che, in assenza di una ghiandola pancreatica, vicariano le funzioni del pancreas attraverso le vie biliari^[26]. La presenza di pancreas ectopico è una rara anomalia dello sviluppo determinata dalla disfunzione di Hes1, un fattore di trascrizione che funziona come un regolatore generale negativo della differenziazione endocrina dell'endoderma^[27,28]. Recentemente, utilizzando topi knockout per Hes1^[27,28] è stato ampiamente dimostrato che l'inattivazione di Hes1 induce mis-espressione di Ptf1a in regioni discrete dell'intestino primitivo e nei dotti biliari extraepatici e che le cellule Ptf1 positive differenziano in cellule mature pancreatiche esocrine ed endocrine anche in sede ectopica. Questo processo rassomiglia all'embriogenesi pancreatica e mette in evidenza che le cellule delle vie biliari extraepatiche conservano i fattori che guidano lo sviluppo del pancreas endocrino ed esocrino ma non raggiungono la differenziazione pancreatica a causa della co-espressione di fattori inibitori di quest'ultima, come HES1. Inoltre è stato dimostrato che il silenziamento di HES1 determina alterato sviluppo dell'albero biliare e della colecisti associato all'espressione di tessuto pancreatico ectopico determinata da Neurog3^[29]. In rapporto alla funzione esocrina biliare è stato dimostrato che circa l'80% delle cellule delle ghiandole peribiliari extraepatiche esprimono α -amilasi pancreatica, tripsina e lipasi pancreatica^[10]. Questi tre enzimi sono espressi nelle cellule biliari dei dotti in maturazione nel corso della vita fetale, così come nella vita adulta. È interessante notare che l'espressione degli enzimi pancreatici non si riscontra a carico dei dotti biliari intraepatici più piccoli e che le cellule del lineage epatocitario e colangiocitario

intraepatico perdono l'espressione di questi enzimi nel corso della maturazione già a partire dalla nona-venticinquesima settimana di gestazione, suggerendo che le GPB conservino unicamente il potenziale di sviluppo endodermico nel corso della vita adulta. Dalla patologia umana ci vengono ulteriori evidenze dello stretto rapporto intercorrente tra dotti biliari extraepatici e pancreas. L'iperplasia delle GPB in corso di epato-biliopatia cronica rassomiglia fortemente all'attivazione della nicchia staminale intraepatica descritta nel fegato malato, ma le implicazioni di tale fenomeno rispetto alla rigenerazione tissutale, alla riparazione del danno e alla carcinogenesi devono ancora essere definite.

L'analisi delle risposte dei danni al fegato portano all'identificazione dei canali di Hering come probabile sito della nicchia di cellule staminali^[30]. Sebbene numerosi studi hanno portato evidenze a supporto di questa ipotesi^[31-34], la ricerca negli ultimi sette anni ha fornito la prova di questo assunto attraverso l'analisi dettagliata delle cellule considerate di sostegno, l'identificazione di cellule che esprimono marcatori classici di staminalità, l'isolamento e la purificazione delle cellule staminali e la dimostrazione della loro abilità di autorinnovamento in coltura e la loro multipotenza sia in coltura che *in vivo*^[35-40]. I saggi con marcatori ausiliari sono indicativi (sebbene non costituiscano una prova) della popolazione di cellule staminali; essi si basano sul fatto che i marcatori del DNA, come la bromodeossiuridina analogo della timidina, sono trattenuti all'interno delle cellule staminali che presentano un filamento di DNA parentale, mentre le cellule non staminali ereditano l'altro filamento di DNA e perdono il marcatore a causa della diluizione associata alla divisione del DNA.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo primario del progetto è stato l'individuazione della nicchia staminale nella colecisti normale e patologica e la valutazione della capacità di auto rinnovamento e della multi potenzialità differenziativa *in vitro* e *in vivo* delle cellule isolate, elementi essenziali al fine della definizione della "staminalità" della popolazione cellulare in esame e dati propedeutici per un possibile futuro utilizzo delle cellule staminali della colecisti in protocolli di terapia cellulare per affezioni epato-biliari.

In particolare gli obiettivi principali del progetto sono stati: 1) lo studio *in situ* per la definizione della nicchia staminale e la valutazione dell'attivazione del compartimento staminale; 2) la definizione delle condizioni ideali per isolare cellule staminali da colecisti, per favorirne la crescita in coltura e per indurne la differenziazione *in vitro* in epatociti e colangiociti maturi e cellule delle isole pancreatiche funzionalmente attive; 3) lo studio *in vivo* in modelli sperimentali di danno epatico al fine di valutare l'attecchimento e la rigenerazione del tessuto epatico danneggiato attraverso il trapianto di cellule staminali isolate da colecisti; 4) la definizione delle condizioni ideali per la criopreservazione delle cellule staminali/progenitrici isolate dalla colecisti umana (hGSCs) .

Materiali e Metodi

Reperimento di tessuto biliare extraepatico umano.

N° 19 colecisti con dotto cistico e pancreas sono stati ottenuti da donatori cadavere adulti esenti da patologie epato-bilio-pancreatiche attraverso il Consorzio Regionale Trapianti d'Organo del Lazio (Italia). Tali organi sono stati mantenuti in ghiaccio e processati entro 18 ore dal decesso. Il fegato è stato normalmente trapiantato. Il periodo relativo al reperimento dei suddetti campioni è compreso tra il dicembre 2008 e l'aprile 2013. In tutti i casi, i tessuti sono stati mantenuti e processati in condizioni di sterilità attenendosi ai protocolli della Good Medical Practice.

N° 14 colecisti sono state prelevate da pazienti affetti da litiasi sintomatica o da pazienti affetti da litiasi asintomatica sottoposti ad exeresi chirurgica in corso di chirurgia bariatrica.

Preparazione della sospensione cellulare.

La colecisti è stata accuratamente sminuzzata con forbici o bisturi e digerita separatamente usando collagenasi (C5138; 300 U/ml) e 30 mg di DNase (DN25) entrambe da Sigma (St. Louis, Mo.) preparate in 100 mls di "cell wash". Il "cell wash" consiste di 500 ml di RPMI 1640 (GIBCO), 0.5 g di albumina bovina (fatty acid free), selenium (10-8M), e 5 ml di antibiotici (Gibco #15240-062; AAS). I campioni di tessuto sono stati digeriti per 20-40 minuti a 37°C. Dopo la digestione i frammenti sono stati pressati attraverso un collettore con filtro metallico (500 microm sieves) e le cellule dissociate sono state raccolte e centrifugate a 300 g per 10 minuti.

I pellet ottenuti sono stati sospesi in 30 ml di Cell Wash e filtrati prima attraverso filtro in nylon da 100 μm e successivamente attraverso filtro da 30 μm . Il numero di cellule contenute nelle sospensioni e la vitalità cellulare sono stati definiti con il saggio del Trypan Blue utilizzando camera Fast-Read 102 (Biosigma Srl) e Automatic Cell Counter (Biorad). La sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta a caratterizzazione fenotipica al citofluorimetro ed a processo di immunoselezione (sorting) per EpCAM. Le cellule sono state centrifugate a 1100 RPM at 4°C (250 RCF, Sorval RT7 and RTH swinging bucket) ed il pellets da ogni specifico segmento bilare è stato risospeso in Kubota's Medium (vedi composizione sotto) senza siero. Il numero di cellule vitali è stato definito con il saggio del Trypan Blue usando una griglia per il conteggio emocitometrico ed è stato determinato routinariamente. Il numero medio di cellule isolate dalla colecisti in condizioni normali e patologica è stato di circa 5 milioni (n° di colecisti digerite = 33) con vitalità compresa tra l'85 e il 95%. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state separatamente utilizzate per collezionare campioni cellulari: fissaggio in paraformaldeide (PFA) 2%; estrazione di mRNA per RT-PCR; saggio proteine attraverso Western Blot; sorting attraverso miniMACS per CD133 (Milteny Biotec); colture cellulari primarie.

Sorting per EpCAM.

La sospensione precedentemente ottenuta è stata centrifugata (300 g per 10 minuti). Il pellet ottenuto è stato sospeso con 1200 μl di Separation Buffer (Milteny Biotec, Germany). Alla sospensione è stato aggiunto l'anticorpo anti EpCAM (Milteny Biotec, Germany) nella proporzione 3:1 e lasciato in incubazione a +4°C per 30 minuti. Successivamente la sospensione cellulare è stata centrifugata. I pellet sono

stati sospesi con 2 ml di Separation Buffer e fatti percolare attraverso colonnine LS (Milteny Biotec, Germany) precedentemente posizionate su appropriato supporto magnetico (Milteny Biotec, Germany). La soluzione cellulare fuoriuscita dalla colonnina è costituita da cellule EpCAM negative. Le colonie LS sono state staccate dal supporto magnetico e stantuffate, previa aggiunta di 1 ml di Separation Buffer. La soluzione che fuoriesce dalla colonnina è costituita da cellule EpCAM positive. Le cellule sono state sospese in PBS (Gibco) alla concentrazione di 200.000 per ml. Sono stati quindi preparati campioni di sospensione cellulare per la valutazione della vitalità e della numerosità cellulare, per la caratterizzazione fenotipica al citofluorimetro e per la creazione di culture cellulari primarie.

Valutazione *in vitro* della vitalità cellulare.

La vitalità funzionale è stata valutata mediante test di esclusione al Trypan-Blue. L'adesione cellulare è stata valutata mediante determinazione del contenuto proteico delle cellule adese rispetto al contenuto proteico delle cellule inizialmente piastrate.

Citofluorimetria.

Le cellule fresche isolate prima e dopo il sorting per EpCAM sono state preparate per l'analisi al citofluorimetro. In breve sono stati preparati campioni di sospensione cellulare contenente 200.000 cellule. I campioni sono stati sottoposti a due lavaggi in PBS; il pellet cellulare è stato quindi incubato con anticorpi anti EpCAM e anti NCAM (neural cell adhesion molecule) o con i relativi controlli di isotipo per 30 minuti a temperatura ambiente a riparo dalla luce. Successivamente i campioni sono stati sottoposti a due lavaggi in PBS e quindi il pellet cellulare è stato sospeso in Paraformaldeide al 2% ed incubato per 10 minuti a temperatura ambiente a riparo

dalla luce. I campioni quindi sono stati sottoposti a 2 lavaggi con PBS e quindi il pellet cellulare è stato sospeso in 300 µl di PBS ed i campioni sono stati conservati a + 4 °C a riparo dalla luce in attesa della lettura con il citofluorimetro

Piastraggio iniziale delle cellule ed espansione delle cellule *in vitro*.

Il Kubota Medium, è un mezzo di coltura completamente definito rispetto ai suoi costituenti sviluppato su misura per l'espansione *in vitro* delle cellule staminali embrionali ed attualmente riconosciuto come efficace per l'espansione di molti tipi di progenitori endodermici. Il KM è stato utilizzato e preparato come descritto da Kubota and Reid (29) e Wauthier ed altri (30). Il KM consiste di RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) senza rame, bassa concentrazione di calcio (0.3 mM), zinco (10^{-10} M), selenio (10^{-9} M), insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), nicotinamide (50 µg/ml), lipoproteine ad alta densità HDL (10 µg/ml) e una miscela definita di acidi grassi liberi legati ad albumina purificata da siero bovino. La sospensione delle cellule dissociate precedentemente descritta è stata messa in coltura in piastre di plastica da 100 mm ad una densità di 300,000 cells/cm² in KM addizionato con siero fetale bovino (FBS) al 5% per alcune ore al fine di facilitarne l'adesione. Successivamente il medium con il siero è stato aspirato e con esso le cellule non adese alla piastra e quindi reintrodotti in KM senza siero. Le colture sono state mantenute in KM senza siero in incubatore a 37°C, al 95% di ossigeno e al 5% di CO₂. Il medium è stato cambiato ogni 2-3 giorni (sino ad un massimo di 4 giorni). Le colonie sono state osservate circa quotidianamente e seguite per un periodo di 1-2 mesi usando un microscopio invertito. Colonie di staminali e progenitori sono emerse dopo pochi giorni di coltura e sono state osservate fino a 2 mesi di coltura. Le colonie sono state espanse per un mese o più e successivamente sono state selettivamente prelevate attraverso gentile

aspirazione guidata sotto microscopio ottico ed utilizzate per la valutazione dell'espressione di geni specifici con RT-PCR o trapiantate in differenti mezzi tridimensionali ottenuti come descritto sotto. Tutti i fattori di crescita sono stati procurati da R&D Systems, l'RPMI 1640 e il FBS sono stati ottenuti da GIBCO/Invitrogen.

Valutazione proliferazione cellulare (Test di Clonogenicità).

Le cellule sono state piastrate a densità clonale (1000 cells/1 ml) ed osservate nel tempo. Singole cellule adese alla plastica sono state individuate, marcate e identificate al tempo zero. Fotogrammi sono stati acquisiti a tempi diversi nella sede del dish occupata in origine dalla singola cellula adesa. In tale maniera è stato possibile valutare la proliferazione clonogenica della cellula e seguire nel tempo l'espansione della colonia cellulare originata da una singola cellula (proprietà di auto rinnovamento).

Differenziamento cellulare.

Mezzi specifici sono stati creati per indurre la differenziazione delle cellule in cellule mature, utilizzando KM modificato (MKM) costituito da KM addizionato di calcio (concentrazione finale di 0.6 mM), di un supplemento di rame solfato ($10E-10$ M) e tri-iodotironina (T3, $10E-9$ M). Ulteriori aggiunte sono state fatte in base allo specifico tipo cellulare maturo desiderato:

- **Epatociti**— epidermal growth factor (EGF, 10 ng/ml), hepatocyte growth factor (HGF, 10 ng/ml), Oncostatina (10 ng/ml), idrocortisone ($10E-8$ M).
- **Colangiociti**— EGF ($10E-10$ ng/ml), HGF (10 ng/ml), vascular endothelial growth factor (VEGF, 10 ng/ml), glucagon (5 ug/ml), idrocortisone ($10E-8$ M).
- **Insule Pancreatiche**— assenza di idrocortisone, 1% B27, 10 uM retinoic acid,

2.5 uM cyclopamine, and exendin-4 (50 ng/ml). Tutte le citochine sono state ottenute da R&D System e Sigma (St. Louis, Mo.). Le colture sono state lasciate in incubatore a 37°C per 1-2 settimane e successivamente analizzate.

Immunoistochimica (IHC) ed Immunofluorescenza (IF).

Campioni di colecisti sono stati fissati in 4% di paraformaldeide (PFA) disciolto in PBS per 12 ore e successivamente lasciate overnight in etanolo al 70%. I campioni sono stati quindi inclusi in blocchi di paraffina e successivamente sono stati tagliati in sezioni di 5- μ m. Le sezioni sono state deparaffinizzate con xylene e reidratate in soluzioni a concentrazione decrescente di etanolo. Lo smascheramento antigenico (“antigens retrieval”) è stato ottenuto portando ad ebollizione le sezioni per 25 minuti in pressure cooker in Retrieval Buffer (DakoCytomation). La perossidasi endogena è stata bloccata incubando per 30 minuti soluzione 0.3% H₂O₂. Le sezioni sono state quindi bloccate in Serum Block (DakoCytomation); anticorpi primari sono stati incubati over night ora in Serum Block al 10% (DakoCytomation) in ambiente umido a 4 °C; la lista completa degli anticorpi testati, delle condizioni di lavoro e delle case produttrici è fornita nella tabella n° 1. Tre lavaggi in PBS sono stati eseguiti precedentemente all’incubazione con l’anticorpo secondario. Le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario biotinilato (Dako Cytomation LSAB Plus System-HRP, Glostrup, Denmark), per 30 minuti in ambiente umido a temperatura ambiente. Successivamente la metodica di colorazione ABC è stata eseguita utilizzando VECTASTAIN® ABC system e NovaRED™ SUBSTRATE KIT (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA). Per tutte le immunoreazioni sono stati incubati controlli negativi. Le sezioni sono state disidratate con soluzioni crescenti di alcool etilico, fissate in xylene, ed incluse in Eukitt Mounting Media (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Le sezioni sono state analizzate usando un

microscopio ottico invertito (DMIRB; Leica), e le immagini sono state ottenute con MicroPublisher camera (Q-Imaging) controllata da SimplePCI software (Compix Imaging Systems). Abbiamo utilizzato sezioni standard incubate con PBS come controllo ed alcune sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina. Informazioni riguardo agli anticorpi e diluizioni sono contenute nella Tabella 1. L'osservazione della morfologia delle ghiandole biliari nelle sezioni colorate con ematossilina eosina è stata fatta con BX-51 light microscopy (Olympus, Tokyo, Japan), le immagini catturate attraverso Videocam (Spot Insight; Diagnostic Instrument, Sterling Heights, MI) sono state processate con Image Analysis System (IAS; Delta Sistemi, Rome, Italy). Dopo varia durata della cultura, le cellule sono state fissate in 4% PFA a temperatura ambiente per 2 ore a 4 C°, lavate con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) e sottoposte a bloccaggio con 10% goat serum in HBSS per 2 ore e successivamente incubate con anticorpi primari a 4°C overnight. Dopo 3 lavaggi con HBSS le cellule sono state incubate con anticorpi secondari isotipo specifici per 1 ora a temperatura ambiente. I nuclei sono stati colorati con DAPI-blue. L'immunofluorescenza è stata rilevata attraverso Zeiss 510 Meta or Leica SP2 Laser Scanning Confocal Microscope or Leica DMIRB inverted microscope.

Osservazioni LM, IHC e IF sono state elaborate con un sistema di analisi dell'immagine (IAS - Delta Sistemi, Roma-Italia) e sono state effettuate in maniera indipendente da due patologi in modo cieco. Brevemente, sei vetrini sono stati analizzati per ciascun campione. La superficie occupata dalle GPB è stata ottenuta in sei settori non sovrapposti (ingrandimento x20) per ciascuna diapositiva e misurata come area occupata da acini ghiandolari /superficie totale x 100. Il numero delle ghiandole peribiliari è stato contato in un caso, cieco in sei campi che non si sovrappongono (ingrandimento x20) per ogni diapositiva. L'analisi semi-quantitativa

analisi di colorazione immunofluorescenza della cultura 2D è stata effettuata da due osservatori indipendenti in modo cieco, l'abbondanza di cellule colorate positivamente è stato dato come percentuale di cellule positive (Glasser SS et al, 2009; Onori P et al 2010) .

Informazioni riguardo agli anticorpi e diluizioni sono contenute nella tabella supplementare N° 1.

Analisi dell'mRNA attraverso quantitative Real Time PCR.

Tessuto biliare, sospensioni di cellule fresche isolate, cellule prelevate da culture di cellule biliari bidimensionali sono state lisate per testare l'espressione di mRNA specifici in RT-PCR. L' RNA totale è stato estratto usando RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) come indicato dal produttore. La trascrizione inversa è stata ottenuta con SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). La PCR è stata condotta con ABI Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystems) come segue: 50°C 2 min; 95°C 10 min; 95 °C 15 s -> 60 °C 30 s, 40 cicli. Le specifiche dei primers utilizzati sono contenuti nella tabella supplementare N° 2.

Saggi funzionali dopo differenziazione.

L'espressione genica, l'espressione proteica e le funzioni delle cellule differenziate *in vitro* sono state valutate attraverso RT-PCR ed IF come descritto sotto.

A. Epatociti

1. RT-PCR e immunofluorescenza per albumina, alfa-fetoproteina, transferrina, tirosina aminotransferasi, cytochrome P450 3A4
2. Produzione e secrezione nel medium di albumina.

B. Colangiociti

1. RT-PCR e immunofluorescenza gamma glutamil transpeptidasi (GGT), secretin receptor (SR)

C. Insule Pancreatiche

1. RT-PCR e immunofluorescenza per glucagone, somatostatina, C-Peptide (insulina).
2. Stimolazione secrezione c-peptide mediata da somministrazione di glucosio.

Studio *in vivo* delle cellule isolate per EpCAM.

- **Trapianto nel fegato murino.**

Le hGSCs sono state trapiantate attraverso infusione vascolare portale ottenuta con iniezione intrasplenica in topi (SCID) immunodepressi (N = 3). Il loro attecchimento e la loro differenziazione in cellule parenchimali epatiche umane sono state valutate tramite lo studio istologico e esame immunoistochimico. Topi maschi SCID tra le 8 e le 10 settimane di vita sono stati nutriti con una dieta normale, sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di Ketamina (90-120 mg per kg di peso corporeo) e di Xylazina (10 mg per kg di peso corporeo). Una volta anestetizzati, usando tecniche asettiche, è stata creata una piccola incisione al di sotto del margine costale sinistro e dello sterno, la milza è stata esposta con un bastoncino di cotone. La sospensione cellulare, costituita da 500.000 hGSCs sospese in 100 µl di RPMI 1640 più gel di acido ialuronico (50x), è stata iniettata nella milza in maniera da poter raggiungere per via portale il parenchima epatico.

Le suture sono state eseguite utilizzando materiali riassorbibili. Gli animali sono stati strettamente monitorizzati fino alla guarigione e sono stati consentiti liberi accessi al cibo e all'acqua. Non è stata osservata mortalità. I protocolli di studio sono stati redatti in accordo con le nostre linee guida istituzionali. I topi sono stati sacrificati un mese dopo il trapianto attraverso dislocazione cervicale preceduta da anestesia e il fegato è stato asportato. Pezzi di tessuto sono stati fissati per l'analisi istologica. Per determinare se le hGSCs sono attecchite e differenziate sono stati analizzati i classici

marker del fegato adulto, questi includevano l'albumina umana (abcam UK, Cambridge, cod AB2406), Hep-Par-1 umano (DAKO ITALY Milan, cod F0117) e CK-7 umana (DAKO ITALY Milan, cod M7018), secretin receptor (Santa Cruz, sc-26633). I topi per i controlli (N=3) sono stati trattati con medium (RPMI più gel di acido ialuronico 50x) senza cellule. Le hGSCs sono state inoltre trapiantate in modelli sperimentali di cirrosi epatica indotta da tetracloruro di carbonio (CCL₄). N =7 topi SCID sono stati trattati con iniezione intraperitoneale di CCL₄ alla dose di 0,2 mL/100 g di peso corporeo in olio d'oliva (1:1) due volte a settimana per 7 settimane. Al termine delle 7 settimane N = 4 topi sono stati sottoposti ad infusione vascolare portale ottenuta con iniezione intrasplenica diretta di circa 500.000 cellule sospese in acido ialuronico. N = 3 topi sono stati trattati con la sola infusione della sospensione di base per i controlli. Gli animali sono stati strettamente monitorizzati ed è stato consentito libero accesso a cibo ed acqua. Dopo 1 mese dall'iniezione i topi sono stati sacrificati. Per determinare l'effetto del trapianto è stata valutata la funzionalità epatica attraverso l'analisi dei livelli sierici di bilirubina, transaminasi ed albumina umana. Al sacrificio, gli animali sono stati valutati per l'attecchimento, la proliferazione, la differenziazione delle hGSCs iniettate. Lo stadio della fibrosi epatica e il peso corporeo sono stati comparati.

Controlli positivi

La linea cellulare immortalizzata umana isolata da seminoma (NTERA-2 clone D1) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA codice: 01071221) è stata utilizzato come controllo positivo per i marcatori pluripotenza (SOX2, OCT4A e Nanog), per citometria a flusso, coltura cellulare ed RT-PCR.

La linea pancreatica umana di cellule beta (linea PANC-1 cellule ibride 1.1B4) è stato utilizzata come controllo per esperimenti sulla differenziazione delle isole pancreatiche (Sigma-Aldrich, cat. N.100128101).

Epatociti umani primari (sistemi cellulari Clonetics™ epatociti umani H NHEPS™ Cells, Codice: CC-2591S) sono stati acquistati da Lonza (Basilea, Svizzera) e utilizzati come controllo positivo per gli esperimenti sulla differenziazione epatocitaria.

Metodi e soluzioni di criopreservazione, scongelamento e saggio di vitalità.

Le cellule sono state staccate dai vari supporti di plastica per essere raccolte e criopreservate. Per staccare le cellule sono stati effettuati due lavaggi utilizzando il DPBS (Gibco # 14190 -094) prima dell'utilizzo di tripsina (Gibco # 12604-021). La tripsina, affinché potesse sortire il suo effetto, è stata collocata all'interno dell'incubatore, questo perché svolge la sua funzione a 37°C. Mentre la tripsina staccava le cellule adese viene preparato, all'interno di una falcon da 50 ml, una soluzione contenente terreno e una quota, tra il 20 e il 30% di siero fetale bovino (FBS), ciò è stato fatto perché l' FBS è in grado di inattivare la tripsina evitando così gravi danni alle cellule. Il passaggio successivo è la centrifugazione al fine di eliminare dalla sospensione cellulare tutti i possibili prodotti di scarto o eventuali molecole dannose, dopo l'eliminazione del supernatante il pellet è stato sospeso in 10 ml di terreno e le cellule sono state contate tramite l'utilizzo del trypan blue (Sigma # 302643-25G). Quindi è stata effettuata una centrifuga a 270 g per 10 minuti, trascorso tale periodo di tempo è stato eliminato il supernatante e si aggiunge 1 ml di soluzione di criopreservazione, il pellet risospeso con la soluzione congelante è stato conservato all'interno delle nunc (Unimed # 6 302 598), queste sono state posizionate all'interno del di Nalgene Cryo 1°C Freezing Container CAT No 5100-0001.

La metodica di criopreservazione utilizzata è quella classica descritta nell'introduzione, abbassamento della temperatura di 1°C al minuto fino a -80°C, questa è stata ottenuta tramite l'utilizzo di Nalgene Cryo 1°C Freezing Container CAT No 5100-0001 in cui veniva aggiunto 250 ml di isopropano; dopo 24 ore le cellule sono state collocate in azoto liquido a -196°C.

Durante l'esperimento sono state utilizzate diverse soluzioni che differiscono in composizione, ogni soluzione è stata preparata il giorno stesso del suo utilizzo e in quantità di 10 ml ciascuna.

Le soluzioni usate per la criopreservazione sono le seguenti:

- ❖ Soluzione 1: Kubota Medium, DMSO (10%), albumina ricombinante umana (15%), acido ialuronico (0.1%)
- ❖ Soluzione 2A: Kubota Medium, acido ialuronico (0.1%), DMSO (10%)
- ❖ Soluzione 2B: Kubota Medium, acido ialuronico (0.05%), DMSO (10%)
- ❖ Soluzione 3: Kubota Medium, DMSO(10%), albumina umano ricombinante (15%)
- ❖ Soluzione Controllo: Kubota Medium, DMSO (10%), albumina umana ricombinante (1.5%)

L'acido ialuronico è stato generato utilizzando 200 mg di Sodium Hyaluronate 1.0 Gram sospesi in 30 ml di RPMI (Gibco # 11875-093), come albumina si è utilizzata quella della Octalbin 20% albumina umana 200 mg/ml da 50 ml.

Le cellule congelate nelle Nunc (Unimed # 6 302 598) sono state scongelate strofinandole tra le mani per scaldarle, dopo averle scaldate è stato aggiunto 1 ml di terreno di coltura con il siero fetale bovino (FBS). Una volta aggiunto il terreno tutto il contenuto della Nunc è stato trasferito all'interno di falcon da 15 ml, grazie all'utilizzo di Gilson 1000, inserito il contenuto di ogni nunc in una falcon da 15

differente è stata effettuata una centrifuga a 300 g per 10 minuti. Ultimata la centrifuga è stato eliminato il supernatante, in questo modo si è allontanato il DMSO che era stato utilizzato per la criopreservazione. L'ultimo passaggio è la sospensione del pellet cellulare con il volume necessario per piastrare, utilizzando il terreno di coltura, KM, con aggiunta del 10% di siero.

La vitalità cellulare è stata determinata dal saggio di esclusione del Trypan Blue (Sigma # 302643-25G), con il quale si colorano di blu le cellule in apoptosi o necrosi ma non le cellule vitali. Tale colorante si usa in rapporto 1:1 con la soluzione cellulare. I campioni sono stati scongelati velocemente e poi diluiti lentamente con terreno di coltura fino a portare la concentrazione del DMSO inferiore allo 0.5%. La conta cellulare è stata effettuata tramite l'utilizzo di FAST-READ 102 (Biosigma # BSV100); si contano le cellule vitali all'interno della griglia, poi si divide per il numero di griglie in cui sono state contate le cellule e si moltiplica per 20000, il numero che esce è la densità cellulare per ml di sospensione cellulare.

Estrazione dell'RNA e Real-Time PCR, Differenziamento e Immunofluorescenza delle cellule criopreservate.

Per effettuare lo studio analitico dell'espressione genica è stata fatta l'estrazione del RNA dei campioni scongelati, il controllo è dato dalla sospensione cellulare in cui è stato aggiunto Trizol Reagent (Ambion # 15596026) durante la fase di congelamento e non una soluzione criopreservante.

Il primo passaggio dell'estrazione del RNA è omogeneizzare il con 0.5 ml di Trizol Reagent (Ambion # 15596026), finché non sembra omogeneo, e successivamente aggiungere altri 0.5 ml di Trizol Reagent. I campioni vengono, così, lasciati a temperatura ambiente per 5 minuti, nel caso ci siano residui solidi o grassi effettuare una centrifuga a 12000 g per 10 minuti. Il passaggio successivo è l'aggiunta di 200 µl

di 1-Bromo-3-Cloro Propano, e successiva vorticazione per 15 secondi circa fino ad ottenere un colorito omogeneo del campione, alla fine di questo passaggio si lascia riposare a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente centrifugare per 15 minuti a 12000 g, e poi separare le due fasi. Finita la separazione delle due fasi, si etichetta e conserva il DNA a +4°C e si lavora solo sul RNA. Si aggiungono 500 µl di isopropanolo, quindi si lascia riposare a temperatura ambiente per 10 minuti, a metà del tempo si deve rovesciare la provetta. Effettuare una centrifuga a 12000 g per 20 minuti e successivamente mettere per 30 minuti in congelatore a -20°C. Scaduto il tempo effettuare la centrifuga a 12000 g per 15 minuti. Finita la centrifuga bisogna eliminare il supernatante e successivamente aggiungere 1 ml di etanolo al 75%, poi lasciar riposare per 10 minuti in congelatore a -20°C. Nel passaggio successivo si effettua una centrifuga a 9000 g per 5 minuti e poi si elimina il supernatante, una volta completato il passaggio si lasciano ad asciugare le provette capovolte, finché tutte le gocce non si sono asciugate. Quando si sono asciugate si aggiunge 55 µl di acqua a 60°C e si mescola bene in modo tale di far sciogliere l'RNA. Dopo di che si lascia il tutto per 30 minuti a temperatura ambiente, finito il tempo si mette nel congelatore a -20°C per conservare il campione.

Effettuata l'estrazione del RNA, si effettua una real-time PCR al fine di quantificare analiticamente i cicli soglia sia delle molecole di adesione (ITGB1, ITGB4, CD44, CDH1) che dei marcatori delle cellule pluripotenti e staminali endodermali (PDX1, OCT4, SOX17), l'espressione dei risultati è calcolata rispetto all'espressione del gene GAPDH, un gene housekeeping.

Le cellule scongelate sono state piastrate e coltivate nelle Chamber Slide Sistem (Nunc # 177402) per una settimana con il Kubota Medium, al fine di permettere loro la ripresa funzionale successiva al trauma dello scongelamento. Passato tale periodo si

è effettuata il differenziamento cellulare, tramite l'utilizzo di terreni differenziativi, nei lineage epatocitario, pancreatico, e colangiocitario. Le cellule sono state mantenute per 15 giorni nei terreni differenziativi, e il terreno veniva cambiato ogni 3 giorni.

Analisi statistiche.

Gli esperimenti sono stati ripetuti 3-5 volte (in alcuni casi anche più volte) con duplicati o triplicati per ogni condizione.

Le barre di errore rappresentano o la deviazione standard o l'errore standard e sono stati indicati ad ogni esperimento. Le p sono state calcolate usando il Test del T Student.

Risultati

Studio *in situ* dell'espressione genica e dei marcatori cellulari nelle cellule della colecisti umana adulta.

Nelle colecisti adulte normali (N=19) e patologiche (N= 14), l'epitelio di superficie è costituito da un singolo strato di cellule colonnari. La mucosa "si piega" in tante piccole cripte che prendono il nome di Seni di Rokitansky-Ashoff (seni R-A).

Le cripte della mucosa sono più profonde nella colecisti patologica ($668,5 \pm 172,5 \mu$) rispetto alla colecisti normale ($254,3 \pm 78,1 \mu$; $p < 0.001$) . Di conseguenza i seni di R-A sono più estesi nel tessuto patologico ($16.411,18 \pm 4.397,61 \mu^2$) rispetto al tessuto normale ($7626,6 \pm 4191,4 \mu^2$; $p < 0,05$) μ . La colecisti è priva di ghiandole peribiliari (PBG). Nelle colecisti normali, l'esame immunohistochimico ha dimostrato la presenza di cellule EpCAM + sull'epitelio di superficie, per lo più situate all'interno delle cripte della mucosa (fig 2a). Le cellule EpCAM+ localizzate all'interno delle cripte della mucosa sono positive anche per PCNA, un marker di proliferazione cellulare. Nelle sezioni seriali, le cellule EpCAM+ co-esprimono marcatori di

staminalità intestinale (LGR5) e di cellule staminali / progenitrici bilio-pancreatiche (PDX1 e SOX17) . Il numero di cellule EpCAM+,LGR5+, PDX1+ e SOX17+ è più elevato nelle colecisti patologiche rispetto alle colecisti normali e localizzate non solo nelle cripte ma verso l'apice della rugae mucosale.(Fig 2b.) Le cellule EpCAM+ presentano una maggiore co-espressività per le cellule positive per LGR5, come ha mostrato l'immunofluorescenza su campioni di tessuto e l'esame citofluorimetrico (FC) sulle cellule appena isolate, dopo sorting per EpCAM (fig.3) .

L' esame citofluorimetrico sulle cellule appena isolate, "sortate" per EpCAM, ha indicato che solo una sotto-popolazione ($\approx 10\%$) di cellule EpCAM+ co-esprime marcatori di pluripotenza (SOX2, OCT4, NANOG), probabilmente la componente staminale; mentre le altre cellule EpCAM+ , quelle con una minore espressione dei marcatori di pluripotenza saranno probabilmente cellule progenitrici. (Fig 3.a)

Le cellule EpCAM + della colecisti sono, quindi , un mix di cellule staminali e progenitrici. L'End-point della RT - PCR ha confermato l'espressione dei geni di pluripotenza e non ha evidenziato differenze significative tra colecisti normali e patologiche. (Fig. 3. b)

Isolamento e coltura di cellule staminali/progenitrici da colecisti adulte (hGSCs).

La metodica ha determinato, in ogni caso, l'isolamento di cellule vitali con numerosità media pari circa a 8.000.000 e vitalità media pari circa al 95%. (Fig.4)

E' stato possibile, in ogni caso, ottenere colture primarie da cellule isolate da colecisti. Dopo il *sorting* per EpCAM, sono state isolate una media di 4-5 milioni di cellule da colecisti normali ($4,988,333 \pm 2,6$; vitalità $>90\%$, N= 19) e colecisti patologiche ($4,416,250 \pm 2,4$; vitalità $>85\%$ N=14). La media numerica delle cellule vitali isolate da tessuto normale e tessuto patologico non è significativamente

differente. Gli alti valori di deviazione standard, probabilmente, dipendono dalla qualità del tessuto e dal tempo trascorso tra la rimozione chirurgica e l'inizio del processo di isolamento. L'esame citofluorimetrico ha dimostrato che, dopo sorting per EpCAM, il $29.0 \pm 12.4\%$ delle cellule fresche isolate risultano EpCAM+.

La selezione immunomagnetica ha consentito di arricchire la popolazione di cellule EpCAM + fino al $69.34 \pm 11.2\%$. (Fig. 5) In alcuni casi, abbiamo ottenuto più del 90% di cellule EpCAM positive. Successivamente le cellule EpCAM+ sono state piastrate a una densità clonale di 500 cellule/cm² in un medium di auto-replicazione (Kubota's Medium: KM). In KM, le hGSCs sono capaci di proliferare e di auto-rinnovarsi (Fig.6).

Infatti, come osservato al microscopio, le cellule epiteliali iniziano a proliferare dopo un periodo di 1-2 giorni, arrivando a formare piccoli clusters di 10-15 cellule dopo 6-8 giorni di coltura. Dopo 20 giorni, sono state osservate colonie cellulari più ampie. Ogni colonia è costituita da piccole ed uniformi cellule con elevato rapporto nucleo/citoplasma. La selezione delle cellule EpCAM+ in coltura è avvenuta mediante la sospensione cellulare di cellule non frazionate, seminate in piastre di plastica e in KM. La percentuale di cellule EpCAM+ nella sospensione cellulare è stata del $29.0 \pm 12.4\%$. L'immunofluorescenza e la citofluorimetria hanno dimostrato che, nelle popolazioni cellulari cresciute in coltura, la percentuale di cellule EpCAM+ raggiunge il $82.7 \pm 15.0\%$ ($p < 0.05$ rispetto alle cellule fresche isolate) (fig.7). Le hGSCs in KM, all'immunofluorescenza e alla citofluorimetria, sono anche caratterizzate da alcuni marcatori di cellule staminali. In particolare, l'esame citofluorimetrico mostra che il $61.63 \pm 15.45\%$ di cellule sono EpCAM+/LGR5+ e il $14.85 \pm 9.79\%$ sono cellule EpCAM-/LGR5+ (fig. 7). Inoltre, l'immunofluorescenza ha dimostrato che le cellule in KM sono per lo più positive per PDX1 e SOX17. Infine, un ristretto numero di

cellule, all'immunofluorescenza, risultano positive per i marcatori di pluripotenza SOX 2 e OCT4A(dati non mostrati). L'esame citofluorimetrico evidenzia che il $54.43 \pm 26.31\%$ di cellule sono positive per SOX2 e, in particolare, una percentuale di cellule che va dal 3 al 7% (mean= 4.43 ± 2.5) co-esprime SOX2 e OCT4A(dati non mostrati). La presenza dei marcatori di pluripotenza è stata ulteriormente confermata dalla Real Time-PCR (RT-PCR) (Fig.7).

In generale, in condizioni di auto-replicazione in coltura, la popolazione cellulare predominante ha un fenotipo simile a quello delle cellule staminali endodermiche (EpCAM+/K7+/NCAM+/LGR5+/SOX17+/PDX1+/ SOX2+). E' presente (<10%) anche una sottopopolazione più ristretta di cellule con caratteristiche di pluripotenza (SOX2 + / OCT4A + / NANOG +). Infine, le cellule, in condizioni di auto-replicazione, sono per lo più negative per i marcatori delle cellule epatiche mature (es. albumina, glutamil transpeptidasi, secretina recettore / SR), di cellule mesenchimali (ad esempio desmina, actina muscolo α -liscio), di cellule endoteliali (es. CD31) e di cellule staminali ematopoietiche (es. CD45, CD34) (dati non mostrati).

Studio *in vitro* della capacità differenziativa delle hGSCs verso linee cellulari mature: epatocitarie, colangiocitarie e insule pancreatiche (figure 8, 9).

Nel nostro studio abbiamo valutato la possibile differenziazione delle hGSCs, coltivando queste in mezzi composti da specifici fattori di crescita ed ormoni definiti e scelti su misura per raggiungere uno specifico tipo cellulare maturo. Altre colture cellulari di hGSCs sono state mantenute in coltura con un medium di base senza siero per i controlli. Abbiamo valutato il raggiungimento di tre possibili destini cellulari adulti: epatociti, colangiociti e insule pancreatiche. Dopo sette giorni di cultura le

colonie sono state esaminate al microscopio ottico che ha permesso l'osservazione di caratteristiche morfologiche tipiche delle tre linee cellulari mature. Le cellule differenziate verso la linea colangiocitaria hanno mostrato la formazione di strutture duttulari; la linea epatocitaria ha dato origine ad aggregati di cellule cuboidali strettamente adese l'una all'altra; il terreno specifico per la differenziazione pancreatica ha infine mostrato la formazione di aggregati balloniformi di cellule tondeggianti morfologicamente simili alle isole pancreatiche. Le colonie differenziate con terreno specifico per la crescita epatocitaria dimostravano una positività per l'espressione di albumina e CK-18. L'esame citofluorimetrico ha evidenziato che la percentuale di cellule albumina-positivo erano notevolmente aumentata e che la maggior parte delle cellule erano positive all'albumina umana (85.2 ± 2.29 ; $p < 0.01$ vs KM). Inoltre, la secrezione di albumina è notevolmente aumentata nelle cellule messe in coltura con lo specifico medium differenziativo ($12,09 \pm 1.46$ $\mu\text{g/ml/day}/10^6$ cells) rispetto alle cellule in coltura nel Medium basale (1.45 ± 1.00 $\mu\text{g/ml/day}/10^6$ cells). Infine, la RT-PCR ha evidenziato l'espressione di geni epatociti-specifici. (fig.8)

Già dopo sette giorni di coltura, le colonie indotte verso la differenziazione colangiocitaria hanno mostrato un positività per la co-espressione di CK19 e secretin receptor (fig. 9).

Dopo 14 giorni di coltura nel medium che induce la differenziazione pancreatica, è stata osservata la formazione di "islet like structure", strutture costituite da cellule che esprimono, con forte densità, insulina e glucagone. Queste cellule, in coltura con lo specifico medium differenziativo, sono state esposte a basse (5.5 mM) e ad alte (22mM) concentrazioni di glucosio per stimolare *in vitro* la secrezione di C-peptide.

Si è verificato un incremento della secrezione di C-peptide umano nelle cellule sottoposte a concentrazioni basse di glucosio (0.22 ± 0.036 ng/100,000 cells/120 mins) ed un incremento più marcato nelle cellule sottoposte a concentrazioni alte di glucosio (0.27 ± 0.046 ng/100,000 cells/120 mins, $p < 0.05$). (fig. 9)

Studio *in vivo* del destino delle hGSCs trapiantate nel fegato murino (Fig.10)

I campioni di tessuto epatico ottenuti dai topi SCID trapiantati con circa 500.000 hGSCs sono stati sottoposti all'immunoistochimica, la metodica riconoscendo le cellule trapiantate come cellule positive all'antigene di superficie HepPar-1 umano ne ha dimostrato la presenza di circa il 6,53% \pm 2,5 dell'area totale esaminata. Gli stessi campioni sono stati poi esaminati all'immunofluorescenza che ha confermato l'attecchimento e la differenziazione delle cellule trapiantate evidenziando un'importante positività per l'albumina umana e per HepPar-1 umano. La valutazione della differenziazione verso la linea colangiocitaria è stata condotta con i medesimi esami. L'immunoistochimica ha mostrato come il 12,7% \pm 5,5 di tutte le cellule che formano i dotti biliari del campione esaminato sono risultate positive per CK-7 umana. L'esame immunoistochimico e l'immunofluorescenza non hanno mostrato nessuna immunoreazione per gli stessi markers nei campioni preparati dai topi controllo (N = 3), topi trattati con la sola infusione di medium di base. Gli stessi esami sono stati condotti per la valutazione del destino delle hGSCs trapiantate in topi nei quali era stata indotta cirrosi mediante somministrazione di tetracloruro di carbonio. I risultati preliminari indicano che le hGSCs sono in grado di attecchire, proliferare e differenziare in cellule parenchimali mature anche in condizioni di alto turnover cellulare (CCL4). I test di funzionalità epatica sui campioni di sangue prelevati dai topi CCl₄ trattati con le hGSCs o con epatociti umani maturi o con il solo

veicolo hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di colinesterasi e la riduzione dei livelli di transaminasi (AST/GOT, ALT/GPT) nei topi CCL₄ trapiantati con le hGSCs rispetto a quelli trattati con gli epatociti maturi o con il solo veicolo (Fig. 10) I valori bilirubina e albumina sono risultati normali in entrambi i gruppi. Ed inoltre, è stato osservato che solo i topi trattati con le hGSCs hanno mostrato livelli rilevabili di albumina umana (1.6 ± 1.4 ng/dl (N=3)) (dati non mostrati).

Coltura cellulare di cellule hGSCs post-scongelo

Le cellule congelate nella soluzione basale (10% DMSO, 1.5% albumina umana in KM) per la durata di 30 giorni, sono state scongelate e piastrate in fiasche (Jet Biofil # TCF 012250) alla densità di 10.000 cellule per mL. Quindi sono state fatte crescere per un tempo di 30 giorni in KM; il cambio del terreno di coltura è stato effettuato il giorno dopo lo scongelamento e successivamente ogni 3 giorni. È stato osservato che le hGSCs dopo scongelamento erano in grado di formare colonie cellulari morfologicamente assimilabili a quelle generate dalle cellule non criopreservate (Fig. 11).

Vitalità cellulare delle hGSCs dopo scongelamento

La vitalità cellulare è stata misurata subito dopo lo scongelamento cellulare, prima della coltura cellulare, tramite il saggio di esclusione del Trypan Blue (Sigma # 302643-25G) con l'utilizzo del FAST-READ 102 (Biosigma # BSV100). La percentuale di sopravvivenza è stata calcolata effettuando la differenza tra le cellule vitali congelate e quelle vitali scongelate. I nostri risultati mostrano che la soluzione 1 e la soluzione 3 presentano una differenza significativa rispetto alle altre soluzioni: soluzione 2A, soluzione 2B e la soluzione di controllo. Non è presente nessuna

differenza significativa tra la soluzione 1 e la soluzione 3, anche se è possibile osservare un trend positivo per la soluzione 3. (Fig. 12)

Analisi dell'espressione genica mediante Real-Time PCR delle hGSCs scongelate.

È stata analizzata l'espressione genica delle cellule progenitrici/staminali della colecisti, tramite l'utilizzo della real-time PCR, delle molecole di adesione (CD44, ITGB1, ITGB4, CDH1) e dei marcatori di staminalità (PDX1, SOX17, OCT4). In questo esperimento, il controllo è stato effettuato su campioni di cellule hGSC fresche isolate. Dai dati ottenuti, non è stata osservata nessuna differenza significativa dell'espressione genica delle cellule criopreservate con le diverse soluzioni (Fig. 13,14), ma i vari geni hanno differenti trend di espressione a seconda della soluzione usata. I dati sono stati normalizzati con l'analisi dell'espressione genica del GAPDH.

Formazione e numero di colonie cellulari

I risultati ottenuti dalla vitalità cellulare hanno portato all'esclusione dell'utilizzo delle soluzioni 2A e 2B negli esperimenti successivi.

Dopo aver analizzato la vitalità cellulare, abbiamo voluto osservare quale delle due soluzioni favoriva un migliore attecchimento cellulare e la successiva formazione di colonie; per far ciò si è analizzato quante colonie, considerate come aggregati cellulari aventi più di 1000 cellule, si formavano dopo aver scongelato le cellule. Le colonie cellulari sono state contate dopo una settimana dalla semina cellulare, al fine di permettere alle cellule la ripresa delle funzioni e la formazione di colonie. Il terreno utilizzato è il KM ,privo di idrocortisone. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni tre giorni. (Fig. 15)

Per quanto riguarda la formazione di colonie, dai dati ottenuti si evince che c'è una differenza significativa tra la soluzione 1 e la soluzione 3.

La conta cellulare è stata effettuata mettendo, sotto il microscopio ottico, una chamber slide 8 well (Sigma # C7182-1PAK). Per ogni soluzione sono state usate 3 chamber slide 8 well, utilizzate per effettuare la coltura cellulare dopo lo scongelamento con lente di ingrandimento 10X. Sono state contate le colonie che si erano formate in ogni pozzetto e, infine, si è calcolata la media delle colonie formatesi in tutti i pozzetti per ogni soluzione.

Differenziamento cellulare nelle cellule criopreservate.

Sono stati usati 4 terreni di coltura differenti, tre differenziativi (pancreas medium, epatocita medium, colangiocita medium) ed il KM senza idrocortisone come controllo.

Le cellule sono state poste in coltura ,su plastica, nei diversi terreni differenziativi per 15 giorni, e i vari terreni sono stati cambiati ogni 3 giorni. Dopo pochi giorni era osservabile il differenziamento nei diversi lineage differenziativi in base al terreno utilizzato. Al decimo giorno sono state effettuate fotografie alle cellule differenziate e in via di differenziamento, in modo tale da avere un riscontro sulla successiva immunofluorescenza eseguita dopo il periodo di differenziamento. (Fig. 16)

Discussione

Nella colecisti umana è presente una popolazione cellulare mista di cellule staminali e progenitrici (hGSCs), fenotipicamente simili alle cellule staminali dell'albero biliare umano (hBTSCs). Queste cellule sono presenti in uguale numero nella colecisti normale e in quella patologica e possono essere facilmente isolate e immunoselezionate per EpCAM, secondo protocolli GMP. L'epitelio di superficie della colecisti è costituito da un singolo strato di cellule colonnari, con la presenza di cripte nella mucosa, similmente ai villi intestinali, ma senza la presenza delle ghiandole peribiliari (PBG). Le cellule EpCAM+ sono, per lo più, localizzate all'interno delle cripte della mucosa e presentano markers di attività proliferativa (positività a PCNA). Nelle colecisti patologiche, le cellule EpCAM+ sono presenti in numero maggiore e tendono ad estendersi verso l'apice delle *rugae*, suggerendo l'attivazione del meccanismo di riparazione. Le hGSCs possono essere mantenute per settimane in un Kubota's Medium privo di siero, mostrando i tratti fenotipici delle cellule staminali/progenitrici endodermiche e capacità di espansione clonogenica, caratteristica peculiare delle cellule staminali. In seguito a cultura in mezzi composti da specifici fattori di crescita ed ormoni scelti su misura per raggiungere uno specifico tipo cellulare maturo, le hGSCs cellule si differenziano in epatociti e colangiociti maturi o insule pancreatiche funzionanti secernenti isulina. Il trapianto di hGSCs *in vivo* nei fegati cirrotici di topi SCID, ha dimostrato dapprima l'attecchimento e poi la differenziazione in cellule mature funzionanti, mentre il trapianto di hGSCs in topi

sottoposti a trattamenti che inducono la cirrosi ha mostrato il miglioramento dei marcatori sierici di danno epatico. Rispetto all'albero biliare extraepatico, l'epitelio della colecisti non è dotato di ghiandole peribiliari. Invece, cellule staminali/progenitrici sono presenti all'interno delle cripte della mucosa e si spostano, durante la differenziazione dalle cripte verso l'apice della rugae. Un'alta percentuale di queste cellule EpCAM+ presentano le caratteristiche tipiche delle cellule staminali: a) esprimono i marcatori tipici delle cellule staminali endodermiche (LGR5, PDX1, SOX17) ed i geni di pluripotenza (SOX2,OCT4,NANOG); b) appena isolate, si presentano come cellule indifferenziate che possiedono la capacità di auto-rinnovarsi, di espandere clonogenicamente e possono essere selezionate.; c) in condizioni differenti di coltura, maturano verso lineage di cellule mature; d) *in vivo*, attecchiscono e si differenziano in cellule mature epatiche.

I nostri risultati confermano quelli di studi precedenti in cui è stato dimostrato che le colecisti murine contengono cellule staminali che attecchite nel parenchima epatico possono differenziare in epatociti [11, 12]. Inoltre, i nostri risultati completano recenti studi che indicano la presenza di cellule staminali / progenitrici all'interno dell'albero biliare extraepatico, esprimenti i geni di pluripotenza e dotate di tutte le caratteristiche tipiche delle cellule staminali, quali l'autoreplicazione e la multipotenza [2-4].

L'espressione dei geni di pluripotenza (OCT4,SOX2,NANOG) è stata identificata sia *in situ* che *in vitro* utilizzando diverse metodologie e, insieme alla co-espressione dei marcatori di cellule staminali endodermiche (SOX17,PDX1) e l'espansione clonogenica in KM, conferma la natura di cellule staminali multipotenti delle hGSCs.

Sono state identificate due categorie di cellule staminali/progenitrici: a) una sottopopolazione di cellule staminali, che rappresenta la minoranza, localizzate all'interno delle cripte della mucosa, precisamente nei seni di R-A, che sono EpCAM-

/LGR5-/SOX9+/SOX17+/PDX1+/pluripotency genes++; un'altra sottopolazione di cellule staminali, localizzate anch'esse nei seni di R-A, che sono EpCAM+/LGR5+/SOX9+/SOX17+/PDX1+/pluripotency genes++ e che rappresentano solo il 5-10% delle cellule EpCAM+; e multiple sottopolazioni che sono EpCAM+/LGR5+/SOX9+/SOX17±/ PDX1± e presentano bassi o trascurabili valori di espressione genica di pluripotenza. Sia l'esame immunohistochimico che la RT-PCR hanno dimostrato che non vi è una differenza significativa tra tessuto normale e patologico, in termini di presenza di cellule staminali. Ciò che osserviamo nella colecisti, così come avviene in altri tessuti, dimostra come sia presente una popolazione di cellule staminali "quiescenti", che si attiva e cresce in seguito ad una richiesta di rigenerazione. Inoltre è presente un compartimento trans-amplificante composto di sotto-popolazioni di progenitori che proliferano massivamente in caso di necessità [13]. LGR5 è un marker di staminalità presente nell'intestino tenue e nel colon. Recentemente, è stato dimostrato che LGR5 identifica una popolazione di cellule staminali / progenitrici epatiche che si attiva quando è presente danno tissutale e che genera, durante la fase di riparazione, un numero significativo di epatociti e cellule del dotto biliare. Questa popolazione LGR5+ epatica è in grado di espandersi ampiamente in coltura [15]. La questione irrisolta è quella di capire se le hGSCs derivano dalle ghiandole peribiliari (PBG) localizzate nel dotto cistico o derivano interamente dalle cellule staminali localizzate in fondo alle cripte della mucosa della colecisti. La sottopolazione di cellule staminali/progenitrici della colecisti sono sorprendentemente simili alla sottopolazione di hBTSCs isolate dall'albero biliare extraepatico, alle cellule staminali epatiche (hHpSCs) presenti nel canale di Hering e alle cellule staminali intestinali, localizzate all'interno delle cripte intestinali, ad indicare una comune origine embriologica. Inoltre, numerose evidenze indicano che

meccanismi comuni (fattori di trascrizione) modulano lo sviluppo della colecisti, delle vie biliari e del pancreas. Pertanto, non c'è da sorprendersi se le cellule staminali multi potenti che persistono in età adulta nell'albero biliare extraepatico e quelle della colecisti sono molto simili.

Le hGSCs hanno mostrato la capacità di differenziarsi *in vitro* verso differenti lineage di cellule mature come dimostrato da numerosi test fenotipici e funzionali che mostrano la produzione di epatociti, colangiociti e cellule delle isole pancreatiche.

Abbiamo dimostrato che le hGSCs trapiantate per via vascolare nel fegato di topi SCID con cirrosi da CCL4 sono capaci di attecchire e differenziare in cellule parenchimali mature. Questi studi *in vivo* miravano a soddisfare i principali criteri richiesti per dimostrare la funzione delle hGSCs *in vivo*. Abbiamo, quindi, dimostrato la loro capacità di attecchire nel parenchima epatico e la loro capacità di differenziarsi verso epatociti umani maturi attraverso diversi approcci metodologici.

Gli epatociti, originati dalle hGSCs, sono stati in grado di ripopolare e migliorare la funzionalità del fegato danneggiato, come dimostrato dalla diminuzione delle transaminasi sieriche, dall'aumento della colinesterasi nel siero e, infine, dalla comparsa di albumina umana nel siero. Ancora più interessante è sottolineare che l'effetto benefico del trapianto di hGSCs è superiore rispetto al trapianto di epatociti adulti umani. Per quanto riguarda lo studio della criopreservazione delle hGSCs, è importante sottolineare che una criopreservazione efficace richiede strategie che proteggono i meccanismi di adesione cellulare in aggiunta all'uso di tamponi isotonici, proteine antigelo, antiossidanti e reagenti di congelamento come il DMSO o glicerolo. I metodi esistenti funzionano bene per le sottopopolazioni di cellule emopoietiche che in corso di differenziazione perdono i domini cellulari di adesione alla matrice, diventando libere di muoversi nel fluido ematico. Viceversa, tutte le cellule da organi

solidi sono uniti da miscele complesse di molecole della matrice extracellulare che deve essere enzimaticamente alterata o distrutta per preparare le sospensioni cellulari, rendendo le cellule più sensibili al congelamento e ad altri cambiamenti micro ambientali^[68]. La crioconservazione delle cellule epatiche è rappresentativa delle difficoltà nella crioconservazione di cellule da organi solidi, in quanto facilmente danneggiati dal processo di congelamento e scongelamento^[69]. Inoltre, le condizioni per la crioconservazione delle cellule staminali/progenitrici hanno ulteriori ostacoli oltre quelli delle cellule mature, perché molti fattori usati nei buffer di crioconservazione, quali ad esempio il siero, possono innescare la differenziazione delle cellule verso un fenotipo maturo^[68]. Il nostro lavoro ha dimostrato che questi ostacoli sono superati parzialmente utilizzando medium di crioconservazione senza siero che sono isotonici, contengono DMSO, albumina umana, e un componente della matrice extracellulare come l'acido ialuronico, che è un costituente dominante nelle nicchie di cellule staminali. Ci sono molte pubblicazioni sulla crioconservazione degli epatociti maturi, e più recentemente alcuni lavori si sono concentrati su cellule diploidi e sulla loro capacità di proliferare e di funzionare dopo il congelamento (68,69). Piccoli epatociti di ratto, cellule diploidi di circa ~ 17-18 micron di diametro, sono state mantenute a -80 °C per oltre 6 mesi, ottenendo il 60% di adesione e proliferazione cellulare dopo lo scongelamento^[68]. La crioconservazione degli epatociti umani ha dimostrato l'importanza di un congelamento progressivo con velocità di congelamento lenta e regolare, dopo 30 minuti di pre-incubazione a 37 °C. E' stato dimostrato che il DMSO, tra le sostanze per congelamento, determina maggiore vitalità e adesione degli epatociti maturi (68). Il programma di congelamento progettato per questo studio ha preso in considerazione le evidenze sopradescritte, riuscendo a confermare che sia l'utilizzo di DMSO che il congelamento graduale e

controllato determinano alta percentuale di vitalità delle hGSCs dopo scongelamento. In questo studio inoltre ci siamo concentrati sull'utilizzo di sostanze potenzialmente utilizzabili in protocolli accettati per la terapia umana e quindi conformi alle Good Manufacturing Practice (GMP). Infatti, abbiamo evitato l'utilizzo di siero fetale bovino, il quale è stato associato alla contaminazione con virus animali. L'assenza di siero è una caratteristica particolarmente rilevante in quanto è stato dimostrato che questo determina induzione della differenziazione di cellule staminali^[68]. Nel nostro lavoro abbiamo voluto analizzare il comportamento delle hGSCs dopo scongelamento rispetto, ad aspetti generali della biologia cellulare, come la vitalità cellulare e il mantenimento dell'espressione genica, e ad aspetti peculiari delle hGSCs, come la potenzialità differenziativa. Inoltre, in maniera inaspettata abbiamo dimostrato come l'utilizzo di acido ialuronico possa determinare un significativo incremento dell'adesione cellulare *in vitro* e della proliferazione in coltura. Dai dati ottenuti con la vitalità cellulare abbiamo osservato che le soluzioni 1 e 3 hanno determinato un significativo incremento della vitalità cellulare rispetto alla soluzione di controllo e alle soluzioni 2A e 2B. Al riguardo della vitalità delle cellule dopo scongelamento, il nostro studio ha quindi dimostrato chiaramente che l'aggiunta di concentrazioni elevate di albumina umana (15% rispetto a 1,5%) ha determinato un significativo incremento della vitalità cellulare dopo lo scongelamento. In precedenza Terry et al.^[69] avevano proposto che l'albumina umana sierica poteva rappresentare una alternativa all'utilizzo del siero fetale ipotizzando che gli alti livelli di albumina contenuti nel siero fossero alla base dell'effetto crioprotettivo del siero. In maniera molto interessante il nostro studio ha comparato diverse concentrazioni di albumina umana ottenendo come risultato la conferma dell'effettivo ruolo dell'albumina umana nell'ottimizzazione di protocolli di criopreservazione. L'incremento della vitalità

cellulare nelle soluzioni 1 e 3, non ha trovato conferma nei dati ottenuti attraverso Real-Time PCR. Infatti, è stato possibile osservare oscillazioni dell'espressione dei geni a seconda della soluzione criopreservante utilizzata, senza tuttavia dimostrare l'incremento atteso dell'espressione genica (sia di molecole di adesione sia dei geni di pluripotenza) nelle soluzioni a maggiore vitalità. Tale dato tuttavia va messo in relazione, e quindi soppesato, alla luce del fatto che i risultati della Real-Time PCR non hanno dimostrato una significativa riduzione dell'espressione genica rispetto alle cellule non criopreservate, pur se un chiaro trend di decremento per tutti i geni è evidente. Pertanto nel nostro setting, a differenza di altri studi (68), l'espressione genica non si è rivelata un test riproducibile per la valutazione delle capacità di adesione cellulare e delle potenzialità differenziative. Tuttavia le informazioni provenienti dalla valutazione dell'espressione genica, possono essere anche ottenute dalla valutazione delle capacità di adesione e proliferazione *in vitro* e dalla valutazione funzionale dopo differenziazione *in vitro*. Riguardo alla valutazione dell'adesione *in vitro* è degno di nota che tutte le sottopopolazioni di cellule staminali e progenitori nel fegato esprimono CD44, i recettori per l'acido ialuronico, e che l'apoptosi è incrementata in cellule che vengono staccate dalla loro matrice^[68]. Pertanto, in precedenza Turner et al.^[68] avevano condotto uno studio su cellule staminali/progenitrici epatiche umane (hHpSC) osservando come l'utilizzo di acido ialuronico costituisse una valida supplementazione al fine di una ottimale criopreservazione di hHpCS. In questo lavoro era stato osservato un incremento dell'adesione cellulare *in vitro* e della numerosità delle colonie. Tali dati erano stati messi in relazione all'aumentata espressione di geni adesione cellulare, quali il CD44. Nel nostro lavoro abbiamo valutato soluzioni contenenti concentrazioni di acido ialuronico testate da Turner et al. (0,1% e 0,05% peso/volume) e abbiamo inoltre

testato l'effetto dell'aggiunta di albumina umana alla concentrazione del 15% in una soluzione contenente acido ialuronico alla concentrazione dello 0,1 % (peso/volume). Sorprendentemente abbiamo osservato che le soluzioni 1 e 3 hanno determinato un significativo incremento della vitalità cellulare rispetto alle altre soluzioni, mentre, la soluzione 1 (contenente acido ialuronico) ha determinato un drammatico incremento dell'adesione cellulare e proliferazione *in vitro* determinata attraverso valutazione della numerosità delle colonie ottenute dopo 10 giorni di cultura. Nella nostra ipotesi l'adesione delle cellule all'acido ialuronico attraverso il suo recettore CD44 durante il periodo di congelamento fa sì che le cellule, essendo già ancorate a un substrato presente *in vivo*, abbiano una ripresa più veloce e riescano a formare più facilmente colonie cellulari, le quali in virtù del legame all'acido ialuronico sono più stabili. Infine, come precedentemente dimostrato da Cardinale et al. in cellule fresche^[49], i risultati della caratterizzazione fenotipica confermano l'avvenuto differenziamento delle hGSCs/PCs sottoposte a congelamento nei diversi destini maturi (epatocitario, colangiocitario, e endocrino pancreatico). Questa differenziazione strutturale e fenotipica suggerisce anche una possibile differenziazione in cellule mature funzionanti.

Conclusioni

All'interno delle cripte ghiandolari della colecisti umana sono state individuate popolazioni cellulari che esprimono marcatori di cellule progenitrici biliopancreatiche (SOX17, PDX 1, EpCAM) e di cellule di endoderma primitivo (CXCR4). I risultati dell'analisi morfologica e fenotipica della colecisti patologica sono paragonabili a quelli ottenuti nelle colecisti normali. Cellule, isolate dalla colecisti umana, ed immunoselezionate per EpCAM possiedono capacità di autorinnovamento *in vitro*. Inoltre, quando sono state trasferite in tre distinti medium bidimensionali hanno dato origine a lamine di cellule e a colonie con caratteristiche epatocitarie (espressione e produzione di albumina, CYP3A4 e transferrina); a dotti ramificati di cellule e colonie con caratteristiche colangiocitarie (espressione di CK7 e del recettore per secretina); e ad aggregati di cellule e colonie con caratteristiche di isole pancreatiche funzionanti (stimolazione della secrezione di insulina glucosio-mediata). Un modello murino di cirrosi epatica (topi SCID trattati per 7 settimane con CCL4) è stato sottoposto a infusione intrasplenica di cellule staminali/progenitrici della colecisti umana (human gallbladder stem/progenitor cells, hGSCs). Al termine di un periodo post infusione di 1 mese gli animali sono stati sacrificati e sono stati valutati l'attecchimento, la proliferazione, la differenziazione *in vivo* e l'effetto terapeutico delle hGSCs trapiantate nel modello sperimentale. Abbiamo dimostrato, analizzando i test funzionali sul siero dei topi sacrificati, che solo i topi trattati con le hGSCs mostrano livelli identificabili di albumina umana e che i valori delle transaminasi sono notevolmente diminuiti nei topi trattati con hGSCs per 1 mese.

Inoltre, i topi trattati con le hGSCs mostrano livelli di colinesterasi aumentati rispetto ai topi trattati con il solo veicolo. Questi dati sono fortemente incoraggianti perché dimostrano come le hGSCs, in termini sierologici, migliorano la funzionalità epatica dei topi trattati. La criopreservazione attraverso abbassamento di un 1°C al minuto fino a -196°C in azoto liquido è una metodica efficace per il congelamento di cellule staminali/progenitrici, comprese le cellule staminali/progenitrici della colecisti umana adulto. Inoltre, dalle prove sperimentali è stato evidenziato che:

1) l'utilizzo di soluzioni contenenti albumina umana al 15% (peso/volume) consente l'ottenimento di una vitalità elevata (circa 80%);

2) la criopreservazione in soluzione contenente albumina umana e acido ialuronico aumenta significativamente l'adesione in coltura e la crescita *in vitro*;

3) i metodi identificati in questo studio preservano la multipotenzialità differenziativa endodermica delle cellule staminali/progenitrici della colecisti umana sottoposte a criopreservazione.

Nel nostro lavoro l'acido ialuronico aumenta l'adesione cellulare e la proliferazione *in vitro*.

Le terapie cellulari delle malattie epatiche o del diabete mellito necessitano di nuove fonti cellulari al fine di una effettiva transizione verso programmi clinici efficaci. Le hGSCs sono facilmente isolabili da tessuti umani di donatori di ogni età, anche in condizioni di good manufacturing practice (GMP) già accettate per la terapia umana. Data l'ampissima disponibilità dei tessuti di origine e le caratteristiche biologiche di multipotenzialità endodermica da noi dimostrate, le hGSCs hanno un enorme potenziale per la medicina rigenerativa del fegato e del pancreas, compreso il diabete. I risultati ottenuti in questo studio sono immediatamente utilizzabili per la creazione di banche di hGSCs che possono

essere conservate e utilizzate in pazienti con grave e letale compromissione della funzione del fegato, i quali spesso non sopravvivono all'attesa del trapianto di fegato. A tal riguardo presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Umberto I sono stati già eseguiti in sicurezza trattamenti cellulari con BTSC isolate dall'albero biliare umano.

I nostri risultati, quindi, potrebbero aprire prospettive future per un potenziale ruolo della colecisti come fonte di cellule staminali e progenitrici nella medicina rigenerativa.

Bibliografia

1. Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, et al. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 1997; 38, 552–570.
2. Terada T, Morita T, Hosono M, et al. Pancreatic enzymes in the epithelium of intrahepatic large bile ducts and in hepatic bile in patients with extrahepatic bile duct obstruction. *J Clin Pathol* 1994; 47, 924–927.
3. Tan, C. E. & Moscoso, G. J. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 11 and 25 weeks of gestation: a way to understanding biliary atresia. Part 2. *Pathol Int* 1994;44, 600–610.
4. Tan CE, Vijayan V. New clues for the developing human biliary system at the porta hepatis *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2001;8:295-302.
5. Roskams T, Desmet V. Embryology of extra and intrahepatic bile ducts, the ductal plate. *Anat Rec* 2008; 291: 628–35.
6. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, et al. The biliary tree--a reservoir of multipotent stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9:231-40.
7. Rochefort, N. L. & Konnerth, A. Genetically encoded calcium sensors come of age. *Nat Methods* 2008; 5, 761–762.
8. Beloussov, L. V. & Gordon, R. Preface: Developmental morphodynamics—bridging the gap between the genome and embryo physics. *Int J Dev Biol* 2006; 50, 79–80..
9. Kuver R., Savard CE, Lee SK, et al. Murine gallbladder epithelial cells can differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293,G944–G955.
10. Aikawa M et al. Regeneration of extrahepatic bile duct--possibility to clinical application by recognition of the regenerative process. *J Smooth Muscle Res* 2007;43, 211–218.

11. Spence JR et al. Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells Dev Cell 2009; 17, 62–74.
12. Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. Nat Rev Genet 2008;9:329-40.
13. Wandzioch E, Zaret KS. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. Science 2009; 324, 1707–1710.
14. Gittes GK. Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review, Dev. Biol. (2008), doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.024.
15. Dutton JR, Chillingworth NL, Eberhard D, et al. Beta cells occur naturally in extrahepatic bile ducts of mice. J Cell Sci 2007;120(Pt 2):239-45.
16. Chen, C. S. et al. Characterization of an *in vitro* differentiation assay for pancreatic-like cell development from murine embryonic stem cells: detailed gene expression analysis. Assay Drug Dev Technol 2011; 9, 403–419.
17. Eberhard D, Tosha D, Slack JM. Origin of pancreatic endocrine cells from biliary duct epithelium. Cell Mol Life Sci 2008;65,3467–3480.
18. Youson JH, Al-Mahrouki A. Ontogenetic and phylogenetic development of the endocrine pancreas (islet organ) in fish. Gen Comp Endocrinol 1999;116, 303–335.
19. Fukuda, A. et al. Ectopic pancreas formation in Hes1 -knockout mice reveals plasticity of endodermal progenitors of the gut, bile duct, and pancreas. J. Clin. Invest 2006; 116, 1484–1493.
20. Sumazaki, R. et al. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. Nat Genet 2004; 36, 83–87.
21. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, et al. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97, 1607–1611.
22. Yang L, et al. *In vitro* transdifferentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99, 8078–8083.
23. Kurumaya H, Ohta G, Nakanuma Y. Endocrine cells in the intrahepatic biliary tree in normal livers and hepatolithiasis. Arch Pathol Lab Med 1989;113:143-7.
24. Bahadir B, et al. Ectopic pancreas associated with choledochal cyst and multiseptate gallbladder. Pediatr Dev Pathol 2006; 9,312–315.

25. Hoang MP, Murakata LA, Padilla-Rodriguez AL, et al. Metaplastic lesions of the extrahepatic bile ducts: a morphologic and immunohistochemical study. *Mod Pathol* 2001; 14, 1119–1125.
26. Terada T, Nakanuma Y. Pathologic observations of intrahepatic peribiliary glands in 1,000 consecutive autopsy livers: IV. hyperplasia of intramural and extramural glands. *Hum Pathol* 1992; 23, 483–490.
27. Fujioka, Y. et al. Multiple hilar cysts of the liver in patients with alcoholic cirrhosis: report of three cases. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12, 137–143.
28. Terasaki S, Nakanuma Y, Unoura M, et al. Involvement of peribiliary glands in primary sclerosing cholangitis: a histopathologic study. *Intern Med* 1997;36:766-770.
29. Kubota H, Reid LM. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:12132-7.
30. Wauthier E, Schmelzer E, Turner W, et al. Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. *Methods Cell Biol.* 2008;86:137-225.
31. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med.* 2007;204:1973-87.
32. Turner R, Lozoya O, Wang Y, et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* 2011; 53, 1035–1045.
33. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology.* 1999; 30: 1425-1433.
34. Forbes SJ, Newsome PN. New horizons for stem cell therapy in liver disease. *J Hepatol* 2012;56:496-469
35. Khan AA, Shaik MV, Parveen N, et al. Human fetal liver-derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end-stage decompensated liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2010; 19: 409-418.
36. Puppi J, Strom SC, Hughes RD, et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 2012; 21: 1-10.
37. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, et al. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:288-298.

38. Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* 2008; 135: 438-450.
39. Xu YQ, Liu ZC. Therapeutic potential of adult bone marrow stem cells in liver disease and delivery approaches. *Stem Cell Rev.* 2008 Summer;4:101-112.
40. Xiao X, Chen Z, Shiota C, et al. No evidence for β cell neogenesis in murine adult pancreas. *J Clin Invest.* 2013;123:2207-17.
41. Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:51-59.
42. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008; 132: 661-680.
43. D'Amour, KA, Bang AG, Eliazar S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2006; 24: 1392-1401.
44. Semeraro R, Carpino G, Cardinale V, et al. Multipotent stem/progenitor cells in the human foetal biliary tree. *J Hepatol* 2012; 57:987-994.
45. Callea F, Sergi C, Fabbretti G, et al. Precancerous lesions of the biliary tree. *J Surg Oncol Suppl.* 1993; 3: 131-133.
46. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, et al. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8, 512–522.
47. Nakanuma Y, Leong AS-Y, Sripa B, Ponchon T, Vatanasapt V, Ishak KG. 2000. Intrahepatic cholangiocarcinoma. In Stanley R. Hamilton Lauri A. Aaltonen (ed), *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. World Health Organization Classification of Tumours.*
48. Farges O, Fuks D, Le Treut YP, et al. AJCC 7th edition of TNM staging accurately discriminates outcomes of patients with resectable intrahepatic cholangiocarcinoma: By the AFC-IHCC-2009 study group. *Cancer.* 2011; 117: 2170-2177.
49. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology* 2011;54:2159-72.
50. Carpino G, Cardinale V, Onori P, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *J Anat* 2012;220:186-99.

51. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, et al. Multipotent stem cells in the biliary tree. *Ital J Anat Embryol.* 2010;115(1-2):85-90.
52. Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC, et al. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World J Gastrointest Oncol* 2010;2:407-416
53. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, et al. Mucin-producing cholangiocarcinoma might derive from biliary tree stem/progenitor cells located in peribiliary glands. *Hepatology* 2012;55:2041-2.
54. Carpino G, Cardinale V, Reid L, et al. Cells of origin and cancer stem cells in cholangiocarcinoma. *Transl Gastrointest Cancer* 2012;1:33-43.
55. Cardinale V, Carpino G, Reid L, et al. Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World J Gastrointest Oncol.* 2012;4:94-102
56. Cardinale V, Carpino G, Reid LM, et al. Cholangiocarcinoma: A cancer in search of the right classification. *Hepatology.* 2012;56:1585-6.
57. Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, et al. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol* 2011;2, 419–427.
58. Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 2008; 47,1544–1556.
59. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med.* 2006;12:410-6.
60. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene.* 2006;25:3818-22.
61. He XR, Wu XP. Difference in biological characteristics and sensitivity to chemotherapy and radiotherapy between intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma cells *in vitro*. *Chin Med Sci J.* 2008; 23: 54-59.
62. Guedj N, Zhan Q, Perigny M, et al. Comparative protein expression profiles of hilar and peripheral hepatic cholangiocarcinomas. *J Hepatol.* 2009; 51: 93-101
63. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology.* 2012;55:1876-88.

64. Aishima S, Kuroda Y, Nishihara Y, et al. Proposal of progression model for intrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathologic differences between hilar type and peripheral type. *Am J Surg Pathol.* 2007; 31: 1059-1067.
65. Fava G, Marzioni M, Benedetti A, et al. Molecular pathology of biliary tract cancers. *Cancer Lett.* 2007; 250: 155-167
66. Marzioni M, Saccomanno S, Agostinelli L, et al. PDX-1/Hes-1 interactions determine cholangiocyte proliferative response to injury in rodents: possible implications for sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* DOI:pii: S0168-8278(12)00903-8. 10.1016/j.jhep.2012.11.033.
67. Strobel O, Rosow DE, Rakhlin EY, et al. Pancreatic duct glands are distinct ductal compartments that react to chronic injury and mediate Shh-induced metaplasia. *Gastroenterology* 2010;138, 1166–1177.
68. Hyaluronan-supplemented buffer preserve adhesion mechanisms facilitating cryopreservation of human hepatic stem/progenitor cell; Racheal A. Turner, Gemma Mendel, Eliane Wauthier, Claire Barbier, Lola M. Reid
69. Terry C., Dhawan A., Ragai R. M., Hughes R. D., Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of art. *Cryobiology.* **53**, 149-159, (2006)
70. Cryopreservation of human hepatocytes for clinical use; Ragai R. Mitry, Sharon C. Lehec, Robin D. Hughes

Parte iconografica

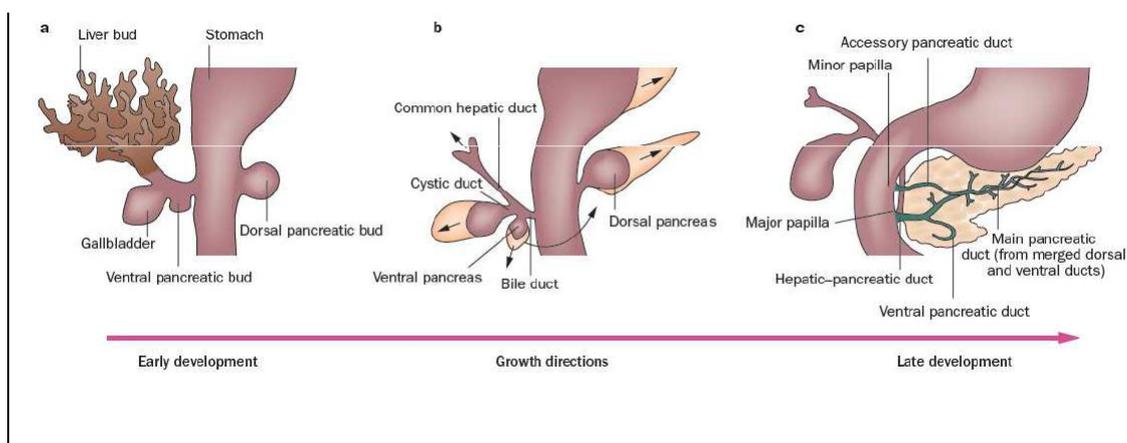
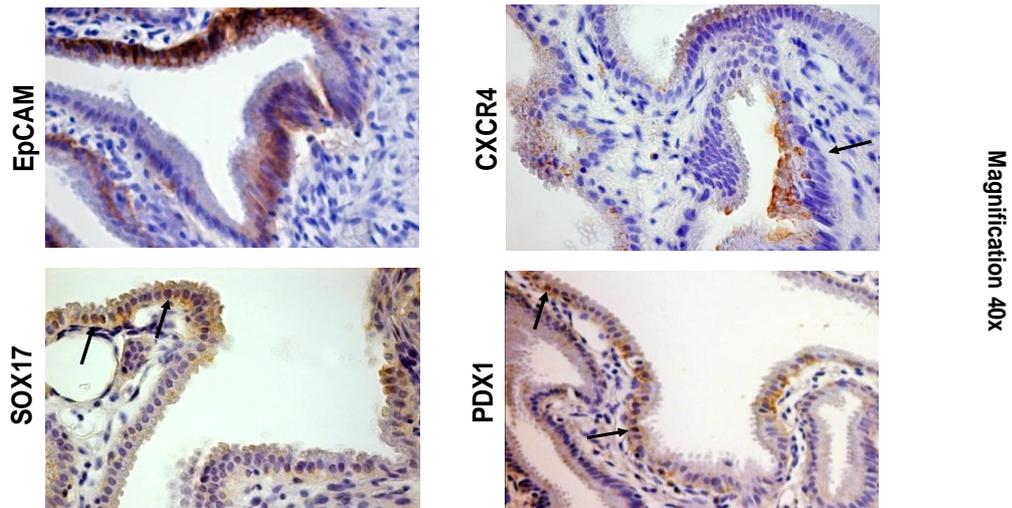


Figura 1. Embriogenesi del fegato, del pancreas e dell'albero biliare.

Lo sviluppo embrionale del fegato, del pancreas e delle vie biliari è innescato dalla proliferazione endodermica. (A) Il sistema biliare (colecisti e dotto cistico) si sviluppa inizialmente come una struttura tubulare (pars cistica) derivante dall'allungamento e modellamento della porzione caudale del diverticolo epatico. (B) Il pancreas dorsale e ventrale si fondono insieme dopo la rotazione in senso orario della gemma ventrale attorno alla parte caudale dell'intestino primitivo. (C) Il pancreas è prevalentemente drenato attraverso il dotto pancreatico ventrale, il quale si unisce al dotto biliare comune a livello della papilla maggiore. Il dotto pancreatico dorsale drena nel dotto biliare comune a livello della papilla minore. Il dotto epato-pancreatico comune si forma dall'unione del dotto biliare e del dotto pancreatico ventrale. Il dotto pancreatico principale deriva dalla fusione dei dotti pancreatici dorsale e ventrale.

GSCs nelle colecisti umane normali e patologiche

Marcatori dei progenitori bilio-pancreatici e dell'endoderma primitivo



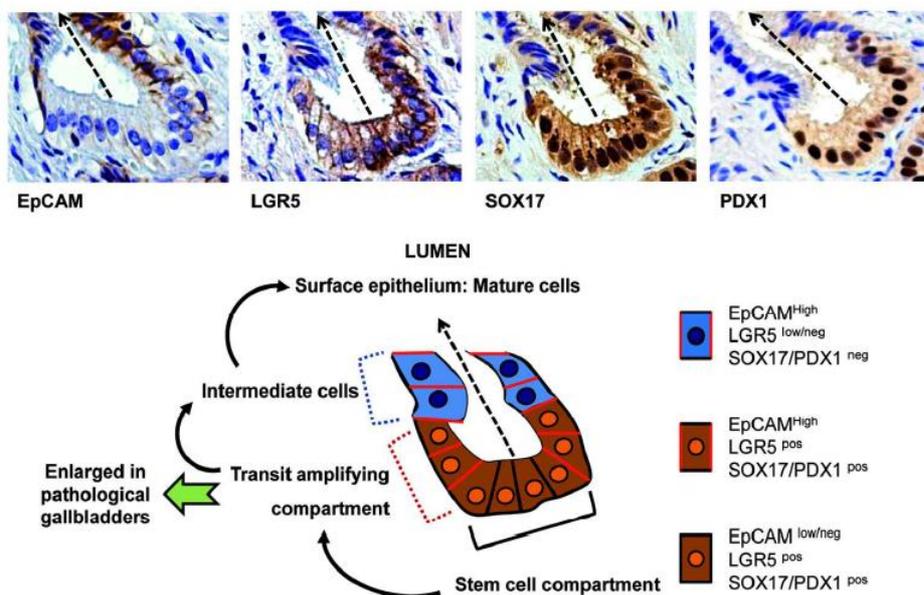
L'analisi morfometrica semiquantitativa (Onori et al. Int J Cancer. 2010) ha evidenziato che circa il 25% delle cellule dell'epitelio di superficie della colecisti snon EpCAM+. Non sono state evidenziate differenze tra tessuto normale e patologico.

Fig. 2a. Studio in situ.

Immunoistochimica dei marker di cellule staminali in colecisti normali e patologiche.

L'immunoistochimica di sezioni seriali di tessuto ha dimostrato la presenza di cellule che co-esprimono i marcatori di cellule staminali endodermiche (EpCAM/SOX17/PDX1/CXR4).

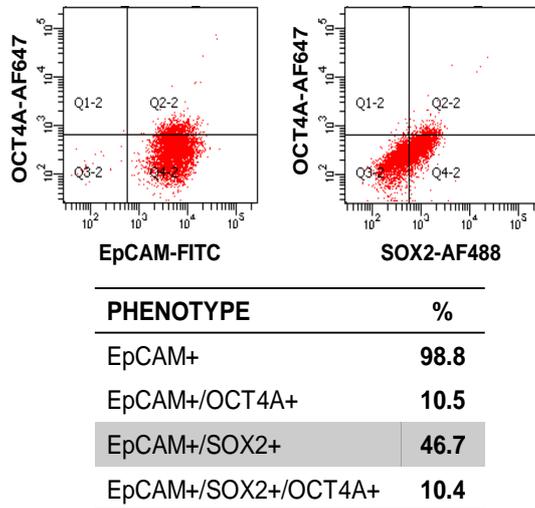
Nicchia staminale nella colecisti



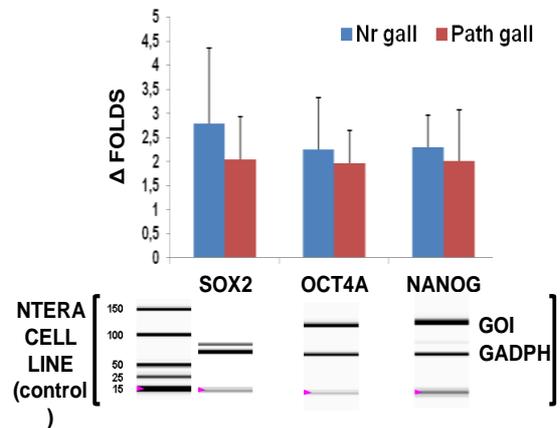
Carpino G, Cardinale V, Gentile R, ..., Reid L, Alvaro D, Gaudio E. J. Hepatol. 2014

Fig. 2b. Studio in situ.

Il numero di cellule EpCAM⁺, LGR5⁺, PDX1⁺ e SOX17⁺ è più elevato nelle colecisti patologiche rispetto alle colecisti normali e localizzate non solo nelle cripte ma verso l'apice della rugae mucosale.



A



B

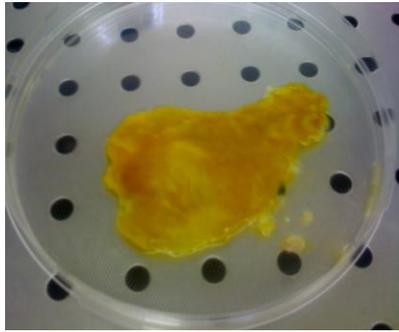
Fig.3A: L'esame citofluorimetrico indica che solo una sottopopolazione di cellule EpCAM+ (10%) coesprime marcatori di pluripotenza (OCT4/SOX2)

Fig.3B: La RT-PCR conferma l'espressione dei geni di pluripotenza (OCT4/SOX2/NANOG) e non mostra differenza tra colecisti normale e patologica.

(NTERA: controllo positivo espressione geni di pluripotenza)

Isolamento cellulare

Colecisti Normale



Colecisti patologica



Pre-sorting	Colecisti Normale	Colecisti Patologica
Totale cellule vive	10,330,000 +/- 9,424,134	8,207,142 +/- 4,716,087
N	19	14

Figura 4. Isolamento cellulare pre-sorting.

La metodica ha determinato, in ogni caso, l'isolamento di cellule vitali con numerosità media pari circa a 8.000.000 e vitalità media pari circa al 95%.

Immunoselezione di cellule EpCAM+

	Colecisti	
	Fresche isolate	Selezionate
EpCAM+ NCAM±	29.7±12.8	69±29.23*
N=3; *p<0.01		

Le popolazioni cellulari selezionate sono arricchite di cellule EpCAM+ (circa il doppio rispetto la popolazione pre-sorting)

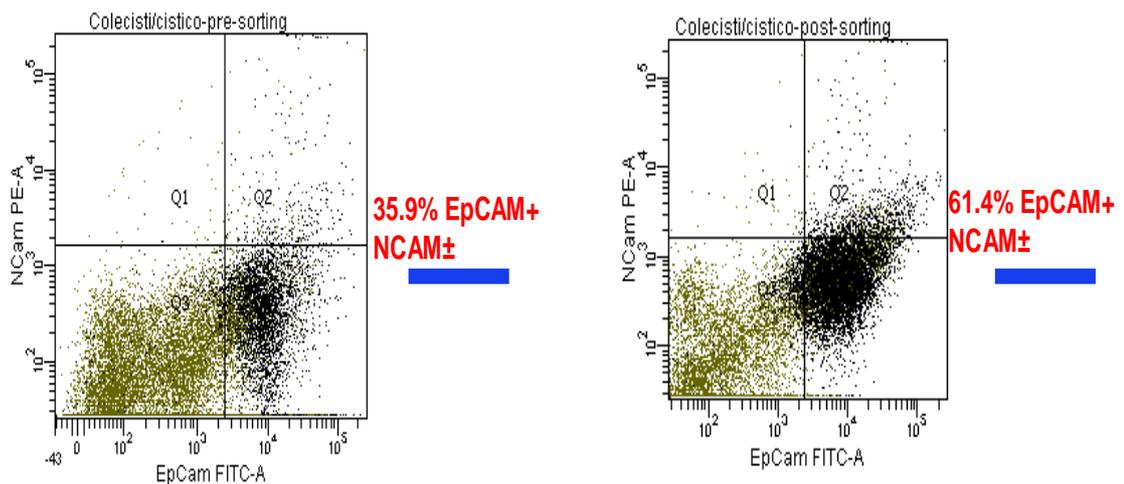
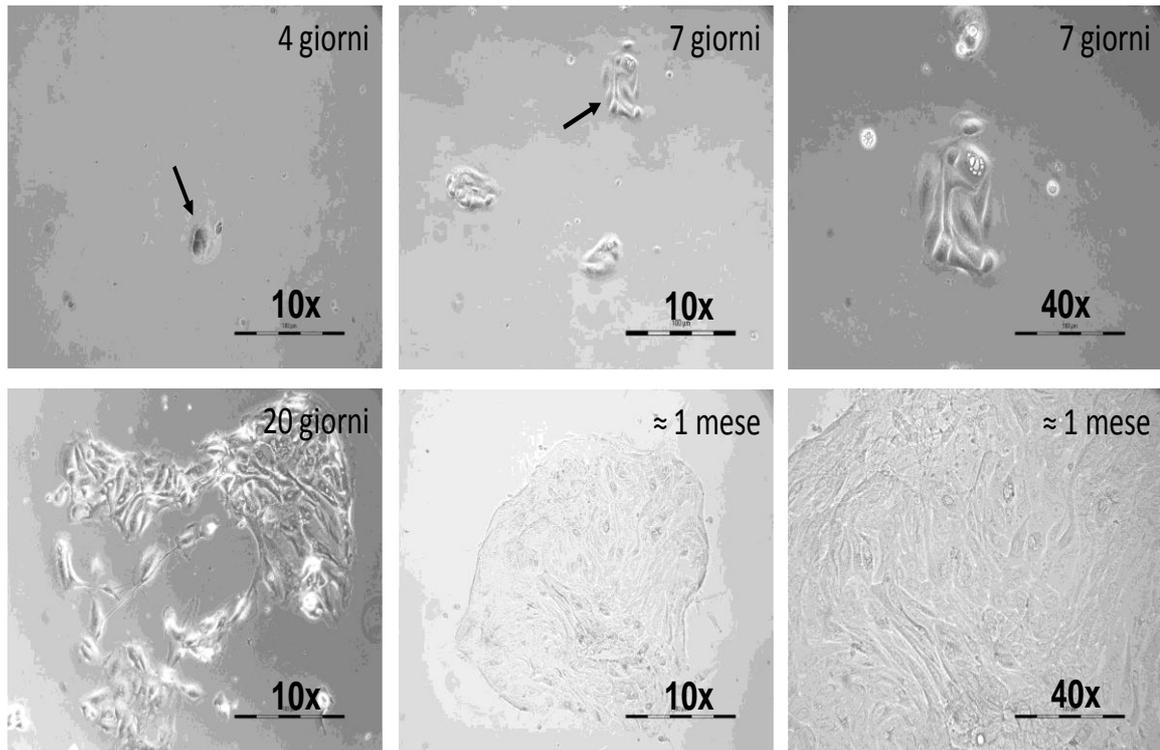


Figura 5. Esame citofluorimetrico in cellule immunoselezionate per EpCAM.

La figura dimostra che, all'esame citofluorimetrico, circa il 29% delle cellule fresche isolate sono positive per EpCAM e che invece, dopo sorting, la percentuale di cellule EpCAM positive aumenta significativamente.



Test di Clonogenicità
Densità clonale di
coltura
1,000 cellule/ml
(Kajstura et al. NEJM. 2011)

Figura 6. Test di clonogenicità.

Contrasto di fase. Una sospensione formata da singole cellule è stata ottenuta e piastrate ad una densità di piastraggio clonale (500 cellule/cm²) in Kubota Medium, un medium favorente l'auto-replicazione. Alcune cellule epiteliali singole iniziano a proliferare dopo un periodo di latenza di 1-2 giorni, formando piccoli gruppi di 10-15 cellule dopo 6-8 giorni di coltura. Dopo 20 giorni, le colonie di grandi dimensioni possono essere osservate. Ogni colonia è formata da piccole cellule di forma e dimensione uniforme (diametro = $8,84 \pm 1,78$) densamente adese, con elevato rapporto nucleo/citoplasmatico. Barra della scala = 50 micron.

Selezione di cellule EpCAM+ in coltura

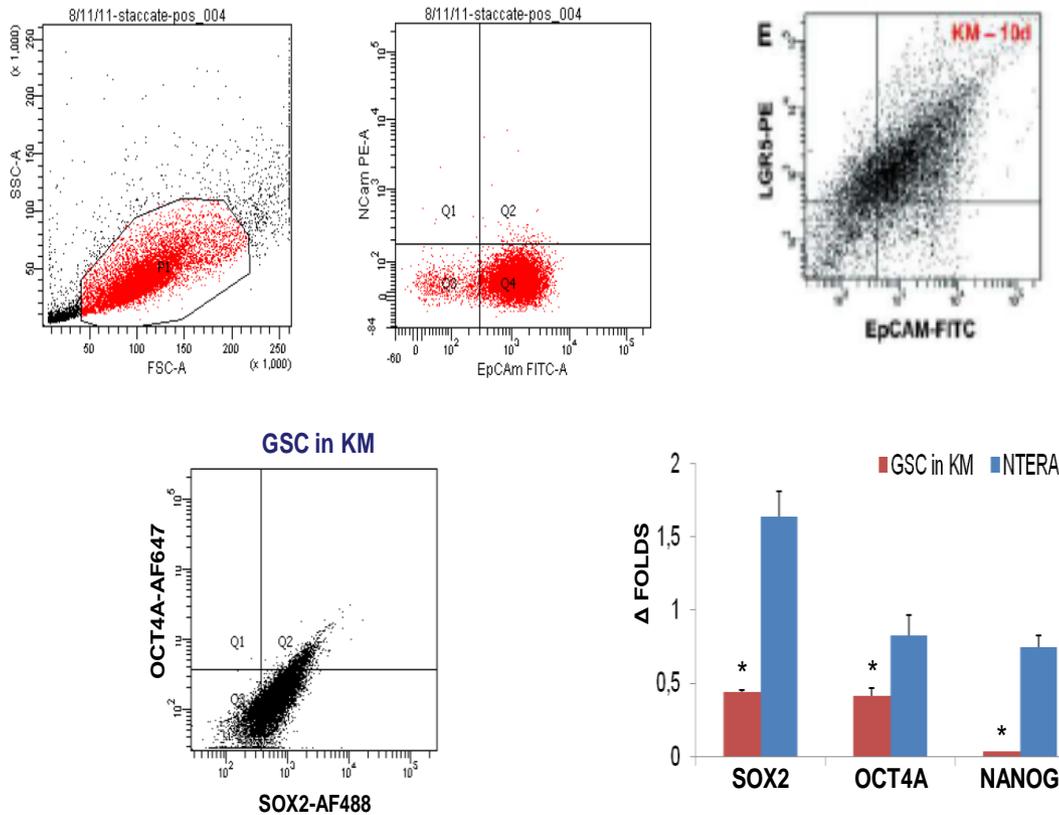


Figura 7. La percentuale di cellule EpCAM+ nella sospensione cellulare è del $29.0 \pm 12.4\%$. L'immunofluorescenza e la citofluorimetria hanno dimostrato che le cellule EpCAM+, nelle popolazioni cellulari cresciute in coltura, raggiungono l' $82.7 \pm 15.0\%$ ($p < 0.05$ rispetto alle cellule fresche isolate). L'esame citofluorimetrico evidenzia che il $54.43 \pm 26.31\%$ di cellule sono positive per SOX2 e, in particolare, una percentuale di cellule che va dal 3 al 7% (mean= 4.43 ± 2.5) co-esprime SOX2 e OCT4A. La presenza dei marcatori di pluripotenza è stato ulteriormente confermata dalla Real Time-PCR (RT-PCR).

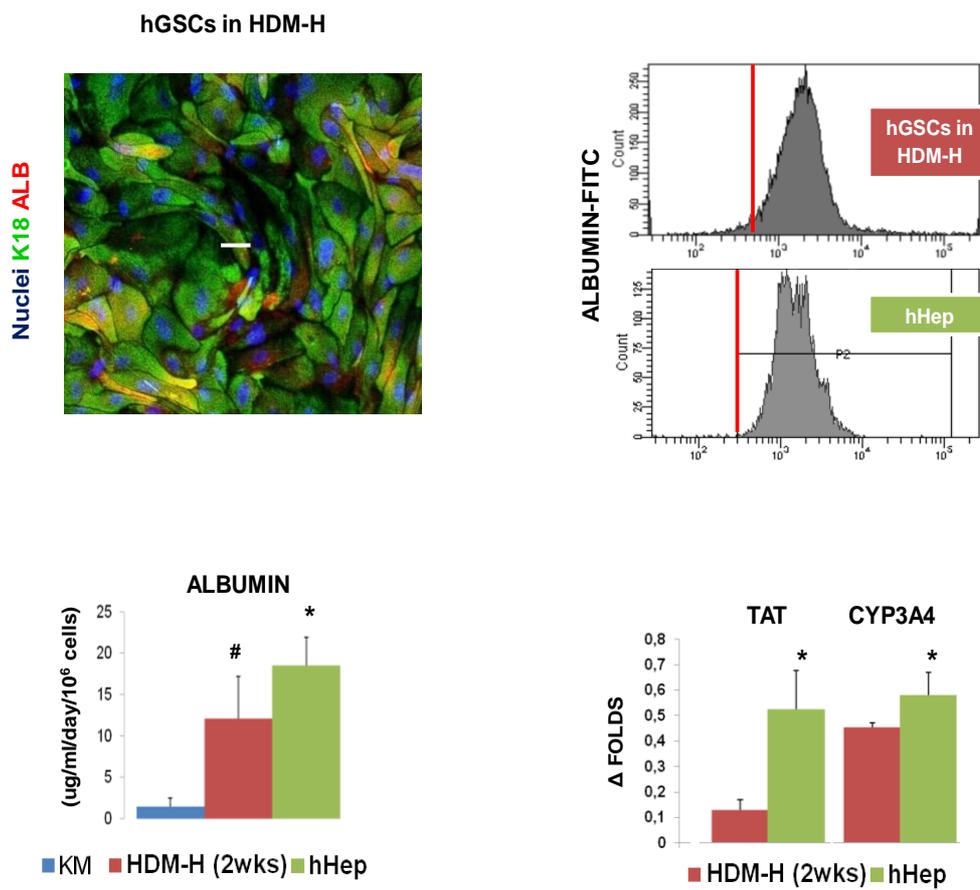


Figura 8. La differenziazione verso il destino epatocitario è stata valutata su plastica e in un HDM (medium ormonalmente definito). Cellule staminali/progenitrici della colecisti(GSCs) sono state trasferite in Kubota Medium (KM) e su plastica (cellule di controllo) o in un mezzo privo di siero ormonalmente definito (HDM) disegnato su misura per epatociti (HDM-H). Le cellule sono risultate diffusamente CK18 positive (rosso) e/o albumina positive (verde). I grafici dimostrano come l'espressione di albumina valutata mediante citofluorimetria delle GSCs in coltura in HDM-H sia sovrapponibile a quella degli epatociti umani maturi. Inoltre la secrezione di albumina nel mezzo delle GSCs in coltura in HDM-H è risultata maggiore rispetto alle cellule mantenute in KM. La RT-PCR conferma l'espressione di geni epatociti maturi nelle hGSCs sottoposte a differenziazione.

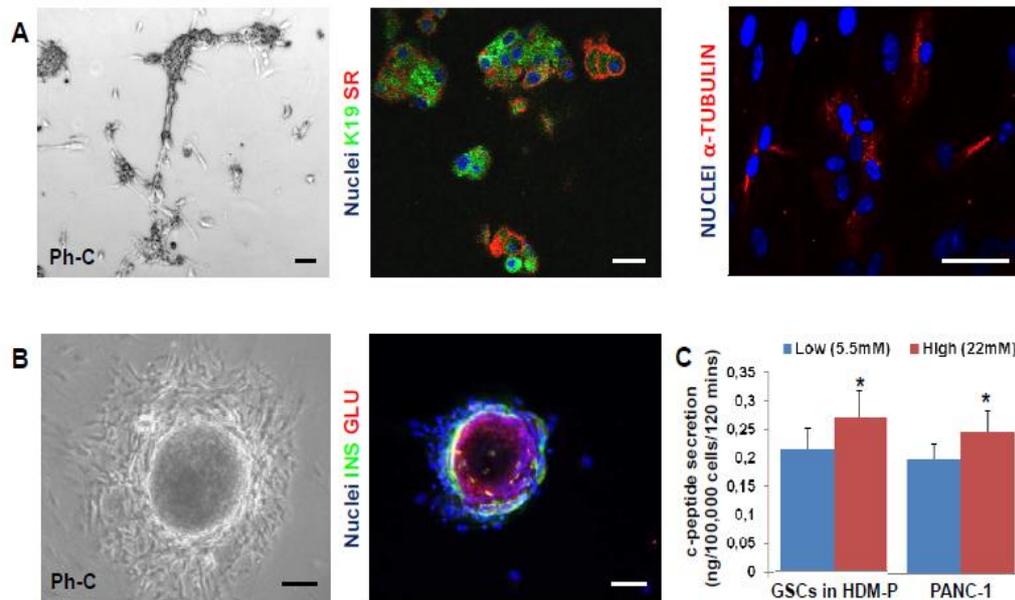


Figura 9. A) Dopo sette giorni di coltura, le colonie indotte verso la differenziazione colangiocitaria (HDM-C) hanno mostrato un positività per la co-espressione di CK19, secretin receptor e alfa-tubulina, marcatori di colangiociti maturi.

B) Dopo 14 giorni di coltura nel medium per la differenziazione pancreatica (HDM-P), è stata osservata la formazione di “islet like structure”, strutture costituite da cellule che esprimono, con forte densità, insulina e glucagone. Si è verificato un incremento della secrezione di C-peptide umano nelle cellule sottoposte a concentrazioni basse di glucosio (0.22 ± 0.036 ng/100,000 cells/120 mins) ed un incremento più marcato nelle cellule sottoposte a concentrazioni alte di glucosio (0.27 ± 0.046 ng/100,000 cells/120 mins, $p < 0.05$) (PANC-1: controllo positivo produzione di insulina).

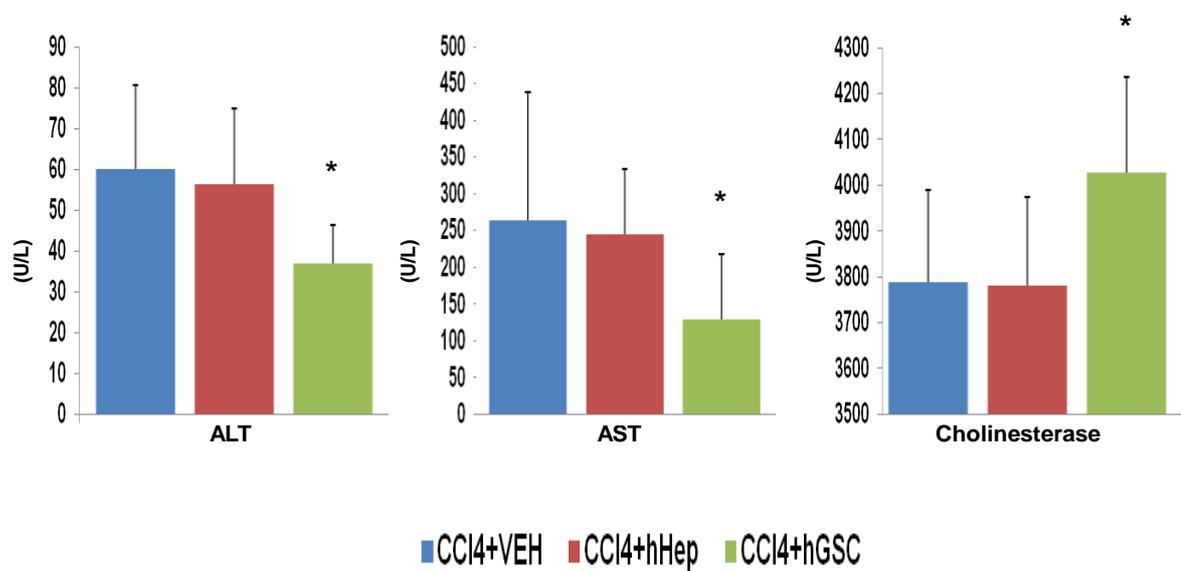


Figura10. I test di funzionalità epatica sui campioni di sangue prelevati dai topi CCl₄ trattati con le hGSCs o con epatociti umani maturi o con il solo veicolo hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di colinesterasi e la riduzione dei livelli di transaminasi (AST/GOT, ALT/GPT) nei topi CCl₄ trapiantati con le hGSCs rispetto a quelli trattati con gli epatociti maturi o con il solo veicolo.

Coltura di GSCs criopreservate

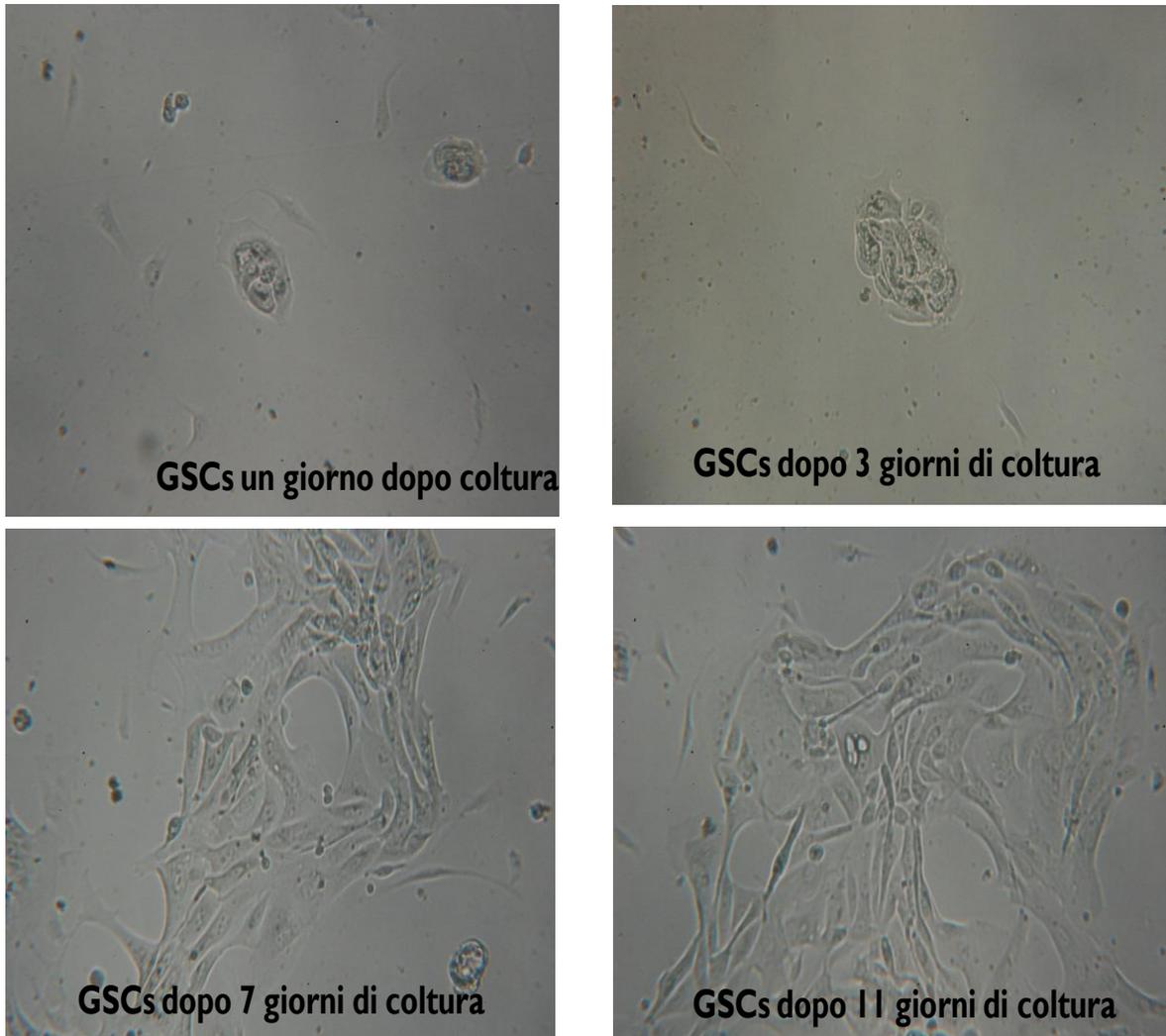


Figura 11. Sviluppo di colonie cellulari da cellule GSCs scongelate in un periodo di 10 giorni.

VITALITÀ CELLULARE NEI DIVERSI MEDIUM DOPO SCONGELAMENTO

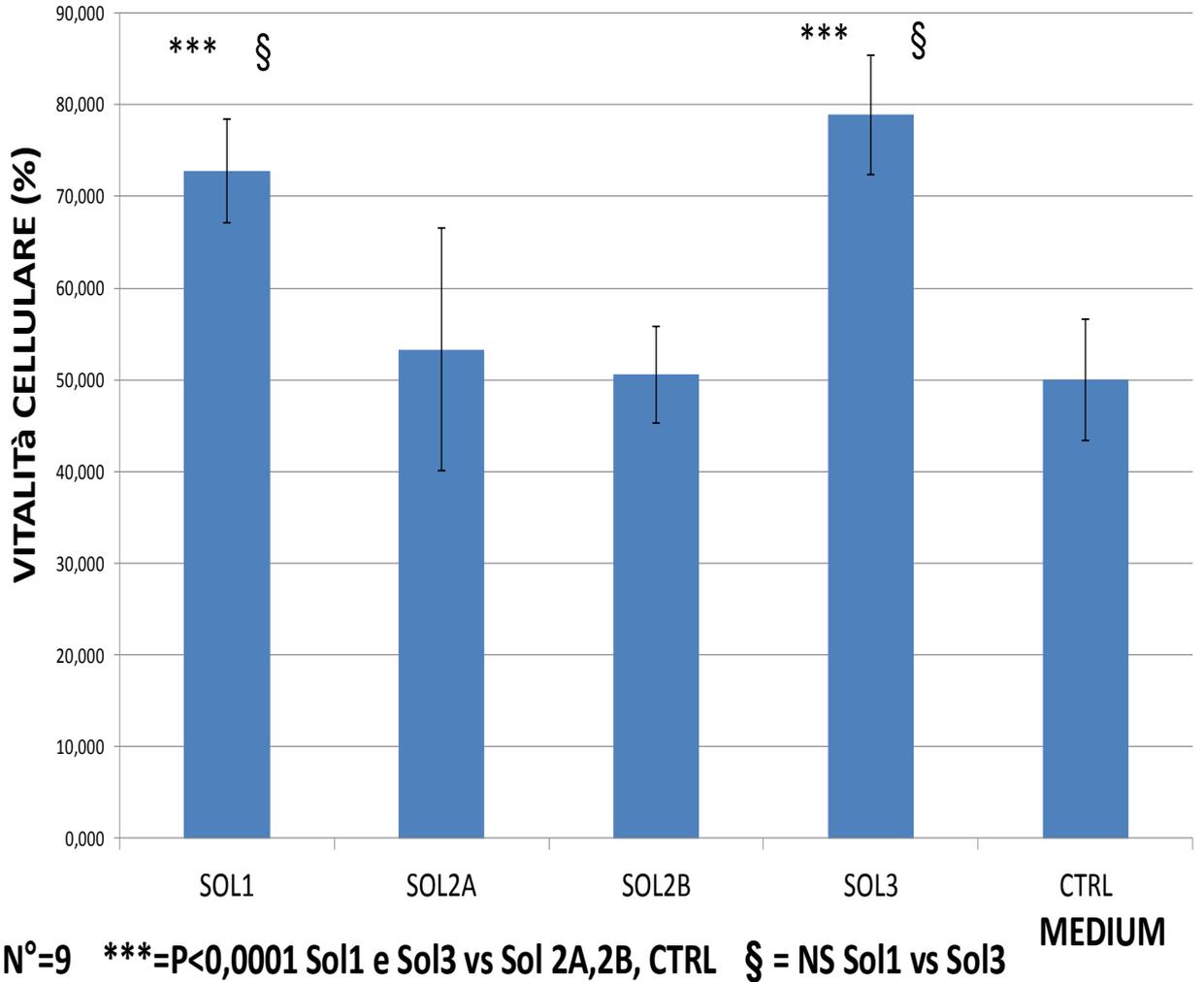


Figura 12. Percentuale di vitalità cellulare dopo lo scongelamento con l'impiego di soluzioni differenti

ESPRESSIONE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE

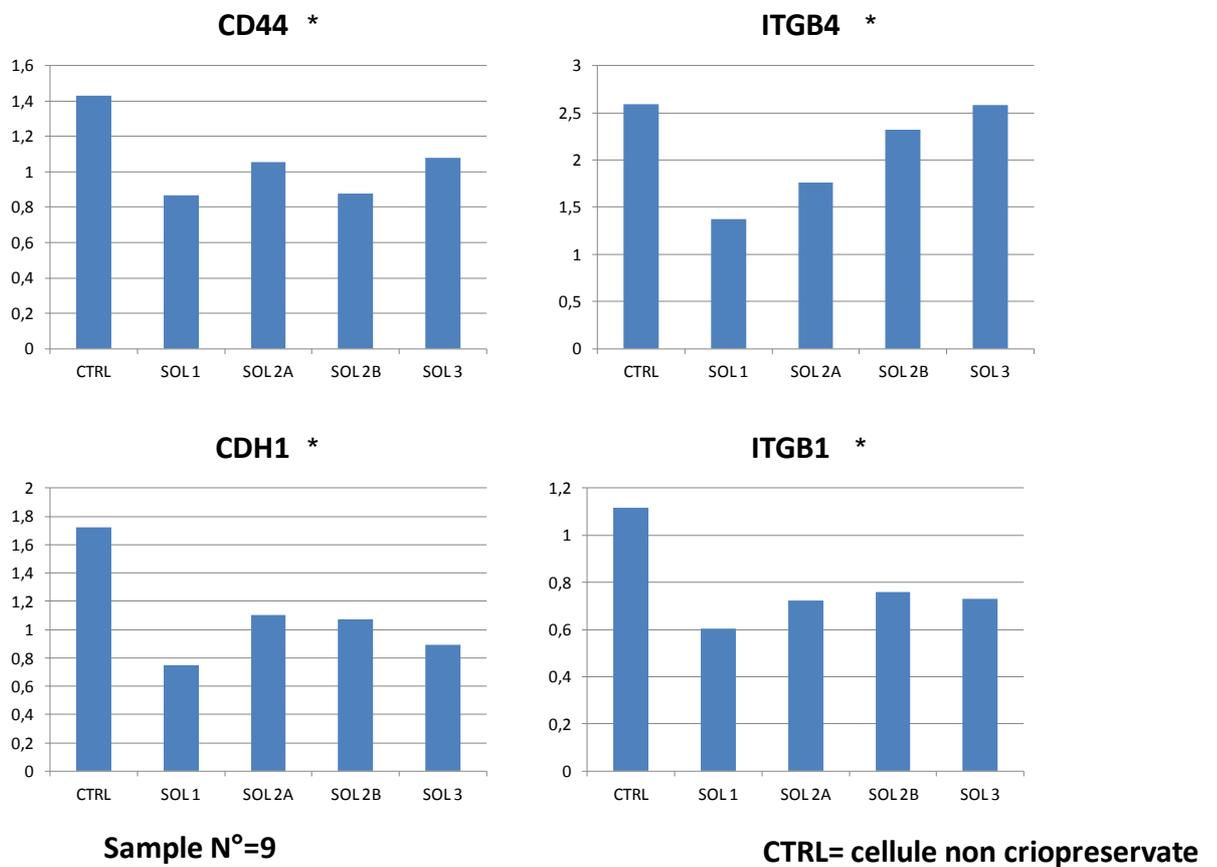


Figura 13. Espressione relativa, normalizzata con il ciclo soglia del GAPDH, delle molecole di adesione

ESPRESSIONE DEI MARKERS DI PLURIPOTENZA E DI CELLULE STAMINALI ENDODERMICHE

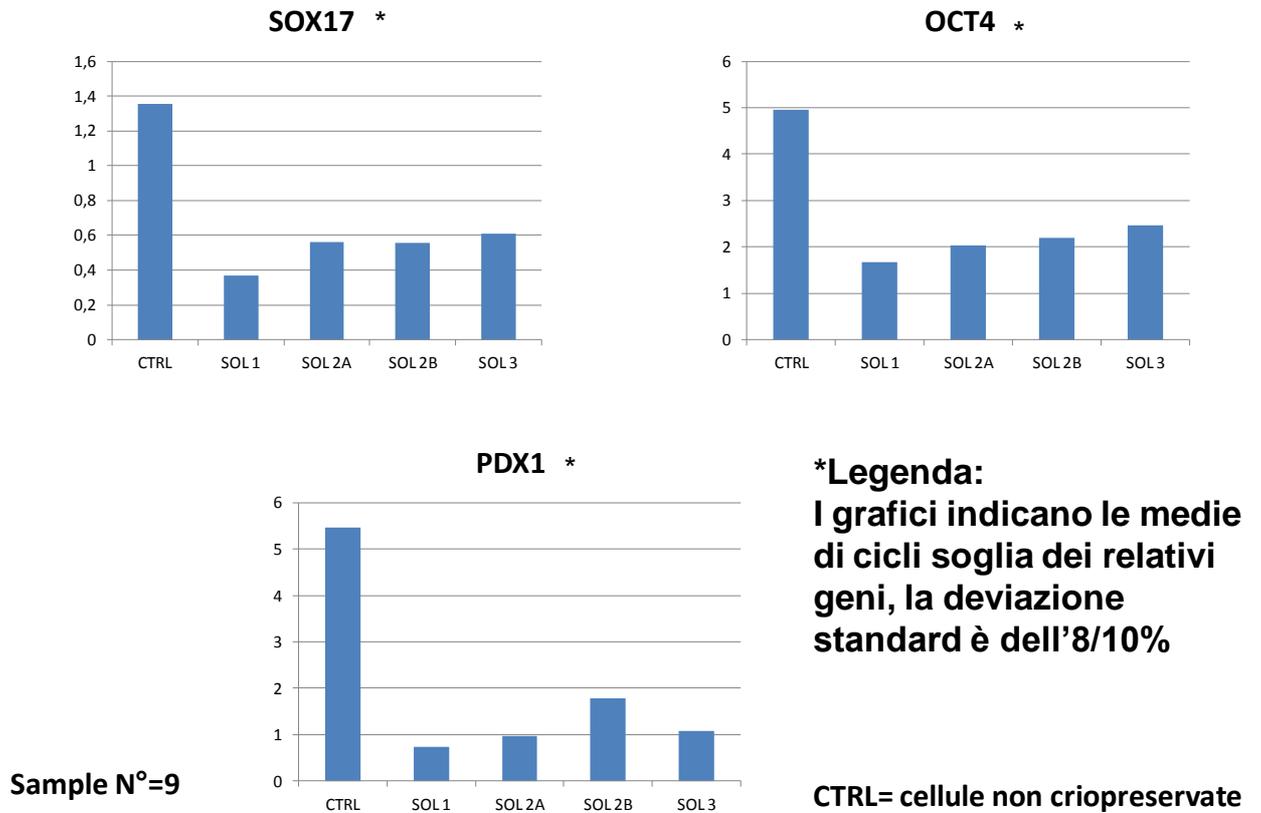
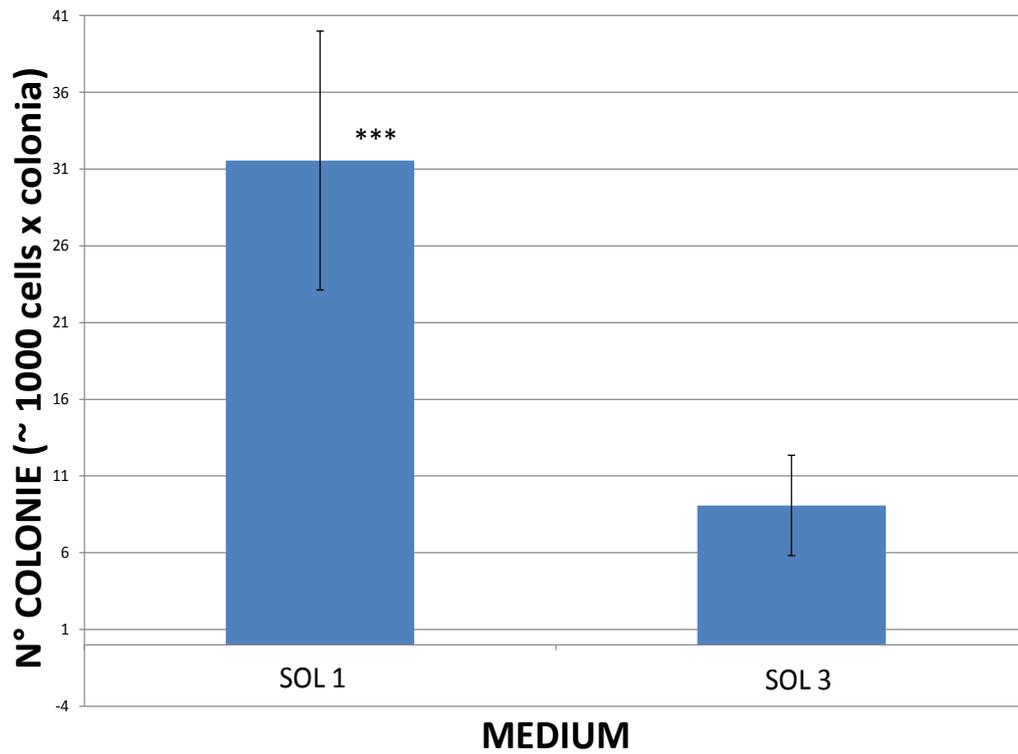


Figura 14. Espressione relativa, normalizzata con il ciclo soglia del GAPDH, dei marcatori di staminalità



Sample N°= 18, ***= P<0,0001

Figura 15. Sviluppo delle colonie dopo il congelamento con le diverse soluzioni di criopreservazione.

SOL 1 albumina 15% + acido ialuronico 0,1%



SOL 3 albumina 15%

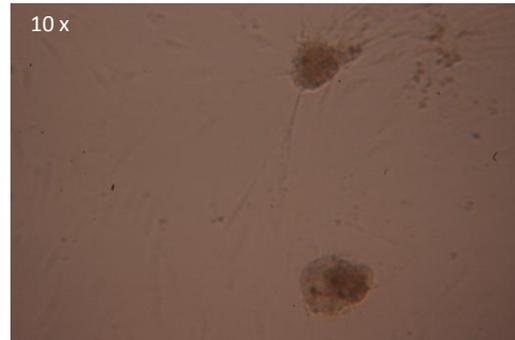
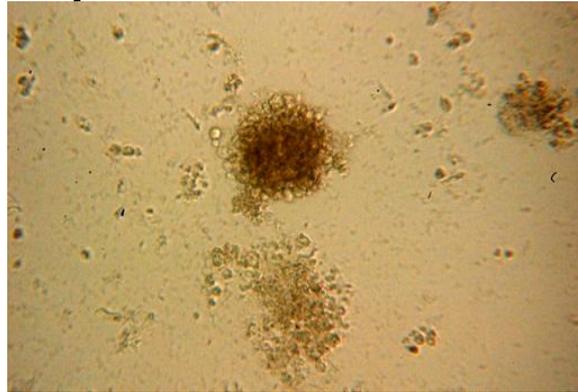
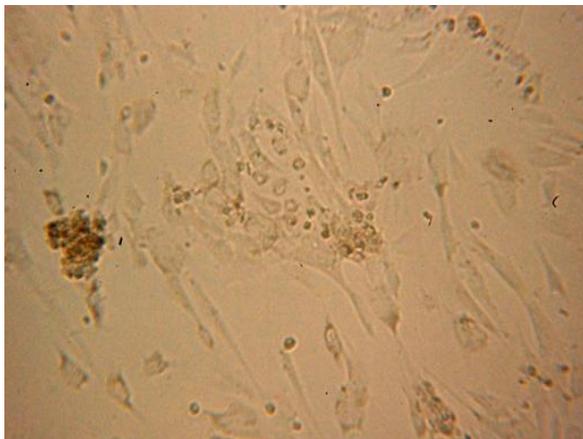


Figura 16. Colonie cellulari osservate a diversi ingrandimenti dopo il congelamento con differenti soluzioni criopreservanti

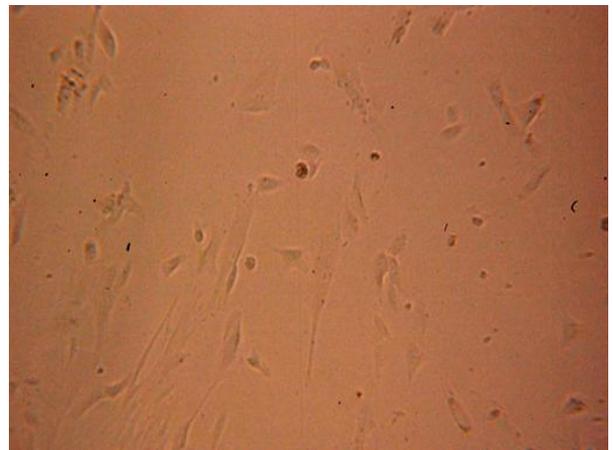
Soluzione 1 (albumina + acido ialuronico)



Pancreatic Medium



Hepatocyte Medium



Cholangiocyte Medium

Figura 17. Differenziamento cellulare di cellule criopreservate con la soluzione 1, non è stato riportato il KM in quanto le cellule non differivano molto da quelle osservate prima dell'inizio dell'induzione del differenziamento.

Parte supplementare

Tabella supplementare 1: anticorpi utilizzati

Nome	Ospite/ isotipo	Produttore	Catalogo N.
AFP (α -fetoprotein)	Rabbit IgG	Novus Biologicals	NB 100-1611
Albumin	Rabbit IgG	Novus Biologicals	NB 600-570
Albumin	Rabbit IgG	DAKO	F0117
Albumin (human specific)		Abcam	AB2406
ASMA (α -smooth muscle actin)	Mouse IgG2a	Sigma	A5228
CD31 / PECAM-1	Rabbit IgG	Abcam	ab62169
CD56 / NCAM (neural cell adhesion molecule)	Mouse IgG2b	BD Biosciences	559043
CD56 / NCAM	Mouse IgG1	Santa Cruz	SC-7326
CD133 / Prominin	Rabbit IgG	Abcam	ab19898
CD146 / MelCAM	Mouse IgG1	Abcam	ab24577
CD326 / EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)	Mouse IgG1	NeoMarkers	MS-181
CD326 / EpCAM-FITC	Mouse IgG1	Stem Cell	10109
CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	Mouse IgG1	ThermoScientific	M3A7
CK7 (cytokeratin 7)	Mouse IgG1	DAKO	M7018
CK19 (cytokeratin 19)	Mouse IgG1	DAKO	M0888
CK19 (cytokeratin 19)	Mouse IgG2a	Abcam	ab7754
C-peptide	Mouse IgG1	Abcam	Ab8301
CXCR4	Rabbit IgG	Abcam	Ab2074
Desmin	Rabbit IgG	Abcam	ab8592
FOXA2	Rabbit IgG	Abcam	Ab40874
HepPar-1(human specific)		DAKO	F0117
Insulin	Guinea pig IgG	DAKO	IS002
KDR (VEGFR2)	Rabbit IgG	Abcam	ab62697
Lgr5	Goat IgG	Santa Cruz	SC-68580
PDX1	Rabbit IgG	Santa Cruz	SC-25403
OCT4	Rabbit IgG	Abcam	Ab19857
Secretin receptor	Rabbit IgG	Santa Cruz	SC-26633
SOX9	Rabbit IgG	Chemicon	Ab 5535

SOX17	Goat IgG	Santa Cruz	Sc-17355
vWF (von Willebrand Factor)	Mouse IgG1	BD Biosciences	555849

Tabella supplementare 2: Primer utilizzati per RT- PCR e qRT-PCR

No	Name	Full name	GenBank Accession	Sequence (5' -> 3')	Size
1	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	<u>NM_022454</u>	GTGGACCGCACGGAATTTG GAGGCCCATCTCAGGCTTG	60
2	CXCR-4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	<u>AJ224869</u>	TACACCGAGGAAATGGGCTCA AGATGATGGAGTAGATGGTGGG	112
3	EpCAM	epithelial cell adhesion molecule	<u>NM_002354</u>	ATAACCTGCTCTGAGCGAGTG TGAAGTGCAGTCCGCAAAC	104
4	HNF6	hepatocyte nuclear factor 6, alpha	<u>NM_004498</u>	CAAACCCTGGAGCAAACCTCAA TGTGTTGCCTCTATCCTTCCC	151
5	SALL4	sal-like 4	<u>NM_020436</u>	CCAGGGAATGACGAGGTGG ATGCTGAAGAACTCCGCACAG	104
6	HES-1	hairy and enhancer of split 1	<u>NM_005524</u>	AAGAAAGATAGCTCGCGGCAT CCAGCACACTTGGGTCTGT	127
7	FOXA2 (HNF3B)	forkhead box A2	<u>NM_021784</u>	GCGACCCCAAGACCTACAG GGTTCTGCCGGTAGAAGGG	162
8	PROX1	prospero homeobox 1	<u>NM_002763</u>	TTGACATTGGAGTGAAAAGGACG TGCTCAGAACCTTGGGGATTC	100
9	PDX-1	pancreatic and duodenal homeobox 1	<u>NM_000209.3</u>	TTAGGATGTGGACGTAATT GGTCAAGTTCAACATGACAG	198
10	NEUROG3	neurogenin 3	<u>NM_020999</u>	GGAGTCGGCGAAAGAAGGC TACAAGCTGTGGTCCGCTATG	196
11	ISL1	ISL LIM homeobox 1	<u>NM_002202</u>	CAGGTTGTACGGGATCAAATGC CACACAGCGGAAACACTCGAT	109
12	PAX6	paired box 6	<u>NM_000280</u>	AGGTATTACGAGACTGGCTCC TCCCGCTTATACTGGGCTATTT	104
13	KRT19	keratin 19	<u>NM_002276</u>	ACCAAGTTTGAGACGGAACAG CCCTCAGCGTACTGATTTCT	181
14	ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter	<u>NM_000452</u>	TGTGTTGGCTTCCTCTGTCAG GGCAGCATCCTATAATGAGCAC	115
15	AE2	Anion Exchanger 2	<u>NM_003040</u>	GCCAAGGGCGCAGATTCTT CCAGGGTGCGGTGAAGTTC	103
16	GGT1	gammaglutamyltransferase 1	<u>J05235</u>	GGGGAGATCGAGGGCTATGAG GATGACGGTCCGCTTGTTTTTC	150
17	CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	<u>NM_000492</u>	AAAAGGCCAGCGTTGTCTCC TGAAGCCAGCTCTCTATCCCA	170
18	AFP	alpha-fetoprotein	<u>NM_001134</u>	CTTGACACAAAAAGCCCACT GGGATGCCTTCTTGCTATCTCAT	138

19	ALB	albumin	<u>M12523</u>	TTTATGCCCCGGAACTCCTTT ACAGGCAGGCAGCTTTATCAG	90
20	TF	Transferrin	<u>NM_001063</u>	CCTCCTACCTTGATTGCATCAG TTTTGACCCATAGAACTCTGCC	137
21	CYP3A4	cytochrome P450, 3A4	<u>NM_017460</u>	AAGTCGCCTCGAAGATACACA AAGGAGAGAACAACACTGCTCGTG	174
22	TAT	tyrosine aminotransferase	<u>NM_000353</u>	TTTGGGACCCTGTACCATTGT GCATTGGACTIONGAGGAAGCTC	102
23	G6PC	glucose-6- phosphatase	<u>NM_000151</u>	TCAGGGAAAGATAAAGCCGACC AGGTAGATTCGTGACAGACAGAC	105
24	INS	Insulin	<u>NM_000207</u>	GCAGCCTTTGTGAACCAACAC CCCCGCACACTAGGTAGAGA	67
25	GCG	Glucagon	<u>NM_002054</u>	GACAAGCGCCATTCACAGG TGACGTTTTGGCAATGTTATTCT	128
26	AMY2A	amylase, alpha 2°	<u>NM_000699</u>	TTCAGACCTTGGTGGGAAAGA ACGAACCCCAACATTGTTACAT	114
27	ADPGK	ADP-dependent glucokinase	<u>NM_031284</u>	AGTGGGGCCAGTTAAAAGCTC TCATGTGCAATCCAGAGAGGA	147
28	SST	Somatostatin	<u>NM_001048</u>	GCTGCTGTCTGAACCCAAC CGTTCTCGGGGTGCCATAG	138
29	HNF4a	hepatocyte nuclear factor 4 alpha	<u>NM_000457</u>	ACGGACAGATGTGTGAGTGG CAGGAGCTTATAGGGCTCAGA	107
30	GAPDH	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<u>NM_002046</u>	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	113

Ringraziamenti

I risultati riportati nella tesi sono stati resi noti alla comunità scientifica attraverso un articolo pubblicato su una rivista internazionale. I miei ringraziamenti vanno a tutti gli autori che hanno contribuito alla realizzazione di questo importante lavoro.

Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder.

Carpino G, Cardinale V, Gentile R, Onori P, Semeraro R, Franchitto A, Wang Y, Bosco D, Iossa A, Napoletano C, Cantafora A, D'Argenio G, Nuti M, Caporaso N, Berloco P, Venere R, Oikawa T, Reid L, Alvaro D, Gaudio E. J Hepatol. 2014 Jun;60(6):1194-202. doi: 10.1016/j.jhep.2014.01.026. Epub 2014 Feb 13.

E' mio forte desiderio, con queste poche righe, esprimere il più sentito e sincero ringraziamento per la particolare sensibilità ed attenzione, dedizione e massima collaborazione dimostrata in questi anni di lavoro di ricerca nel corso del dottorato, al Prof. Domenico Alvaro, al Prof. Eugenio Gaudio, al Prof. Vincenzo Cardinale, al Prof. Guido Carpino, alla Dott.ssa Alessia Torrice, alla Dott.ssa Alice Fraveto e alla Dott.ssa Rossella Semeraro.