

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
Sede amministrativa del Dottorato di Ricerca

XXI CICLO DEL
DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA MATERNO-INFANTILE, PEDIATRIA DELLO SVILUPPO E
DELL'EDUCAZIONE, PERINATOLOGIA

**STUDIO DELL'AZIONE IMMUNOSOPPRESSIVA
DI CELLULE STROMALI OTTENUTE
DA CORDONE OMBELICALE**

Settore scientifico-disciplinare: PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA

DOTTORANDO

Dott.ssa Erica Valencic

COORDINATORE DEL COLLEGIO DOCENTI

Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura

Università degli Studi di Trieste

TUTORE

Dott. Alberto Tommasini

Università degli Studi di Trieste

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura

Università degli Studi di Trieste

ANNO ACCADEMICO 2007 - 2008

INDICE

RIASSUNTO-ABSTRACT	I
1. PREMESSA	1
2. INTRODUZIONE	3
2.1 Cellule staminali embrionali.....	4
2.2 Cellule staminali adulte	5
3. LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI.....	11
3.1. Ruolo fisiologico delle MSC	11
3.2. Le MSC <i>in vitro</i> e le loro caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche.....	14
3.3. Le MSC <i>in vitro</i> e le loro caratteristiche funzionali	17
3.3.1 <i>Capacità differenziative</i>	17
3.3.2 <i>Capacità immunomodulanti</i>	19
3.4. Le MSC in terapia	22
4. OBIETTIVI	25
5. MATERIALI E METODI	26
5.1 Ottenimento del cordone ombelicale e isolamento della gelatina di Wharton	26
5.2 Colture cellulari	26
5.3 Immunofenotipo	27
5.4 Differenziamento adipogenico	27
5.5 Valutazione dell'effetto delle MSC sulla proliferazione di linfociti	27
6. RISULTATI	30
6.1 Caratteristiche delle cellule stromali ottenibili da cordone ombelicale.....	30
6.1.1 <i>Morfologia</i>	30
6.1.2 <i>Immunofenotipo</i>	32
6.1.3 <i>Caratteristiche di crescita</i>	34
6.1.4 <i>Differenziamento adipogenico</i>	35
6.2 Effetto delle MSC sulla proliferazione di linfociti	37
6.2.1 <i>Inibizione della proliferazione</i>	37
6.2.2 <i>Necessità del contatto cellulare o di mediatori solubili: studio in transwell</i>	40
6.2.3 <i>Ruolo dell'HLA-G sull'inibizione della proliferazione mediata dalle MSC coltivate con le due condizioni di coltura</i>	41
7. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE	43
8. BIBLIOGRAFIA	45

RIASSUNTO-ABSTRACT

RIASSUNTO: STUDIO DELL'AZIONE IMMUNOSOPPRESSIVA DI CELLULE STROMALI OTTENUTE DA CORDONE OMBELICALE

Le cellule stromali mesenchimali multipotenti, oggi meglio conosciute come cellule staminali mesenchimali (MSC) sono state isolate per la prima volta dal midollo osseo di ratti e porcellini d'india da Freidenstein *et al.* e sono state inizialmente descritte come precursori di fibroblasti per la loro somiglianza morfologica a queste cellule. Una decina di anni dopo le MSC furono isolate anche dal midollo osseo umano.

Queste cellule, *in vitro*, si comportano come cellule staminali: sono capaci di autorinnovarsi e differenziano in cellule tipiche della linea mesenchimale, ma non solo, negli ultimi anni è stata dimostrata anche la loro capacità di differenziare in cellule endoteliali e neuronali.

Nel midollo osseo le MSC sono rare: rappresentano solo lo 0.001-0.01% delle cellule nucleate, ma sono poi state identificate anche in molti altri tessuti come quello adiposo e muscolare.

Queste cellule vengono isolate sfruttando la loro proprietà di aderire alle superfici plastiche e possono essere facilmente espanse in coltura. Sono caratterizzate da una morfologia eterogenea. Si possono infatti distinguere principalmente due popolazioni: una più piccola simile ai fibroblasti e una con un citoplasma più abbondante di forma quadrata che viene per questo denominata a "fazzoletto".

L'immunofenotipo viene descritto come negativo ai marcatori emopoietici (CD14, CD34 e CD45), endoteliali (CD31), all'HLA di classe II e alle molecole costimolatorie (CD80, CD86), e positivo a CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e HLA di classe I.

Le MSC possiedono oltre alla capacità differenziativa un'altra importante proprietà: quella immunomodulatrice. Infatti, *in vitro*, sono capaci di sopprimere la proliferazione cellulare di linfociti attivati. Per questo motivo queste cellule sono considerate le candidate ideali per il trattamento della Graft Versus Host Disease (GVHD) resistente ai trattamenti steroidei.

Sono già utilizzate in trials clinici nonostante ci siano ancora alcuni problemi sperimentali da risolvere. Il primo è ottenere, dopo espansione *in vitro*, un numero di MSC sufficiente per gli usi terapeutici. A questo scopo sono in studio fonti alternative al midollo osseo, quali il cordone ombelicale e il liquido amniotico. Infatti queste cellule vanno incontro dopo una trentina di raddoppiamenti al fenomeno chiamato senescenza replicativa che rallenta e blocca la loro espansione numerica. L'altro problema è trovare un sostituto al siero fetale bovino,

fonte di fattori di crescita per l'espansione cellulare, il cui utilizzo viene messo in discussione per il potenziale rischio di trasmissione di infezioni virali e di prioni dagli animali all'uomo.

Scopo di questo lavoro è stato quello di isolare le MSC dalla matrice del cordone ombelicale (gelatina di Wharton) e di studiare l'attività immunosoppressiva delle cellule ottenute. Il cordone ombelicale infatti è facilmente ottenibile e contiene cellule biologicamente più giovani di quelle ottenute dal midollo di donatori adulti; in questo senso dovrebbe essere più semplice la loro espansione in coltura.

Inoltre abbiamo usato, in combinazione con il siero fetale bovino (FBS), un pool di liquidi follicolari ovarici (LF), ottenuti contestualmente al prelievo degli ovuli da follicoli ovarici di donne sottoposte a fecondazione assistita.

In questo studio sono stati utilizzati solo cordoni ombelicali ottenuti in corso di parto cesareo. La gravidanza deve essere stata portata a termine normalmente e il bambino non deve presentare aneuploidie o altre patologie.

La vena e le arterie vengono rimosse con un bisturi e il tessuto rimanente viene sminuzzato fino ad ottenere piccoli frammenti che vengono quindi trasferiti in una piastra da 6 pozzetti con del terreno; dopo circa una decina di giorni le prime cellule cominciano a migrare dal tessuto e ad aderire alla plastica. Vengono quindi staccate con tripsina quando raggiungono la confluenza e seminate nei due diversi terreni: quello addizionato di solo FBS e quello addizionato sia di FBS che di LF.

Sulle cellule così ottenute è stata analizzata la curva di crescita dimostrando che è possibile ottenere grandi numeri di MSC ($> 1 \times 10^7$) con entrambe le condizioni di coltura.

L'immunofenotipo è stato analizzato con la citofluorimetria: le cellule sono caratterizzate da un'elevata espressione del CD29, CD73, e HLA di classe I e da un'espressione più variabile del CD105; mentre sono negative al CD34, CD14 e CD45. Non abbiamo rilevato una differenza significativa tra le due condizioni di coltura fatta eccezione per la presenza di una minor variabilità dei valori per le cellule coltivate in terreno contenente FBS e LF.

Le cellule coltivate con entrambe le condizioni di coltura sono capaci di compiere il differenziamento in senso adipogenico quando mantenute in terreni con gli appropriati fattori di crescita. In presenza del liquido follicolare le cellule mostrano un maggior numero di vacuoli.

Infine abbiamo valutato le capacità immunomodulanti delle cellule isolate. Le MSC coltivate con entrambi i supplementi hanno mostrato una rilevante capacità antiproliferativa, più evidente per le cellule vive rispetto a quelle sottoposte ad irradiazione. La soppressione richiede il contatto cellulare e, diversamente da quanto suggerito in altri lavori, non sembra

mediata dalla produzione di HLA-G. Tra le citochine analizzate l'unica prodotta in quantità elevate dalle MSC è risultata l'IL-6.

Resta da valutare se il contatto cellulare sia necessario per l'effettiva soppressione o solo per attivare nelle MSC meccanismi di produzione di mediatori solubili.

ABSTRACT: IMMUNE PROPERTIES OF MESENCHYMAL STEM CELLS OBTAINED FROM WHARTON'S JELLY

Multipotent mesenchymal stromal cells, also known as mesenchymal stem cells (MSC) were firstly isolated from animal bone marrow by Freidenstein et al. and initially described as precursors of fibroblasts or stromal cells.

It has been shown that MSC behave *in vitro* as stem cells: they self-renew and are able to differentiate into mature cells typical of multiple mesenchymal tissues. Moreover, the differentiation toward non-mesenchymal cell lineages has been reported as well.

MSC represent a rare population (0.001-0.01% of nucleated cells) of adult human bone marrow cells, but they can be also identified in other adult tissues such as muscle, periosteum, adipose and other connective tissues.

Adult MSC can be readily isolated, exploiting their adhesive property, and extensively expanded. These cells are heterogeneous, showing in culture at least two subpopulations of cells: small, spindle-shaped, rapidly self-renewing MSC and larger, slowly-renewing MSC.

MSC lack hematopoietic markers such as CD14, CD34 and CD45, endothelial markers (CD31), HLA class II and costimulatory molecules (CD80, CD86), but express several surface proteins including CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and HLA class I.

Moreover, MSC have immunomodulatory properties, as it has been shown that they are able to inhibit proliferation of activated peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. For this MSC are considered ideal candidates for use in transplantation medicine to treat steroids-resistant Graft Versus Host Disease (GVHD) and mesenchymal stem cells are making their way into clinical trials.

However, some problems need to be solved before we could be able to make use of the full potential of mesenchymal stem cells in cellular therapies. For example: how can we obtain a large enough number of MSC? And is it possible to replace foetal bovine serum (FBS) in the culture medium with human serum or other growth-supportive supplements, in order to eliminate the potential transmission of viruses and prions from animals to man.

In this study we tried to isolate MSC from umbilical cord (Wharton's jelly) thanks to the easy availability and to of this tissue and to the younger origin of its cells as compared to bone

marrow. For this reason we speculated that it could be possible to obtain a great number of expanded cells. Moreover we used, for the first time, ovarian follicular fluid (LF) to expand, in vitro, mesenchymal stem cells.

Human umbilical cords were obtained from the local obstetric centre from full-term Caesarian section births. Umbilical arteries and vein were removed, and the remaining tissue was diced into small fragments and transferred to 6-well plates containing medium.

MSC were expanded up to fifth passage in two different culture conditions: DMEM with 20% FBS and DMEM with 10% FBS and 10% LF. Growth curves showed that it is possible to obtain a great number of cells ($> 1 \times 10^7$) in both conditions.

Expanded MSC were analysed by flow cytometry. These cells showed high expression of CD29, CD73, HLA class I and variable expression of CD105, while are negative for CD34, CD14 and CD45. There is no significant difference between the two culture conditions, with the exception of a minor variability of values for cells cultured with FBS/LF.

These cells, are capable of differentiating along the adipogenic lineage when cultured in appropriate medium. Cells cultivated with follicular fluid show a large number of vacuoles.

Finally we studied the immunomodulatory properties of isolated cells. MSC cultured with both supplements displayed a strong antiproliferative effect. Direct contact between MSC and the target lymphocytes is needed to obtain the maximal suppression. HLG-G seems not to play a significant role in suppression. Among the six cytokines analyzed only IL-6 was produced at relevant amounts by MSC.

Whether cellular contact is needed to activate MSC or to suppress proliferation is still a question to be solved with further studies.

1. PREMESSA

Quest'ultimo secolo è stato caratterizzato da grandi scoperte scientifiche, alcune delle quali hanno arricchito di nuove conoscenze il campo dell'embriologia. Le ricerche, infatti, hanno permesso di conoscere meglio le dinamiche del differenziamento cellulare, quel complicato processo che porta alla formazione di un essere umano a partire da una singola cellula, lo zigote.

Questo significa che le cellule embrionali possiedono le informazioni per differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare e proprio perché ancora indifferenziate mostrano un'elevata capacità proliferativa.

Queste due caratteristiche definiscono le cosiddette cellule staminali.

Anche nell'adulto alcuni tessuti, come il midollo osseo (MO), conservano cellule che si mantengono in uno stato più o meno indifferenziato, hanno un'elevata capacità di proliferare e in determinate condizioni possono "trasformarsi" in altri tipi cellulari.

La possibilità di isolare queste cellule, espanderle e indirizzarle verso un tipo cellulare piuttosto che un'altro è stata sfruttata dai ricercatori per produrre nuove cellule utilizzabili in medicina rigenerativa.

Per motivi etici inerenti all'uso delle cellule staminali embrionali, le ricerche si sono concentrate sulle cellule staminali adulte anche se, rispetto alle prime, queste ultime mostrano una capacità proliferativa ridotta oltre che una minor plasticità (termine usato per descrivere il potenziale differenziativo più o meno ampio di una cellula staminale).

In particolare è stato preso in considerazione il midollo osseo, perché facilmente accessibile. All'interno del midollo osseo coesistono due classi di cellule staminali: le cellule staminali emopoietiche da cui originano le cellule mature del sangue e le cellule staminali mesenchimali da cui deriva il microambiente midollare.

Le cellule staminali mesenchimali hanno attirato l'interesse dei ricercatori perché più facilmente espandibili e dotate di maggior plasticità rispetto alle altre staminali adulte, caratteristica che le rende particolarmente interessanti per la medicina rigenerativa.

Inoltre in questi ultimi anni non sono state sottovalutate altre importanti caratteristiche di queste cellule ovvero il loro ruolo nella regolazione dell'emopoiesi e nella modulazione della risposta immune.

Tutto ciò le rende interessanti, dal punto di vista clinico, per quelle malattie che richiedono un trapianto di midollo in quanto in grado di ricostituire il microambiente

midollare danneggiato dalla chemio-radio terapia, accelerare l'emopoiesi dopo il trapianto e regolare e ridurre la *Graft Versus Host Disease* (GVHD).

Per questi scopi clinici, fino ad oggi la fonte più comune di cellule staminali mesenchimali è stata il midollo osseo, ma potrebbe essere interessante analizzare la capacità immunomodulatrice delle cellule ottenute dal cordone ombelicale in quanto, oltre ad essere facilmente ottenibile, contiene cellule biologicamente più giovani di quelle ottenute dal midollo di donatori adulti; in questo senso dovrebbe essere più semplice la loro espansione in coltura.

Il “*cocktail* perfetto” per il successo sicuro di un trapianto di midollo non è probabilmente dietro l'angolo ma forse le ricerche di questi ultimi anni, inerenti alle cellule staminali emopoietiche e alla loro manipolazione *ex-vivo*, assieme allo studio delle cellule staminali mesenchimali ci avvicina un po' a quella svolta.

2. INTRODUZIONE

La parola cellula staminale venne usata per la prima volta dall'istologo Alexander Maksimov nel 1908 in un congresso di ematologia a Berlino, postulando l'esistenza di cellule staminali emopoietiche. Come spesso accade, bisogna però aspettare gli anni '60 per vedere pubblicati i primi studi su queste cellule: infatti nel 1963 McCulloch e Till dimostrarono l'esistenza di cellule *self-renewing* nel midollo osseo di topi ^{1,2} e l'anno dopo Kleinsmith dimostrò l'esistenza di cellule staminali nel carcinoma embrionale o nel teratocarcinoma, capaci di rimanere indifferenziate in coltura e di specializzarsi, in presenza di terreni particolari, in cellule di molti tessuti ³. Solo quattro anni dopo venne eseguito con successo il primo trapianto di sangue ottenuto dal midollo osseo (contenente cellule staminali emopoietiche) per curare una SCID (immunodeficienza combinata grave) ⁴.

Infine, da quando nel 1998 James Thomson riuscì per la prima volta a coltivare 5 linee cellulari indipendenti derivate da embrioni umani ⁵ sulle cellule staminali si sono appuntate moltissime speranze e molti gruppi di ricerca hanno intrapreso questa via di studio.

Le caratteristiche di queste cellule sono principalmente due, e sono le proprietà che le rendono così interessanti per i ricercatori: la capacità di perpetuare se stesse indefinitamente (automantenimento o autorinnovamento) e la capacità di differenziarsi (plasticità) in almeno un tipo cellulare maturo. Quindi cellule dotate di maggior plasticità possiedono un potenziale differenziativo più ampio ⁶.

In base alla plasticità si possono distinguere quattro tipi di cellule staminali ⁶ (fig.1):

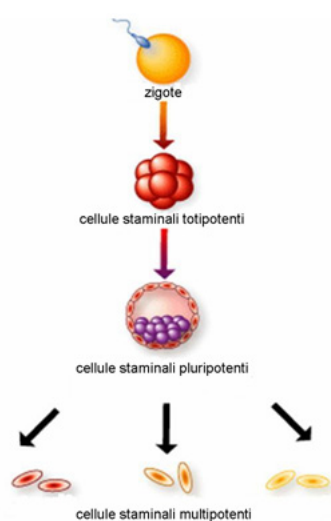


Fig.1 Dallo zigote alle cellule staminali multipotenti.

- Cellula totipotente: può differenziare in tutte le cellule di un intero organismo e persino in cellule dei tessuti extra-embryonali, come la placenta. Lo zigote e i primi stadi dello sviluppo embrionale possiedono questa caratteristica.
- Cellula pluripotente: può dare origine a tutte le cellule che troviamo in un individuo adulto ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embryonali.
- Cellula multipotente: è una cellula già commissionata verso una particolare "famiglia" di cellule e può quindi specializzarsi unicamente in

alcuni tipi di cellule: un esempio sono le cellule staminali emopoietiche che danno origine a tutta la parte corpuscolata del sangue.

- Cellula unipotente: può generare solamente un tipo di cellula specializzata, come ad esempio lo spermatogonio che dà origine allo spermatozoo.

Le cellule staminali si classificano anche secondo la provenienza, come embrionali o adulte.

2.1 Cellule staminali embrionali

Sono state isolate negli anni tre tipi di cellule staminali embrionali (fig.2): *embryonal carcinoma (EC) cells*, *embryonic stem (ES) cells* e *embryonic germ (EG) cells*⁷.

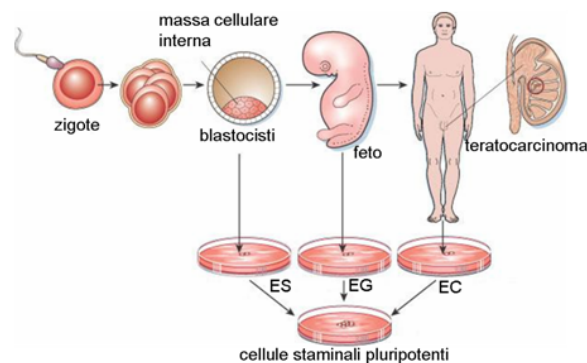


Fig.2 I tre tipi di cellule staminali embrionali: ES (*embryonic stem cells*), EG (*embryonic germ cells*) ed EC (*embryonic carcinoma cells*). Modificata da Donovan et al. *Nature* 2001; 414: 92-97.

- Le cellule staminali pluripotenti sono state identificate per la prima volta nel teratocarcinoma, uno strano tumore gonadico costituito da tessuti derivanti dai tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma); infatti all'interno della massa tumorale è possibile riconoscere diversi tipi di tessuti come il tessuto cartilagineo, muscolare, osseo, epiteliale e così via. Queste cellule specializzate sono il risultato della differenziazione di cellule staminali presenti nel tumore che derivano a loro volta da precursori cellulari embrionali dei gameti (PGCs)^{3,8}. Quindi cellule EC prelevate da tumori testicolari dell'adulto e coltivate in terreno contenente siero, in presenza o meno di un *feeder* costituito da fibroblasti inattivati, danno luogo a una linea di cellule EC che come tali rimangono indifferenziate con un'elevata capacità proliferativa⁹⁻¹¹.
- Le cellule prelevate dalla massa cellulare interna di un embrione pre-impianto allo stadio di blastocisti e poste in coltura danno origine a differenti tipi di colonie alcune delle quali mostrano un fenotipo indifferenziato. Coltivando queste cellule su un

feeder di fibroblasti inattivati è possibile espanderle fino a formare una linea cellulare stabilizzata di cellule ES^{12,13}.

- Coltivando invece le PGCs si ottengono le cellule EG. PGCs isolate dalle gonadi embrionali e coltivate sul *feeder* di fibroblasti inattivati, in presenza di siero e fattori di crescita danno origine a colonie di cellule EG che sono morfologicamente indistinguibili dalle cellule EC o ES^{14,15}.

2.2 Cellule staminali adulte

Nonostante l'esistenza di cellule staminali sia stata postulata prima nei tessuti adulti e poi in quelli embrionali, per parecchi anni l'interesse che questi ultimi hanno suscitato è stato superiore di quelli adulti per la loro maggiore plasticità e capacità di autorinnovamento. Da una parte difficoltà sperimentali e dall'altra problemi etici hanno in seguito spostato questo interesse anche sulle staminali adulte che si sono dimostrate non da meno di quelle embrionali.

Ontologicamente, le cellule staminali tessuto-specifiche fetali o di adulto originano da cellule staminali embrionali, cioè cellule pluripotenti presenti nella massa cellulare interna della blastocisti. Durante la gastrulazione si formano i tre maggiori foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma) e la progenie delle cellule staminali embrionali si separa in gruppi distinti di precursori che, gradualmente, maturano in quelle che saranno considerate cellule staminali organo- e tessuto- specifiche (somatiche). Le cellule staminali somatiche possono essere isolate da vari tessuti di mammifero durante tutto il periodo dello sviluppo fetale e dall'adulto anche se il loro numero declina progressivamente fino a raggiungere valori minimi in età adulta. La loro funzione predominante è di contribuire al mantenimento dell'omeostasi tessutale, generando una progenie di cellule differenziate che sostituisce le cellule mature andate perse a causa di rinnovamento fisiologico o di lesioni. Il grado con cui le cellule staminali svolgono questa funzione può variare significativamente da tessuto a tessuto. Molti tessuti adulti, come l'epidermide, l'epitelio dell'intestino tenue e il sistema ematopoietico, sono sottoposti a un continuo rinnovamento cellulare. Di conseguenza questi organi possiedono la capacità di rigenerare il tessuto lesionato, ammesso che il danno non sia particolarmente severo. Altri tessuti come quello muscolare cardiaco e in particolare quello nervoso sono sempre stati considerati incapaci di rigenerazione cellulare e, di conseguenza, privi di cellule staminali. Tuttavia, alcuni studi hanno rivelato una, seppur minima, attività rigenerativa anche in questi tessuti¹⁶.

Il numero di cellule staminali all'interno di un determinato tessuto è regolato non a livello di singola cellula ma di popolazione cellulare. Le cellule staminali compiono divisioni

simmetriche in cui le due cellule figlie sono identiche (divisione espansiva) o, in alternativa, diverse dalla cellula madre staminale (divisione differenziativa) (fig.3A). L'automantenimento è perciò garantito dall'equilibrio numerico tra i due tipi di divisione simmetrica all'interno della popolazione. Tale sistema ha il vantaggio di poter aumentare o diminuire il numero di cellule staminali entro un tessuto quando se ne presenti la necessità.

Un secondo modello, detto deterministico, prevede che una singola cellula staminale, ad ogni divisione mitotica, dia origine a due cellule figlie di cui almeno una è identica alla cellula madre. Una divisione di questo tipo è detta asimmetrica in quanto le due cellule figlie seguono vie di sviluppo diverse (fig.3B). Questo modello garantisce sia la conservazione di un numero stabile di cellule staminali e la concomitante produzione di un elevato numero di cellule differenziate, ma il numero di cellule staminali non potrà mai aumentare a prescindere dal numero di cicli effettuati da ciascuna cellula staminale.

La maggior parte delle cellule staminali utilizza entrambi questi metodi di divisione e l'equilibrio tra i due modelli è controllato dallo stadio dello sviluppo dell'organismo e da fattori ambientali (fig.3C) ¹⁷.

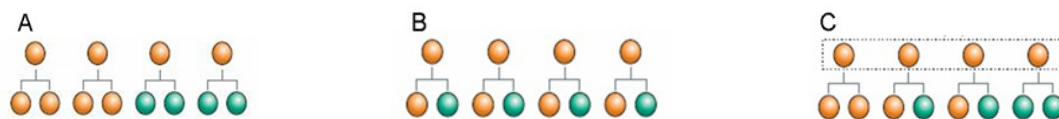


Fig.3 Come le cellule staminali si dividono (in arancione: cellule staminali; in verde: cellule differenziate): divisione simmetrica (A), divisione asimmetrica (B) ed equilibrio tra le due condizioni (C). Modificata da Morrison et al. *Nature* 2006; 441: 1068-1074.

Tra il compartimento staminale somatico e le cellule mature di un tessuto esiste un compartimento intermedio, quello dei progenitori di transito. In tali cellule la capacità di proliferare si mantiene per un numero limitato di cicli e si esaurisce quando esse si differenziano in un numero elevato di cellule mature. La divisione in questi tre compartimenti (staminale, di transito e differenziato) consente la produzione di un consistente numero di cellule tessutali mature a fronte di un numero di divisioni delle cellule staminali estremamente ridotto. In questo modo, il patrimonio genetico delle cellule staminali risulta protetto dal rischio di mutazioni che potrebbero accumularsi durante la replicazione del DNA ¹⁸.

L'esistenza di compartimenti cellulari multipli e gerarchicamente definiti permette di regolare la produzione di cellule mature sia variando la velocità di proliferazione e la modalità di divisione nel compartimento staminale sia modulando la lunghezza del ciclo e il numero di divisioni nella popolazione di transito. Si crea così un sistema di regolazione integrato e flessibile che consente di rispondere a molteplici stimoli regolatori provenienti dal tessuto e

che soddisfa le esigenze di ricambio cellulare, spesso molto diverse, di un organo o di un tessuto.

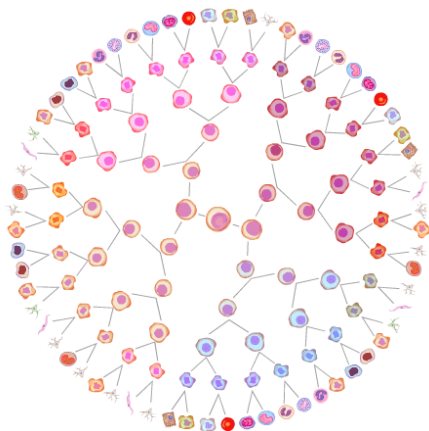


Fig.4 Da una cellula immatura (al centro) a cellule differenziate (all'esterno).

Quindi da una popolazione immatura e ad elevato potenziale differenziativo (staminali somatiche) si arriva alla formazione di cellule mature e quiescenti o scarsamente proliferanti dopo essere passati attraverso le cellule di transito con caratteristiche intermedie (fig.4). Questo processo trova una corrispondenza nei domini anatomici di molti tessuti adulti sede di rigenerazione cellulare. Al loro interno troviamo le varie popolazioni cellulari e avvengono sequenzialmente i processi di proliferazione e differenziamento. Le cellule staminali somatiche si trovano localizzate in nicchie ristrette e piuttosto

profonde dei tessuti. Al loro interno (la parte centrale del midollo osseo nel sistema emopoietico, la base della cripta intestinale, lo strato germinativo dell'epidermide, la zona periventricolare dei ventricoli del cervello) risiede la popolazione di cellule staminali e avvengono i fenomeni alla base dell'automantenimento. Verso gli strati cellulari più distali si evidenzia la zona di transizione, ricca di cellule progenitrici intermedie e sede del fenomeno di amplificazione cellulare e, infine, verso gli strati più distanti dalla nicchia si ritrovano le cellule differenziate a stadi progressivi di maturazione^{19,20}.

Storicamente si sosteneva che le cellule staminali adulte fossero "entità" tessuto-specifiche il cui potenziale differenziativo era limitato alla generazione di tipi cellulari maturi del tessuto/organo di residenza. Tuttavia negli ultimi anni sono comparse molte pubblicazioni che affrontano quella che si sta rivelando come una delle più sorprendenti caratteristiche funzionali delle cellule staminali, vale a dire la loro capacità di transdifferenziamento. Grazie a questa loro caratteristica peculiare, le cellule staminali dell'adulto sono in grado di dare origine a cellule differenziate di tessuti e organi diversi da quelli in cui risiedono²¹.

Rispetto a quelle embrionali, però, le cellule staminali adulte hanno degli svantaggi: sono numericamente molto scarse, hanno una ridotta capacità di autorinnovamento e dopo alcune divisioni cellulari tendono a perdere le caratteristiche di pluripotenzialità.

Le prime cellule staminali adulte studiate e isolate sono state le emopoietiche residenti nel midollo osseo probabilmente per la facilità di ottenimento (è sufficiente eseguire un prelievo di midollo osseo dalla cresta iliaca), tanto che oggi il trapianto di cellule staminali

emopoietiche è una pratica clinica ben consolidata che viene eseguita ormai da cinquanta anni.

Negli anni '70 studiando e coltivando queste cellule ci si è resi conto che nel midollo osseo esisteva un'altra classe di cellule staminali, le cosiddette cellule staminali mesenchimali (MSC) quella volta identificate con il nome di fibroblasti stromali di derivazione mesenchimale ²². Queste cellule staminali somatiche rispetto alle altre staminali adulte possiedono caratteristiche interessanti di plasticità e transdifferenziamento.

Questi due tipi cellulari (emopoietico e mesenchimale) coesistono anche in un altro tessuto, il cordone o funicolo ombelicale.

Il cordone ombelicale comincia a formarsi nel primo mese di vita del feto, quando le cellule della morula (stadio dello sviluppo dello zigote costituito da 8 a 16 cellule) che daranno origine all'embrione si differenziano da quelle che costituiranno la placenta e gli annessi fetali (il sacco amniotico e, appunto, il cordone ombelicale).

Al suo interno ci sono tre vasi sanguigni: una vena e due arterie. La vena porta al bambino l'ossigeno e il nutrimento che provengono dal sangue della mamma, le arterie invece permettono al piccolo di eliminare le scorie. Questi tre canali sono ricoperti da un tessuto gelatinoso denominato gelatina di Wharton che costituisce l'impalcatura del cordone.

Al momento della nascita il cordone può misurare fino a 60-65 cm di lunghezza ²³. Non appena il bambino emette il primo respiro, il cordone ombelicale smette di funzionare per poi essere reciso .

Fino ad una ventina di anni fa i medici gettavano il funicolo inconsapevoli del suo valore.

Numerosi studi indicano che è possibile ottenere dalla placenta e dal funicolo dei neonati a termine una quantità di cellule staminali emopoietiche, in grado di ricostituire l'emopoiesi dopo chemioterapia ablativa, che presentano rispetto a quelle presenti nel MO vantaggi a vario livello. La prima dimostrazione di questa possibilità risale al 1972 quando Milton e Norman Ende ²⁴ riferirono di aver trattato un ragazzo di 16 anni affetto da leucemia acuta con il trapianto di cellule staminali emopoietiche da cordone ombelicale ottenute da 8 diversi donatori. Gli vennero somministrati farmaci come la 6-mercaptopurina e il prednisone ma non ricevette nessun trattamento ablativo. Solo una unità di sangue attecchì come dimostrato dalla presenza degli antigeni dei globuli rossi di uno dei donatori. Ma ci vollero anni perchè altri ne riconoscessero le potenzialità: nel 1989 Broxmeyer e Gluckman curarono un bambino di cinque anni affetto da anemia di Fanconi usando il sangue del cordone ombelicale della sorellina ²⁵.

Sebbene il trapianto di midollo osseo classico (prelievo del sangue dalla cresta iliaca) e il trapianto di cellule staminali ottenute dal sangue periferico (il donatore viene precedentemente trattato con fattori di crescita per stimolare la migrazione delle cellule staminali emopoietiche dal midollo osseo al sangue periferico) di un donatore consanguineo HLA identico è caratterizzato quasi sempre da successo, molti pazienti (più del 50%) non possono beneficiare di questo trattamento per mancanza di un donatore compatibile. Oltre alla compatibilità HLA giocano un ruolo importante nel trapianto del MO molti altri fattori: l'età del donatore e del ricevente, il tipo di malattia e lo stadio in cui la malattia si trova, la sierologia di donatore e ricevente riguardo all'infezione da Citomegalovirus (CMV) responsabile del 10% degli insuccessi di trapianto, la terapia di condizionamento e la profilassi dalla *Graft Versus Host Disease* (GVHD) o malattia del trapianto contro l'ospite²⁶.

I vantaggi relativi all'utilizzo del sangue cordonale possono essere riassunti come segue:

- Facilità di ottenimento e disponibilità senza alcun rischio per il neonato e la madre.
- Criteri meno stringenti per la compatibilità HLA tra donatore e ricevente permettendo l'utilizzo del sangue placentare anche per trapianti tra soggetti non imparentati o solo parzialmente compatibili.
- Rischio ridotto di GVHD in rapporto all'incompleto sviluppo del sistema immunitario del neonato e quindi relativa immaturità delle cellule T. Il ridotto rischio sembra essere legato ad una minore espressione degli antigeni HLA di classe II. In effetti, nei casi di trapianto di sangue cordonale, la GVHD è di più lieve entità, anche quando non sussiste una perfetta compatibilità tra donatore e ricevente.
- Basso rischio di trasmissione di malattie infettive come quella da CMV dato che meno dell'1% dei neonati contrae il virus nell'utero materno.
- Le cellule staminali di origine funicolare possono essere conservate in azoto liquido (rendendole immediatamente disponibili) per lunghi periodi senza compromissione delle loro caratteristiche peculiari.

D'altra parte l'impiego del sangue da cordone è riservato al trapianto in pazienti pediatriche perché la quantità ottenibile non è tale da essere utilizzata nel trattamento di pazienti adulti anche se il potenziale di crescita nelle colture a lungo termine delle cellule staminali cordonali appare superiore a quello delle cellule di origine midollare e quindi apre la strada allo studio di metodi per aumentarne il numero. Oltre a questo problema esiste la possibilità che le cellule del sangue donato presentino difetti genetici che potrebbero provocare una malattia in chi le riceve. Tali malattie potrebbero non risultare evidenti nel donatore per mesi o addirittura anni, periodo durante il quale il sangue potrebbe già essere stato donato ad altri.

Parallelamente a quanto accaduto per lo studio del sangue midollare anche nel cordone ombelicale è stata dimostrata la presenza di cellule staminali mesenchimali e anche in questo caso tali cellule sembrano più interessanti di quelle isolate dal midollo in quanto sono più facilmente ottenibili e biologicamente più giovani. Questo rende più semplice la loro espansione in coltura e forse le rende ancora meno immunogeniche di quelle del midollo data la loro immaturità. Inizialmente ricercate solo nel sangue cordonale, oggi la matrice del cordone o meglio la gelatina di Wharton sembra essere una fonte migliore visto che solo nel 30% dei campioni di sangue funicolare è possibile isolare le cellule staminali mesenchimali (MSC).

3. LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

I fibroblasti stromali furono isolati (in ratti e porcellini d'india) negli anni '70 grazie agli studi di Friedenstein che riscontrò tra le cellule del midollo osseo una rara (0,001%-0,01%) popolazione cellulare con morfologia fibroblastoide in grado di aderire a superfici plastiche crescendo sotto forma di colonie. Queste colonie vennero denominate come CFU-F (unità formanti colonie fibroblastoidi) e le cellule che le componevano possedevano un elevato potenziale proliferativo senza dimostrare particolari esigenze nutrizionali eccetto per la presenza di siero fetale bovino^{22,27}. Una decina di anni dopo queste cellule furono isolate anche dal midollo osseo umano²⁸.

Per tali ragioni negli anni il termine cellule staminali mesenchimali, così denominate per la prima volta da Caplan²⁹, ha progressivamente rimpiazzato il nome di fibroblasti stromali midollari.

Oggi si sa che le MSC sono virtualmente ubiquitarie, rappresentando una componente dello stroma di molti tessuti: le troviamo nel tessuto muscolare, adiposo, nel sangue e nella matrice del cordone ombelicale e nel liquido amniotico.

In questi ultimi anni è stato sottolineato come la definizione delle MSC includa nel nome il termine staminale anche se nella pratica vengono spesso connotate con questa sigla cellule che non hanno vere caratteristiche di staminalità, cioè autorinnovamento e multipotenzialità *in vivo*. Per questi motivi una recente *Consensus Conference* ha proposto di rinominare le MSC “*Mesenchymal stromal cells*”; tuttavia la denominazione “*Mesenchymal stem cells*” continua ad essere utilizzata in maniera prevalente, anche se meno corretta dal punto di vista concettuale.

3.1. Ruolo fisiologico delle MSC

Nei mammiferi adulti l'emopoiesi ha luogo nello spazio intra-osseo, nel cosiddetto midollo osseo (MO) che contiene le cellule staminali emopoietiche (CSE) e vasi sanguigni sinusoidali. Le CSE in via di sviluppo sono trattenute all'interno del midollo osseo fino al termine della loro maturazione e poi vengono liberate nel torrente circolatorio. Nel midollo osseo le CSE e la loro progenie sono circondate da cellule stromali comprendenti osteoblasti, fibroblasti, cellule reticolari avventiziali, cellule endoteliali e cellule staminali mesenchimali, che contribuiscono alla formazione della nicchia emopoietica³⁰.

In modelli murini sono stati descritti due tipi di nicchia coinvolti nella regolazione dell'emopoiesi, la nicchia endosteale e quella vascolare. La nicchia endosteale è costituita da osteoblasti e da cellule mesenchimali che rivestono la superficie endosteale dell'osso

trabecolare e fornisce un microambiente protettivo che garantisce il mantenimento e l'auto-rinnovamento delle CSE isolandole da stimoli differenziativi e pro-apoptotici che ridurrebbero la riserva di cellule staminali. In particolare il ruolo delle MSC sembra essere proprio quello di mantenere le CSE in uno stato quiescente.

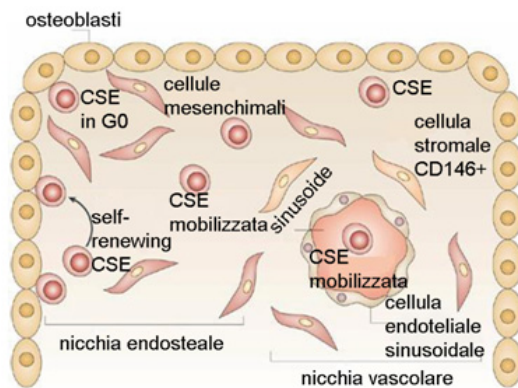


Fig.5 Rinnovamento e differenziamento delle CSE nella nicchia endosteale e in quella vascolare. Modificata da Uccelli et al. *Nat. Rev. Immunol.* 2008.

La nicchia vascolare è composta dalle cellule endoteliali sinusoidali e dalle cellule stromali subendoteliali CD146⁺ e controlla la differenziazione delle CSE e la liberazione delle cellule emopoietiche mature nel sistema vascolare. L'equilibrio tra mantenimento della quiescenza (fase G0 del ciclo cellulare) nella nicchia endosteale e differenziazione e reclutamento nella nicchia vascolare è il risultato finale di complesse interazioni molecolari tra le CSE e le cellule stromali delle nicchie (fig.5)³¹.

Esperimenti nell'animale hanno dimostrato che tutte le diverse componenti del microambiente della nicchia ematopoietica possono essere rigenerate a partire da un singolo tipo di MSC (CD146⁺), ma non da altre cellule con più limitato spettro di differenziazione (progenitori osteogenici o endoteliali)³².

I primi studi *in vitro* che hanno permesso di comprendere come il microambiente midollare possa regolare l'emopoiesi sono stati pubblicati da Dexter e coll. negli anni '80. È stato dimostrato come, in coltura, uno strato aderente di cellule stromali sia in grado di mantenere vitale per molte settimane la componente emopoietica e di supportare l'emopoiesi. In questo strato, rispecchiando quanto si può trovare nel microambiente osteo-midollare, sono stati individuati tre principali tipi cellulari: i macrofagi derivati dalle CSE, le cellule endoteliali microvascolari ed i fibroblasti stromali di derivazione mesenchimale³³.

Lo studio della composizione cellulare ed extracellulare del cordone ombelicale è stato preso in considerazione solo negli anni '90 principalmente per rispondere a due domande: ricercare possibili cause per i casi di pre-eclampsia e caratterizzare le cellule presenti nella matrice del funicolo inizialmente chiamate miofibroblasti per la loro similitudine ultrastrutturale a cellule muscolari lisce.

La matrice extracellulare o gelatina di Wharton è quel tessuto circondato esternamente dall'epitelio amniotico (in contatto quindi con il liquido amniotico), formato da uno o più strati di cellule epiteliali cubiche-squamose, e che circonda i vasi ombelicali (fig.6).

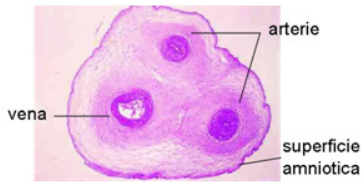


Fig.6 La gelatina di Wharton circonda i vasi ed è racchiusa dall'epitelio amniotico.

È un tessuto che non si trova in nessun'altra parte dell'organismo ed è resistentissimo, per evitare che qualcosa, come un momentaneo schiacciamento, impedisca che il nutrimento arrivi al feto. È costituito da collagene (di tutti i tipi ma la resistenza sembra essere data in particolare dal collagene di tipo III) e da glicosaminoglicani (GAG) per il 70% acido ialuronico.

Una diversa composizione della matrice extracellulare in particolare di acido ialuronico sembra essere responsabile di alcuni casi di pre-eclampsia.

La componente cellulare è costituita da mastociti e da miofibroblasti. Queste cellule sono state inizialmente chiamate così per la presenza di alcune caratteristiche condivise con le cellule muscolari: numerosi filamenti intracitoplasmatici, giunzioni intercellulari del tipo gap junction, filamenti citoscheletrici, espressione di proteine contrattili come actina, miosina non muscolare e desmina. D'altra parte è stata riscontrata anche l'espressione di vimentina espressa solitamente nei fibroblasti.

Oggi si sa che la composizione cellulare della gelatina di Wharton non è uguale in tutte le sue parti e molto probabilmente si modifica durante il corso della gravidanza. È stato dimostrato come le cellule stromali presenti nel tessuto mostrino differenti gradi di differenziazione che vanno dalle cellule mesenchimali ai miofibroblasti ³⁴.

- Le cellule più immature, ancora proliferanti, si trovano vicino alla superficie amniotica. Queste cellule molto probabilmente corrispondono alle MSC identificate e caratterizzate da molti autori e questa visione giustificherebbe la presenza di MSC anche nel liquido amniotico.
- Man mano che ci si allontana dalla superficie amniotica le cellule stromali acquisiscono le caratteristiche di cellule contrattili.
- Vicino ai vasi sono riscontrabili solo cellule differenziate in miofibroblasti.

Inoltre sono state riportate due possibili funzioni delle cellule stromali presenti nella gelatina: da una parte potrebbero partecipare alla regolazione del flusso del sangue cordonale tanto che una loro anomalia potrebbe ripercuotersi negativamente sulla formazione dei vasi e di conseguenza sulla crescita fetale. Dall'altra parte, bisogna ricordare che, durante la loro migrazione nel mesonefro, le isole emopoietiche sono avvolte da mesenchima

extraembrionario, simile alla gelatina di Wharton³⁵. La gelatina di Wharton potrebbe mantenere una simile proprietà di supporto emopoietico, come viene suggerito da studi *ex vivo*³⁶ e *in vivo* (favoriscono l'attecchimento delle CSE)^{37,38}. Questa ipotesi potrebbe venire supportata dalla dimostrazione che le MSC secernono acido ialuronico che sembra essere un importante fattore della nicchia emopoietica³⁹.

3.2. Le MSC *in vitro* e le loro caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche

Le MSC del MO vengono isolate sfruttando la loro capacità di aderire alla superfici plastiche; questo metodo consiste molto semplicemente nel seminare tutte le cellule mononucleate ottenute dopo separazione su gradiente di densità di un prelievo di sangue midollare^{40,41}. Dopo un giorno vengono quindi rimosse tutte quelle cellule che non hanno aderito alla plastica della flask, ottenendo un netto arricchimento nella popolazione di cellule mesenchimali. Per rimuovere completamente cellule contaminanti, che possono essere presenti soprattutto nei primi passaggi, sono stati sviluppati degli anticorpi monoclonali diretti contro antigeni di superficie specifici delle MSC. A cominciare da Stro-1⁴², CD133⁴³, CD271 (LNGFR/p75NTR)⁴⁴. Nonostante questo, il metodo ancora più utilizzato è quello che sfrutta l'adesione alla plastica. Le cellule vengono poi mantenute in coltura in semplice terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) addizionato di FBS (siero fetale bovino), e staccate con tripsina quando raggiungono l'80% di confluenza.

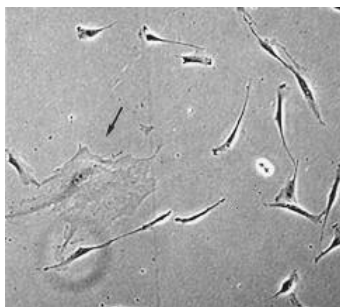


Fig.7 Una cellula a fazzoletto (indicata dalla freccia) circondata da cellule fibroblastoidi. Modificata da Colter et al. PNAS 2001; 98: 7841-7845.

La popolazione cellulare così ottenuta mostra una morfologia eterogenea: si riscontrano infatti due tipi cellulari principali. Da una parte vengono isolate cellule più piccole con una morfologia simil-fibroblastoide; dall'altra parte invece si possono notare cellule più grandi, con un citoplasma molto abbondante che vengono denominate a "fazzoletto" proprio per la loro forma e dimensione (fig.7). Le prime rispetto alle seconde mostrano inoltre una maggiore capacità di proliferare⁴⁵.

Per mezzo dello studio della formazione di colonie *in vitro* (CFU-F), la frequenza delle MSC nel midollo osseo è stata stimata attorno allo 0,001-0,01% delle cellule nucleate⁴⁶. Per questo motivo l'immunofenotipo può essere studiato solo su cellule espanse in coltura che potrebbero però aver perso o acquisito l'espressione di alcuni marcatori rispetto alle cellule appena isolate. Le MSC sono negative ai *markers* emopoietici (CD14, CD34, CD45), endoteliali (CD31), alle

molecole costimolatorie (CD80, CD86) ed all'HLA di classe II, mentre sono positive al CD29, CD44, CD73, CD105 e HLA di classe I (A, B, C) ⁴⁶⁻⁵¹ (fig.8 e tab.1).

MOLECOLA	FUNZIONE	ESPRESSA SU
CD14	recettore dell'LPS	monociti
CD34	ligando per la L-selectina	precursori emopoietici
CD45	molecola con attività tirosin-chinasica, aumenta il segnale trasdotto dal legame degli antigeni con i recettori presenti sulle cellule B e T	cellule emopoietiche
CD31	molecola di adesione, media il legame tra cellule endoteliali e tra cellule endoteliali e linfociti	monociti, piastrine, granulociti, cellule B, cellule endoteliali
CD80	costimolatore per l'attivazione dei linfociti T; ligando di CD28 e CTLA-4	cellule presentanti l'antigene
CD86	costimolatore per l'attivazione dei linfociti T; ligando di CD28 e CTLA-4	cellule presentanti l'antigene
HLA II	molecole su cui viene montato il peptide antigenico presentato ai linfociti T CD4	cellule presentanti l'antigene
CD29	subunità dell'integrina $\beta 1$, molecola di adesione	leucociti
CD44	lega l'acido ialuronico; media l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice	leucociti, eritrociti
CD73	ecto-5'-nucleotidase	cellule B e cellule T
CD105	endoglina, media la risposta cellulare al TGF-beta1	cellule endoteliali
HLA A, B, C	molecole su cui viene montato il peptide antigenico presentato ai linfociti T	cellule presentanti l'antigene

Tab.1 Caratteristiche dei marcatori utilizzati per l'identificazione delle MSC.

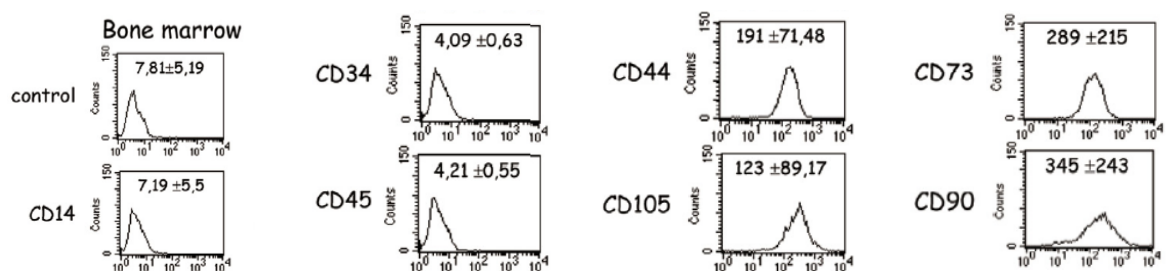


Fig.8 Immunofenotipo delle MSC midollari: studio di alcuni marcatori di superficie. Modificata da Djouad et al. *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7: 1304-1315.

E' stato descritto che le MSC secernono diverse citochine alcune delle quali svolgono la funzione di fattori di crescita emopoietici: IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14 e IL-15 ⁴⁷. Per quanto riguarda invece il *macrophage colony-stimulating factor* (G-CSF), e il

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-SCF) i risultati di diversi lavori sono discordanti^{36,47}.

Sono stati proposti diversi metodi per l'isolamento delle MSC dalla gelatina di Wharton:

- i vasi vengono rimossi e il tessuto rimasto viene trattato enzimaticamente (collagenasi e tripsina), quindi le cellule ottenute vengono lavate e messe in coltura⁵²;
- sempre dopo la rimozione dei vasi il tessuto rimasto viene semplicemente trattato mediante dissociazione meccanica e i frammenti ottenuti vengono trasferiti in piastre con del terreno, in attesa che le cellule migrino dal tessuto⁵³;
- il funicolo viene tagliato in pezzi di un paio di centimetri e questi vengono quindi tagliati longitudinalmente e posti in piastre da 6 pozzetti in modo che la superficie amniotica sia rivolta verso l'alto. Il tessuto interno viene ulteriormente inciso per aumentare l'estensione della superficie che dovrebbe trovarsi in contatto con la plastica e da cui dovrebbero migrare le cellule⁵⁴.

Anche in questo caso le cellule vengono coltivate in terreno DMEM addizionato del 10% FBS^{52,53}.

Le MSC così isolate presentano caratteristiche molto simili a quelle ottenute dal MO, a cominciare dalla morfologia: crescono in adesione alle superfici plastiche delle piastre di coltura e presentano anche in questo caso le due forme, quella a fazzoletto e quella fibroblastoide, più allungata. E' stato dimostrato che queste due distinte popolazioni cellulari differiscono per il contenuto in filamenti di vimentina (marcatore mesenchimale) e pancitocheratina (marcatore ecto-endodermale). La popolazione positiva sia alla vimentina che alla pancitocheratina è quella che presenta la forma a fazzoletto (tipo I). Si tratta di cellule tipiche della regione perivascolare e sembrano diminuire in numero al progredire dei passaggi. La popolazione più fusiforme e con un citoplasma allungato (tipo II), è positivo solo alla vimentina e si trova nella regione intervascolare. Entrambi questi tipi cellulari sono in grado di differenziare in diversi tipi di cellule della linea mesenchimale (fig.9)⁵⁵.

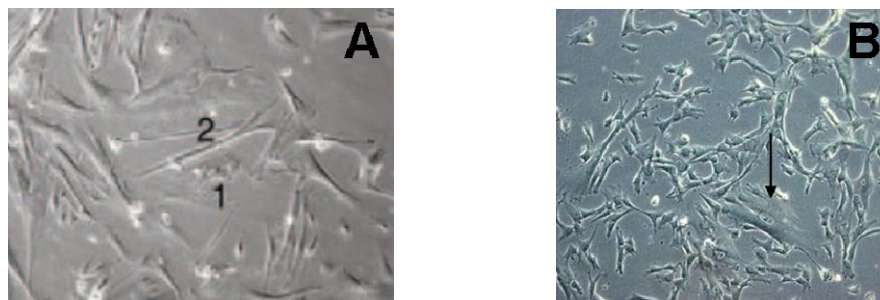


Fig.9 Cellule a fazzoletto e cellule fibroblastoidi: nell'immagine A le cellule a fazzoletto sono quelle indicate con il numero 1, nell'immagine B la cellula a fazzoletto è quella indicata dalla freccia. (A) Modificata da Karahuseyinoglu et al. Stem Cells 2007; 25: 319-331. (B) Modificata da La Rocca et al. Histochem. Cell Biol. 2008.

Rispetto alle mesenchimali isolate da midollo, quelle di origine cordonale hanno una frequenza maggiore di CFU-F, un tempo di duplicazione ridotto e compiono un numero di passaggi più elevato prima di raggiungere la senescenza replicativa, fenomeno che rallenta l'espansione cellulare.^{36,56}

Nella maggior parte delle esperienze, l'immunofenotipo di queste cellule non differisce significativamente da quello già descritto per le MSC di origine midollare, fatta eccezione per una diversa intensità di espressione dell'HLA di classe I ma solo secondo alcuni lavori^{36,55,57,58}. Inoltre in questo caso riveste maggiore importanza l'analisi del CD31 in quanto è l'unico marcatore in grado di distinguere tra cellule mesenchimali ed endoteliali che potrebbero essere presenti nella coltura come contaminanti derivati dai vasi ombelicali.

Infine, le MSC cordonali mostrano un profilo di espressione (misurata con RT-PCR) di citochine simile a quelle da midollo, fatta eccezione per il G-CSF e GM-CSF che secondo alcuni sarebbero espressi in quelle cordonali ma non in quelle midollari³⁶.

3.3. Le MSC *in vitro* e le loro caratteristiche funzionali

3.3.1 Capacità differenziative

Le MSC possiedono la capacità di differenziare in diversi tipi di cellule mesodermiche mature (osteociti, adipociti, condrociti) se mantenute in particolari terreni con l'aggiunta di diversi fattori a seconda del tipo di differenziamento (fig.10).

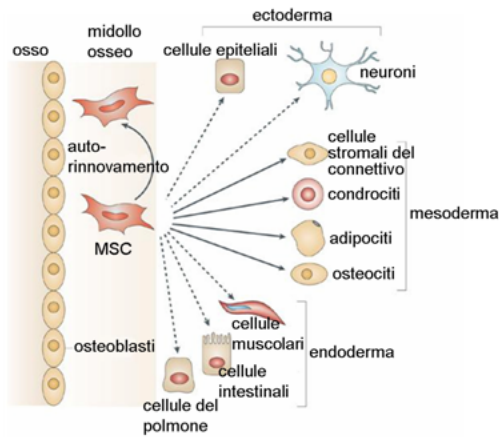


Fig.10 Capacità differenziativa delle MSC. Modificata da Uccelli et al. Nat. Rev. Immunol. 2008.

Inaspettatamente numerosi studi hanno dimostrato che le MSC possono transdifferenziare in cellule appartenenti ad altre linee germinative, ad esempio neuroni, cellule endoteliali e cardiomiociti, ma ci si è chiesti se questa loro straordinaria proprietà fosse piuttosto dovuta ad un artefatto delle condizioni di coltura, in particolar modo per il differenziamento in senso neurogenico.

Da una parte ci sono stati gli studi di differenziamento delle MSC ottenute da midollo osseo:

- in presenza di acido ascorbico, β -glicerolfosfato e desametasone danno luogo a osteociti^{36,46};
- in presenza di desametasone, insulina, indometacina e isobutil-metil-xantina formano adipociti^{36,46};
- in presenza di TGF- β (*Transforming growth factor beta*) differenziano in condrociti⁵⁶;
- in presenza di 5-azacitidina danno luogo a cellule morfologicamente simili ai cardiomiociti esprimenti troponina 1, connessina 43 e desmina⁵⁹;
- in presenza del 2% FCS (siero fetale di vitello) e VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare) differenziano in cellule endoteliali⁶⁰;
- in presenza di agenti riducenti, antiossidanti e sostanze chimiche che aumentino i livelli di AMPc (adenosin-monofosfato ciclico) (beta-mercaptoetanolo o dimetilsulfossido e idrossi-anisolo butilato) le MSC, in breve tempo, assumono una morfologia simil-neuronale, esprimendo proteine tipiche neuronali come nestina e tubulina III⁶¹. Venne in seguito dimostrato che la morfologia assunta era dovuta alla distruzione della rete di legami citoplasmatici dell'actina causata dagli agenti utilizzati⁶² e che queste modificazioni era possibile ottenerle anche trattando fibroblasti e cheratinociti⁶³.

Lo stato dell'arte per le MSC isolate dalla matrice del cordone ombelicale non differisce sostanzialmente da quelle del midollo: differenziano infatti, in adipociti (fig.11)^{54,55}, osteociti, neuroni³⁶, cardiomiociti, condrociti⁵² e cellule endoteliali⁶⁴.

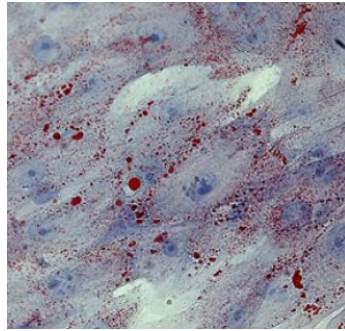


Fig.11 Differenziamento in senso adipogenico delle MSC: presenza di vacuoli di grasso evidenziati con una colorazione citochimica (Oil Red O) Modificata da La Rocca et al. *Histochem. Cell Biol.* 2008.

3.3.2 Capacità immunomodulanti

Esiste un consenso generale sul fatto che le MSC midollari esercitino una potente attività immunosoppressiva attraverso una complessa rete di interazioni con cellule dell'immunità sia innata (cellule dendritiche, *natural killer* e granulociti neutrofilii), sia adattativa (linfociti T e B) (fig.12)^{65,66}.

Effetti sulle cellule dell'immunità innata: cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) mieloidi svolgono un ruolo fondamentale nella presentazione dell'antigene ai linfociti T *naïve*. Per lo svolgimento di questa funzione le DC immature devono differenziare in mature, condizione caratterizzata dall'aumento di espressione delle molecole costimolatorie CD80 e CD86, delle molecole HLA di classe I e II e di altri marcatori come CD1a, CD83, CD11c, CCR7 e CD38. La maturazione delle DC è indotta da citochine pro-infiammatorie come TNF (Tumor necrosis factor), IL-1 e IL-6 e/o molecole associate a patogeni (es. lipopolisaccaride).

Le MSC inibiscono la maturazione *in vitro* delle DC derivate da monociti, riducendo l'espressione di superficie di molecole HLA di classe II, CD11c, CD83, CD80, CD86 e la produzione di IL-2 indotta dalla stimolazione via *Toll-like receptors* (TLR)⁶⁷. In seguito all'interazione con le MSC, le DC mieloidi diminuiscono la produzione di TNF, mentre quelle plasmocitoidi aumentano la produzione di IL-10⁶⁸. Complessivamente l'interazione delle MSC con le DC si traduce in un potente effetto anti-infiammatorio ed immunoregolatorio.

Effetti sulle cellule dell'immunità innata: cellule natural killer

La funzione principale delle cellule NK (*natural killer*) è quella di lisare cellule infettate da virus o cellule tumorali. Le funzioni delle cellule NK sono regolate da una serie di recettori che trasducono segnali attivatori ed inibitori. L'espressione di specifiche molecole su una cellula bersaglio, riconosciute dai recettori presenti sulle NK e la bassa o assente espressione di molecole HLA di classe I sono i requisiti essenziali perché questa possa essere lisata dalle *natural killer*^{69,70}.

La proliferazione dei linfociti NK appena isolati, indotta dall'IL-2 è inibita dalla cocoltura con le MSC, che bloccano anche la generazione della citotossicità e la produzione di citochine ⁷¹. Tale inibizione dipende dalla capacità delle MSC di diminuire l'espressione di alcuni recettori delle NK indispensabili per la loro attività ⁷¹.

Per contro cellule NK attivate sono in grado di uccidere efficacemente MSC autologhe ed allojeniche ⁷². La suscettibilità delle MSC alla lisi dipende, principalmente, dal basso livello di molecole HLA di classe I. Infatti, la pre-incubazione delle MSC con IFN- γ protegge in parte le MSC dalla citotossicità NK attraverso l'aumento di espressione di molecole HLA di classe I sulla superficie delle MSC ⁷².

Effetti sulle cellule dell'immunità innata: granulociti neutrofili

I granulociti neutrofili sono rapidamente mobilizzati nel corso di infezioni batteriche ed attivati a fagocitare ed uccidere i patogeni. In seguito ad interazione con particelle o prodotti batterici, i neutrofili aumentano la loro attività metabolica con incremento del consumo di ossigeno e generazione di anioni superossido e acqua ossigenata (*burst* ossidativo). Le MSC sembrano in grado di diminuire il *burst* ossidativo mediante un meccanismo dipendente dalla produzione costitutiva di IL-6. Altre funzioni dei neutrofili, come fagocitosi, espressione di molecole di adesione e chemiotassi stimolo-specifica non vengono modificate dall'incubazione con MSC ⁷³. L'attività delle MSC sui neutrofili può essere interpretata come un meccanismo di limitazione del processo infiammatorio.

Effetti sulle cellule dell'immunità adattativa: linfociti T

Le MSC inibiscono la proliferazione dei linfociti T stimolati con mitogeni policlonali, cellule allojeniche o antigeni ⁷⁴⁻⁷⁷. Il meccanismo responsabile di questa inibizione è il blocco dei linfociti T nella fase G1 del ciclo cellulare ⁷⁷, che ricorda la funzione fisiologica delle MSC nelle nicchie emopoietiche del midollo.

L'inibizione della proliferazione T, indotta dalle MSC comporta anche una diminuita produzione di IFN- γ e aumentato rilascio di IL-4, suggerendo che l'attività immunomodulante delle MSC si traduca nella deviazione di risposte Th1 a Th2 ^{67,68}.

Altri studi dimostrano che le MSC bloccano la citotossicità CTL dei linfociti CD8 ma non vengono lisate dagli stessi ⁷⁸⁻⁸⁰.

Le cellule T regolatorie sono specializzate nel sopprimere l'attivazione del sistema immunitario e mantenerne l'omeostasi e la tolleranza ad antigeni self. Le MSC aumentano la generazione di queste cellule attraverso un meccanismo indiretto mediato da IL-10 rilasciata da DC plasmocitoidi ⁶⁸ ed uno diretto legato al rilascio di HLA-G5 solubile da parte delle stesse MSC ⁸¹.

Effetti sulle cellule dell'immunità adattativa: linfociti B

Gli studi condotti sui rapporti tra linfociti B e MSC hanno prodotto diversi risultati presumibilmente dipendenti da variabili sperimentali come i rapporti numerici tra i due tipi di cellule, i tipi di stimoli impiegati e tecniche di coltura delle MSC. La maggior parte degli studi ha comunque dimostrato che le MSC inibiscono non solo la proliferazione di cellule B ma anche la loro differenziazione plasmacellulare e l'espressione di alcuni recettori per chemochine risulta diminuita⁸². Va però sottolineato che questi risultati sono stati ottenuti a rapporti tra cellule B e MSC elevati, mentre a rapporti inferiori (che si avvicinano a quelli fisiologici) le MSC possono, al contrario, stimolare la proliferazione e la differenziazione plasmacellulare dei linfociti B⁸³. E' quindi più probabile che, *in vivo*, la funzione dei linfociti B venga inibita indirettamente dalle MSC attraverso i loro effetti sulle cellule T.

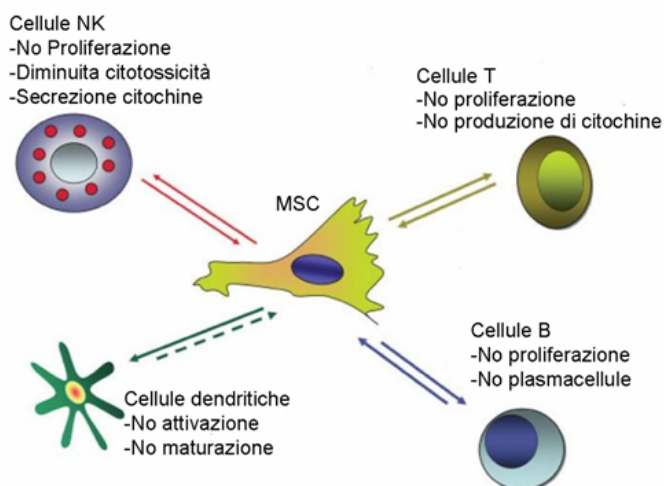


Fig.12 L'attività immunosoppressiva delle MSC si esercita principalmente attraverso effetti sulle cellule NK, sui linfociti T, sui linfociti B e sulle cellule dendritiche. Modificata da Uccelli et al. Eur. J. Immunol. 2006; 36: 2566-2573.

Meccanismi dell'immunosoppressione MSC-mediata

Gli effetti immunosoppressivi delle MSC possono essere mediati dal contatto con le cellule bersaglio, rilascio di fattori solubili (secreti dalle MSC costitutivamente o in seguito a contatto cellulare) o una combinazione dei due meccanismi.

Le molecole che potrebbero essere implicate sono: prostaglandina E2, indolamine 2,3-diossigenasi, TGF- β 1, IL-10, fattore di crescita epatocitario, IL-6, ossido nitrico ed eme-ossigenasi. La prostaglandina E2 è sintetizzata costitutivamente dalle MSC ma la sua produzione viene incrementata dalla presenza di citochine pro-infiammatorie come TNF e IFN- γ ⁶⁷. L'indolamine 2,3-diossigenasi è invece espressa solo in seguito all'esposizione delle MSC all'IFN- γ ⁸⁴.

Nonostante siano stati fatti grandi progressi nello studio dell'attività immunosoppressiva delle MSC midollari, rimane ancora molto da capire, in particolare sui meccanismi che regolano sintesi e rilascio dei mediatori solubili.

Se l'attività immunomodulante delle MSC ottenute da midollo osseo è stata oggetto di molte ricerche, quella delle MSC ottenute dalla matrice del cordone ombelicale non è stata studiata in maniera altrettanto approfondita. Il primo gruppo che ha dimostrato, nel 2008, un'attività immunoregolatrice nelle MSC isolate dalla gelatina di Wharton è stato quello di Weiss ⁸⁵:

- le MSC umane sopprimono la proliferazione di splenociti di ratto o di linfomonociti umani stimolati con concavalina A;
- le MSC umane non sono immunogeniche: non sono, quindi, in grado di attivare i linfociti T umani o gli splenociti di ratto;
- è stato dimostrato, mediante RT-PCR, che le MSC esprimono l'HLA-G6;
- le MSC non esprimono molecole costimolatorie come CD40, CD80 e CD86.

A questo sono seguiti altri 4 articoli che tuttavia non hanno completamente chiarito la funzione immunomodulatoria di queste cellule.

3.4. Le MSC in terapia

L'ultimo decennio è stato caratterizzato da una nuova sfida nella cura delle malattie: quella di realizzare farmaci il cui principio attivo siano le cellule; per questo motivo in questi ultimi anni si sente parlare di terapia cellulare.

Le cellule staminali mesenchimali, viste le loro caratteristiche funzionali (capacità differenziative, immunomodulanti e di sostegno nella crescita cellulare), sono oggi considerate le candidate ideali per questo scopo, da una parte per la cura delle malattie degenerative e dall'altra per ottenere un miglioramento nel trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Studi eseguiti su modelli animali hanno dimostrato l'efficacia di queste cellule, somministrate localmente, coltivate o meno su matrici biodegradabili di idrossiapatite, nel correggere difetti scheletrici (anomalie congenite o acquisite dell'osso o della cartilagine) ⁸⁶⁻⁸⁸. In maniera più sorprendente studi pre-clinici hanno dimostrato l'abilità delle MSC di attecchire e differenziare in numerosi tessuti/organi in seguito ad iniezione endovenosa sistemica ^{89,90}, ma non solo: queste cellule mostrano un particolare tropismo per le sedi di lesioni infiammatorie o neoplastiche. In questo senso le MSC sono state utilizzate in modelli di malattie immunopatologiche come la sclerosi multipla (encefalomielite sperimentale

autoimmune, EAE). Le cellule somministrate endovena in modelli murini di EAE hanno migliorato significativamente il decorso della malattia migrando negli organi linfoidi secondari e riducendo l'infiltrazione del sistema nervoso centrale da parte di linfociti T, B e macrofagi ⁹¹. In un altro modello murino di EAE le MSC hanno inibito *in vivo* la produzione di anticorpi patogenetici e sono migrate nel sistema nervoso centrale senza transdifferenziare in cellule neuronali, ma in loco hanno ridotto l'infiammazione, la demielinizzazione e la perdita degli assoni ⁹².

Inoltre la scarsa immunogenicità di queste cellule in seguito ad infusione *in vivo* consente di utilizzare in maniera intercambiabile MSC autologhe od allogeniche senza rischi apparenti per il ricevente.

Esistono però alcuni problemi sperimentali da superare nella speranza di utilizzare al meglio queste cellule sull'uomo. Il primo è ottenere, dopo espansione *in vitro*, un numero di MSC sufficiente per gli usi terapeutici. A questo scopo sono in studio fonti alternative al midollo osseo quali il cordone e il liquido amniotico. Infatti queste cellule vanno incontro dopo una trentina di raddoppiamenti al fenomeno chiamato senescenza replicativa che rallenta e blocca la loro espansione numerica ⁹³. L'altro problema è trovare un sostituto al siero fetale bovino, fonte di fattori di crescita per l'espansione cellulare, il cui utilizzo non viene accettato per il potenziale rischio di trasmissione di infezioni virali e di prioni dagli animali all'uomo ⁹⁴. L'uso del siero umano è già stato sperimentato ma con risultati contrastanti ⁹⁴.

Nonostante questi problemi non siano stati ancora risolti le MSC ottenute dal midollo osseo sono già state utilizzate in terapia, in particolare:

- è stata eseguita con successo l'infusione locale di MSC autologhe, espanse *in vitro*, assieme a matrice di idrossiapatite, su tre pazienti affetti da patologie dell'osso caratterizzate da ritardata guarigione delle fratture ⁹⁵;
- le MSC, in considerazione della loro localizzazione nell'osso del ricevente dopo somministrazione per via sistemica, sono state infuse a tre bambini affetti da osteogenesi imperfetta con significativi risultati clinici: accelerazione della velocità di crescita, aumento del contenuto minerale del corpo e riduzione delle fratture spontanee ⁹⁶;
- considerata la loro capacità immunoregolatoria le MSC sono state utilizzate con successo nel trattamento della *graft versus host* (GVH) acuta a seguito di trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche ⁹⁷⁻⁹⁹. In uno studio europeo recentemente pubblicato, l'infusione di MSC prevalentemente allogeniche in pazienti affetti da GVH acuta ha prodotto una risposta clinica completa in circa la

metà dei pazienti con ridotta mortalità da trapianto dopo un anno e più elevata sopravvivenza complessiva dopo due anni dal trapianto⁹⁸;

- infine le MSC sono state somministrate ai riceventi di trapianti di cellule staminali emopoietiche aplo-identici dimostrando che esse modulano l'alloreattività dell'ospite e favoriscono l'attecchimento delle HSC allogeniche^{38,100}.

Le MSC isolate dalla matrice del cordone ombelicale, al contrario, non sono ancora state utilizzate in *trials* clinici ma solo in modelli animali di malattie del sistema nervoso (morbo di Parkinson^{57,101} e degenerazione retinica¹⁰²), del sistema vascolare (necrosi ischemica dell'osso)⁶⁴ e del sistema muscolare (danno muscolare distrofico)¹⁰³. Inoltre, nonostante sia stata dimostrata, *in vitro*, un'attività immunoregolatoria delle MSC isolate da cordone ombelicale, i risultati ottenuti su modelli animali sono contraddittori e suggeriscono di prestare maggior attenzione per il loro utilizzo in clinica. Infatti MSC porcine che *in vitro* mostravano scarsa immunogenicità *in vivo* hanno indotto una risposta immune⁸⁵.

4. OBIETTIVI

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'attività immunoregolatrice di cellule staminali mesenchimali (MSC) ottenute dalla matrice del cordone ombelicale (gelatina di Wharton).

In letteratura è stata approfonditamente studiata la capacità immunomodulante delle MSC ottenute da midollo osseo, mentre ci sono ancora pochi lavori sulle cellule isolate dal cordone ombelicale.

Il vantaggio di utilizzare queste cellule consiste principalmente nella loro giovane età e nella conseguente possibilità teorica di mantenere più a lungo capacità riproduttive e multipotenza. E' stato infatti osservato che queste caratteristiche, proprie delle cellule staminali, vengono perse man mano che si progredisce con i passaggi di coltura verso quella che viene definita senescenza replicativa. E' ragionevole pensare che questo problema si presenti meno facilmente per cellule ottenute da tessuti fetali e neonatali piuttosto che da soggetti adulti.

Ci siamo quindi proposti di:

- mettere a punto un metodo per l'isolamento delle cellule dalla gelatina di Wharton;
- espandere le cellule ottenute fino a numeri sufficienti ai nostri scopi e confrontabili con quelli presenti in letteratura;
- verificare l'immunofenotipo di queste cellule e la loro capacità differenziativa;
- mettere a punto un test per verificare la capacità immunomodulante delle MSC su linfomonociti ottenuti da sangue periferico.

Inoltre ci siamo focalizzati sull'utilizzo del liquido follicolare (LF), già utilizzato da altri autori come fonte di fattori di crescita in metodiche di coltura di cellule embrionali ma mai utilizzato nei terreni di coltura per cellule staminali mesenchimali.

Il vantaggio teorico che ci proponiamo di ottenere con l'LF è duplice: da un lato ci si attende che i fattori in esso contenuti, normalmente sufficienti a fare da supporto alla crescita del cumulo ooforo, siano adatti a mantenere in coltura cellule staminali multipotenti; dall'altro si spera che l'utilizzo di additivi umani e non di origine animale possa trovare uno spazio di impiego per la coltura di queste cellule in un ambito clinico dove l'utilizzo di siero fetale costituisce ancora materia dibattuta.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Ottenimento del cordone ombelicale e isolamento della gelatina di Wharton

Il cordone ombelicale viene prelevato esclusivamente in seguito ad un parto cesareo con l'autorizzazione della partoriente che deve firmare un apposito consenso-informato. La gravidanza deve essere stata portata a termine normalmente e il bambino non deve presentare aneuploidie o altre patologie.

Il cordone viene reciso sterilmente, viene opportunamente spremuto in modo da eliminare il sangue contenuto nei vasi e successivamente viene lavato con abbondante soluzione fisiologica.

Sempre in ambiente sterile, il cordone ombelicale viene tagliato in frammenti della lunghezza di circa 1-2 cm. Successivamente, per ogni frammento, vengono incanulate le due arterie e la vena e, con l'ausilio di un bisturi, vengono escissi e rimossi i vasi mentre vengono mantenuti i frammenti di gelatina di Wharton. Questi frammenti vengono opportunamente sminuzzati fino ad ottenere una sorta di omogenato.

5.2 Colture cellulari

L'omogenato viene poi distribuito nelle piastre da sei pozzetti in terreno DMEM (Biochrom AG, Berlino, Germania) addizionato di penicillina, streptomina, anfotericina B, 10% FBS (Siero Fetale Bovino, StemCell, Vancouver, Canada) e 10% LF (pool di liquidi follicolari che sono stati ottenuti contestualmente al prelievo degli ovuli da follicoli ovarici di donne sottoposte a fecondazione assistita).

Il materiale così preparato viene incubato a 37°C, 5% CO₂ per una decina di giorni. E' importante in questa fase non muovere la piastra per l'intera durata dell'incubazione, in modo da favorire la migrazione indisturbata delle cellule verso la plastica.

Una volta raggiunta la confluenza dell'80-90%, le cellule vengono staccate utilizzando tripsina allo 0,25% (Biochrom AG Berlino, Germania), centrifugate e risospese in soluzione fisiologica. Vengono quindi contate utilizzando la cameretta di Burker e, metà vengono seminate nello stesso terreno e l'altra metà in terreno DMEM (Biochrom AG Berlino, Germania) addizionato di penicillina, streptomina, anfotericina B e 20% FBS (StemCell, Vancouver, Canada).

5.3 Immunofenotipo

L'immunofenotipo viene studiato analizzando l'espressione dei seguenti marker di superficie: CD14, CD105, CD45 (Caltag Laboratories, San Francisco, California), HLA A-B-C, CD73, CD29, CD44, CD31 (Biolegend, San Diego, California) e CD34 (Immunotech, Praga, Repubblica Ceca).

Le cellule vengono incubate con la miscela di anticorpi monoclonali, e dopo essere state fissate vengono analizzate con il citometro di flusso (DAKO) entro 48 ore.

5.4 Differenziamento adipogenico

Le cellule vengono seminate in piastre da 12 pozzetti alla densità di 11000 MSC per cm² in 1 ml di terreno totale (rispettivamente DMEM con solo FBS o con FBS e LF) e poi incubate a 37°C, 5% CO₂ fino al raggiungimento del 100% di confluenza.

Raggiunta la confluenza, le cellule vengono trattate con un terreno di induzione e uno di mantenimento, come dal protocollo fornito dalla ditta produttrice (Lonza, Poietics® hMSC Adipogenic BulletKit, Basel, Svizzera).

Le stesse cellule coltivate solo con il terreno di mantenimento serviranno da controllo negativo.

La differenziazione in adipociti si dovrebbe notare, osservando le cellule al microscopio, per la formazione di vacuoli. Un ulteriore riscontro si può ottenere colorando le cellule con Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Il colorante viene risospeso in 60% di isopropanolo e 40% di acqua distillata alla concentrazione di 0,21g/dl; la colorazione è stata eseguita utilizzando il protocollo descritto nell'articolo di La Rocca e collaboratori⁵⁴.

5.5 Valutazione dell'effetto delle MSC sulla proliferazione di linfociti

MSC irradiate e non, vengono seminate in piastre da 48 pozzetti, 2,5x10⁴ per pozzetto in 250 µL di terreno DMEM addizionato del 10% FBS. Nelle piastre *transwell*, da 24 pozzetti, sono seminate 5x10⁴ cellule in 500 µL di terreno.

Dopo circa 24 ore (tempo sufficiente affinché le MSC aderiscano bene alla plastica) vengono seminati 2x10⁵ PBMC (peripheral blood mononuclear cells), in ciascun pozzetto dove erano già state incubate le MSC, in 250 µL di RPMI (Biochrom AG, Berlino, Germania) addizionato del 10%FBS; e 4x10⁵ PBMC in 250 µL di RPMI nelle piastre *transwell*.

I PBMC utilizzati sono ottenuti da sangue periferico eparinato mediante centrifugazione su gradiente di densità e sono poi marcati con il carboxy-DFFDA, SE (Carboxylic acid diacetate, succinimidyl ester, Invitrogen, Carlsbad, California). E' un colorante citoplasmatico

fluorescente che possiede la caratteristica di distribuirsi equamente nelle cellule figlie ad ogni divisione cellulare, diminuendo di concentrazione e quindi di intensità in modo proporzionale al numero di divisioni a cui le cellule vanno incontro. Questo permette di monitorare, tramite citofluorimetria, il numero di divisioni cellulari. (fig.13). Dopo tre giorni di co-coltura i PBMC sono sottoposti a citofluorimetria e i dati sono analizzati con il software FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon) in modo da ottenere la percentuale di precursori proliferati.

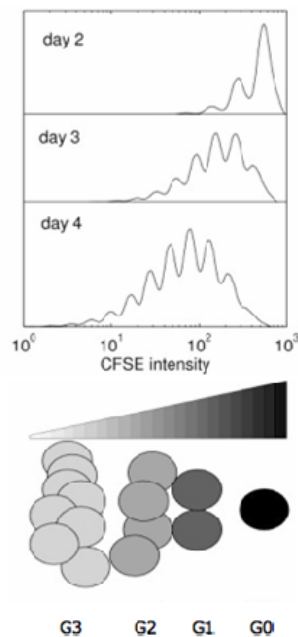


Fig.13 Dimezzamento dell'intensità di fluorescenza del carboxy-DFFDA, SE ad ogni divisione cellulare. Ogni picco rappresenta una generazione cellulare.

Sono stati utilizzati i seguenti stimoli:

- anti-CD3 e anti-CD28 alla concentrazione di 1 µg/ml;
- PHA (phytohemagglutinin) alla concentrazione di 1 µg/ml;
- anti-HLA-G per verificare se l'eventuale soppressione della proliferazione cellulare potesse essere dovuta a fattori solubili come HLA-G, come descritto in letteratura, alla concentrazione di 5, 10, 20 µg/ml.

Sono stati fatti in tutto tre diversi esperimenti nei quali alcune condizioni sono state ripetute e altre no. Nella tabella (tab.2) sono riportate tutte le condizioni analizzate in ciascun esperimento.

Campioni	Esp. 1	Esp. 2	Esp. 3
PBMC	✓	✓	✓
PBMC + PHA	✓	✓	✓
PBMC + α CD3- α CD28	✓	✓	✓
PBMC + PHA + α HLA-G 10			✓
MSC 20% FBS			✓
MSC 20% FBS + PHA			✓
MSC 20% FBS + α CD3- α CD28			✓
MSC 20% FBS + α HLA-G			✓
MSC 20% FBS + PBMC			✓
MSC 20% FBS + PBMC + PHA			✓
MSC 20% FBS + PBMC + α CD3- α CD28			✓
MSC 20% FBS + PBMC + PHA + α HLA-G 5			✓
MSC 20% FBS + PBMC + PHA + α HLA-G 10			✓
MSC 20% FBS + PBMC + PHA + α HLA-G 20			✓
MSCi 20% FBS			✓
MSCi 20% FBS + PHA			✓
MSCi 20% FBS + α CD3- α CD28			✓
MSCi 20% FBS + α HLA-G			✓
MSCi 20% FBS + PBMC			✓
MSCi 20% FBS + PBMC + PHA			✓
MSCi 20% FBS + PBMC + α CD3- α CD28			✓
MSCi 20% FBS + PBMC + PHA + α HLA-G 5			✓
MSCi 20% FBS + PBMC + PHA + α HLA-G 10			✓
MSCi 20% FBS + PBMC + PHA + α HLA-G 20			✓
MSC 10% FBS/10% LF	✓	✓	✓
MSC 10% FBS/10% LF + PHA	✓	✓	✓
MSC 10% FBS/10% LF + α CD3- α CD28	✓	✓	✓
MSC 10% FBS/10% LF + α HLA-G			✓
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC	✓	✓	✓
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA	✓	✓	✓
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC + α CD3- α CD28	✓	✓	✓
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA + α HLA-G 5			✓
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA + α HLA-G 10			✓
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA + α HLA-G 20			✓
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC in TW	✓	✓	
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA in TW	✓	✓	
MSC 10% FBS/10% LF + PBMC + α CD3- α CD28 in TW	✓	✓	
MSCi 10% FBS/10% LF	✓	✓	✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PHA	✓	✓	✓
MSCi 10% FBS/10% LF + α CD3- α CD28	✓	✓	✓
MSCi 10% FBS/10% LF + α HLA-G			✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC	✓	✓	✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA	✓	✓	✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC + α CD3- α CD28	✓	✓	✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA + α HLA-G 5			✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA + α HLA-G 10			✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA + α HLA-G 20			✓
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC in TW	✓	✓	
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC + PHA in TW	✓	✓	
MSCi 10% FBS/10% LF + PBMC + α CD3- α CD28 in TW	✓	✓	

Tab.2 Tre diversi esperimenti nei quali sono stati riportati tutti i punti analizzati.
 α =anti; TW=transwell.

6. RISULTATI

6.1 Caratteristiche delle cellule stromali ottenibili da cordone ombelicale

6.1.1 Morfologia

Per prima cosa possiamo osservare come, trascorsi i dieci giorni in cui i pezzetti di cordone vengono lasciati nell'incubatore a riposo in terreno addizionato di 10% FBS e 10% LF, le cellule migrino dai frammenti alla plastica del pozzetto (fig.14A).

Le cellule così ottenute si possono classificare in due tipi principali: un tipo più grande, con citoplasma molto abbondante e di forma quadrata che, in accordo con vari autori, abbiamo definito “a fazzoletto” e un tipo più allungato, molto simile ai fibroblasti (fig.14B). Queste cellule ricordano molto quelle descritte dal gruppo di Karahuseyinoglu, che si differenziano in tipo I e tipo II in base alla diversa espressione di vimentina e pancitocheratina descritte nell'introduzione.

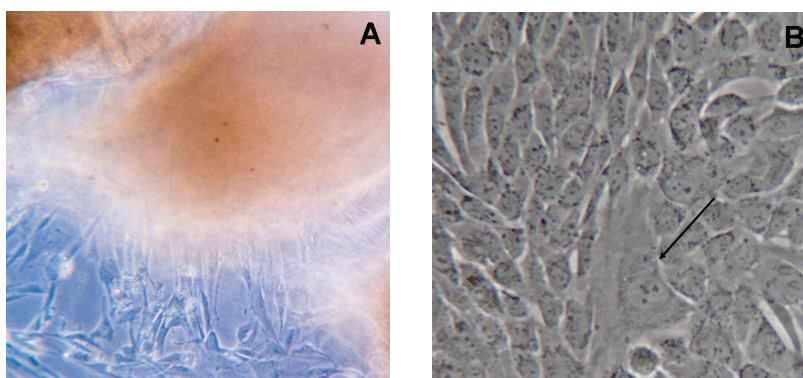


Fig.14 Cellule che migrano dai frammenti di tessuto, aderendo alla plastica (A) e una cellula a “fazzoletto”(indicata dalla freccia) circondata da cellule simil-fibroblasti (B).

Quando poi vengono suddivise e coltivate nei rispettivi mezzi di coltura, le cellule acquisiscono morfologie diverse. In presenza di 20% FBS le cellule assumono fin dall'inizio dimensioni maggiori e hanno una forma più allungata (simil-fibroblasti) (fig.15A,C), mentre in presenza di 10% FBS e 10% LF sono di dimensioni più piccole e di forma tondeggiate, caratteristica che mantengono anche per molti passaggi successivi (fig.15B,D).

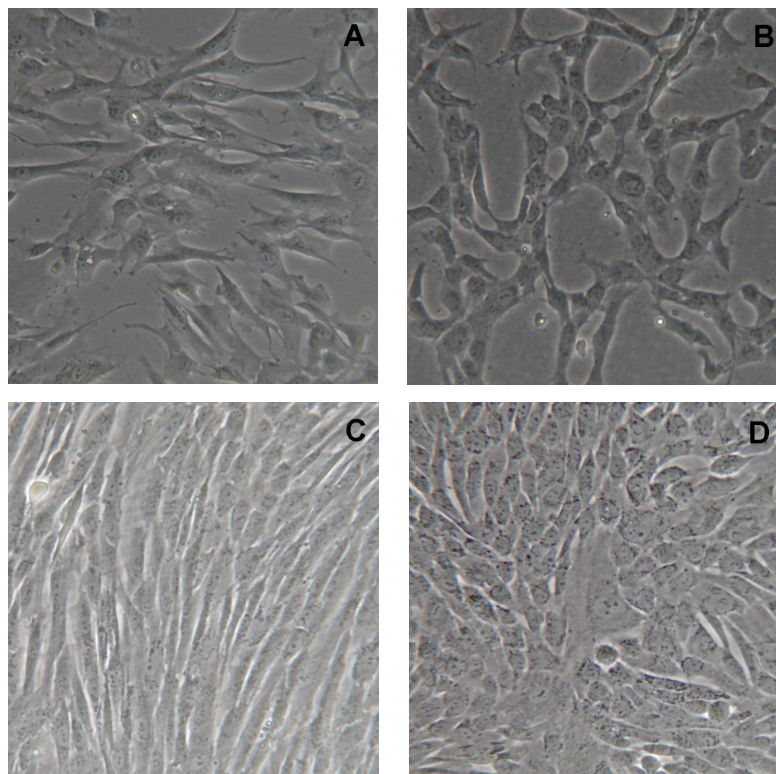


Fig.15 Sopra: cellule non a confluenza coltivate solo con FBS (A), o con FBS e LF (B). Sotto: cellule a confluenza. Con il solo FBS mostrano una morfologia più allungata (C), mentre con entrambi gli additivi sono più rotondeggianti (D).

Osservando le cellule al microscopio è possibile notare come inizialmente queste tendano ad associarsi e crescano talora circoscrivendo lacune circolari (in particolare quelle coltivate

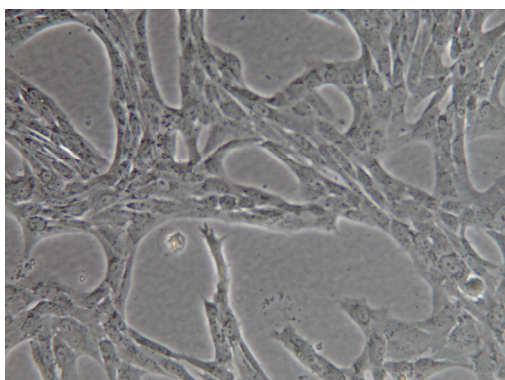


Fig.16 Lacune circolari in cellule coltivate in terreno addizionato di 10% FBS e 10% LF.

con 10% FBS e 10% LF) che solo successivamente vengono riempite quando le cellule raggiungono la confluenza (fig.16).

Queste cellule sono di grandi dimensioni: quelle più allungate hanno un asse maggiore di circa 100 micrometri e una larghezza inferiore ai 50, mentre quelle a fazzoletto arrivano ad essere circa il doppio.

Abbiamo inoltre notato che le cellule coltivate in terreno contenente liquido follicolare crescono immerse in una gelatina molto compatta che tende a sciogliersi a temperatura ambiente.

6.1.2 Immunofenotipo

Abbiamo analizzato l'immunofenotipo delle MSC nelle due diverse condizioni di coltura, in diversi cordoni e a diversi passaggi.

Come descritto precedentemente le cellule sono di grandi dimensioni e questa caratteristica è evidente anche dall'osservazione dello scatter citometrico. Sono positive ai quattro marker tipici delle cellule staminali mesenchimali (CD44, CD105, CD29 e CD73) (fig.17).

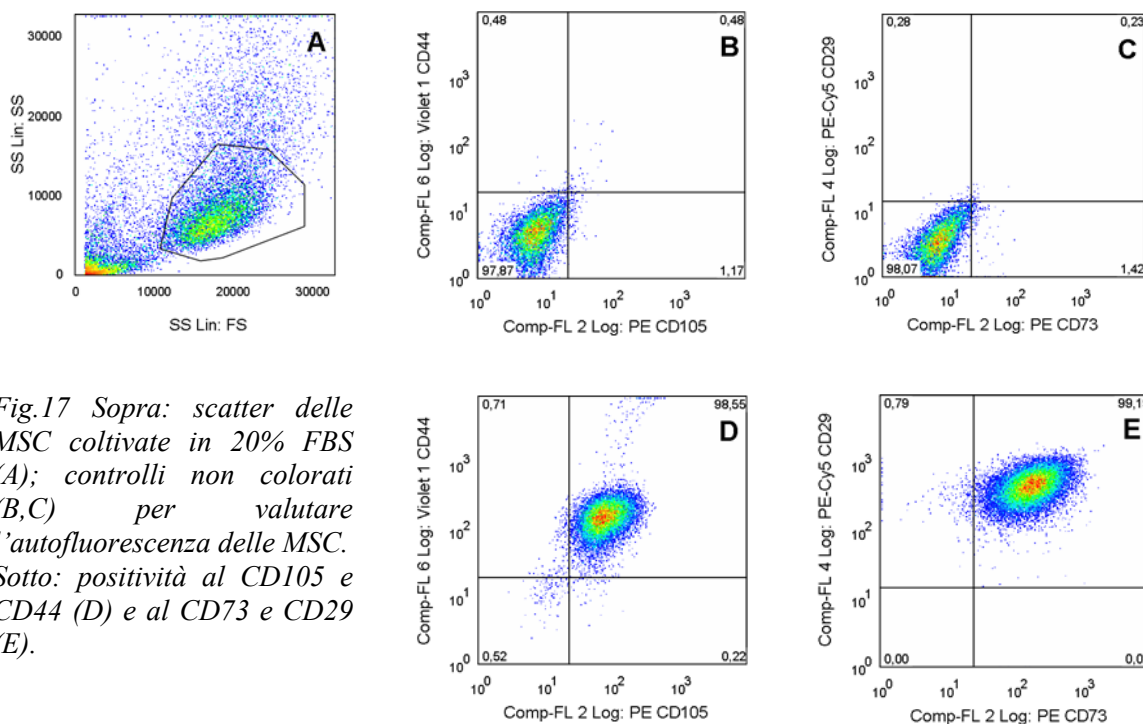


Fig.17 Sopra: scatter delle MSC coltivate in 20% FBS (A); controlli non colorati (B,C) per valutare l'autofluorescenza delle MSC. Sotto: positività al CD105 e CD44 (D) e al CD73 e CD29 (E).

Nell'esperienza acquisita nelle successive letture ci si è resi conto che in diversi cordoni e in diversi passaggi l'immunofenotipo può mostrare diversità più o meno rilevanti. Abbiamo infatti valutato per tre cordoni la stabilità dei marcatori delle MSC nel tempo: abbiamo riscontrato una variabilità nell'intensità di fluorescenza per tutte le molecole studiate, con tendenza ad aumentare o diminuire nel tempo in modo imprevedibile. A questo non sembra corrispondere una particolare morfologia (fig.18).

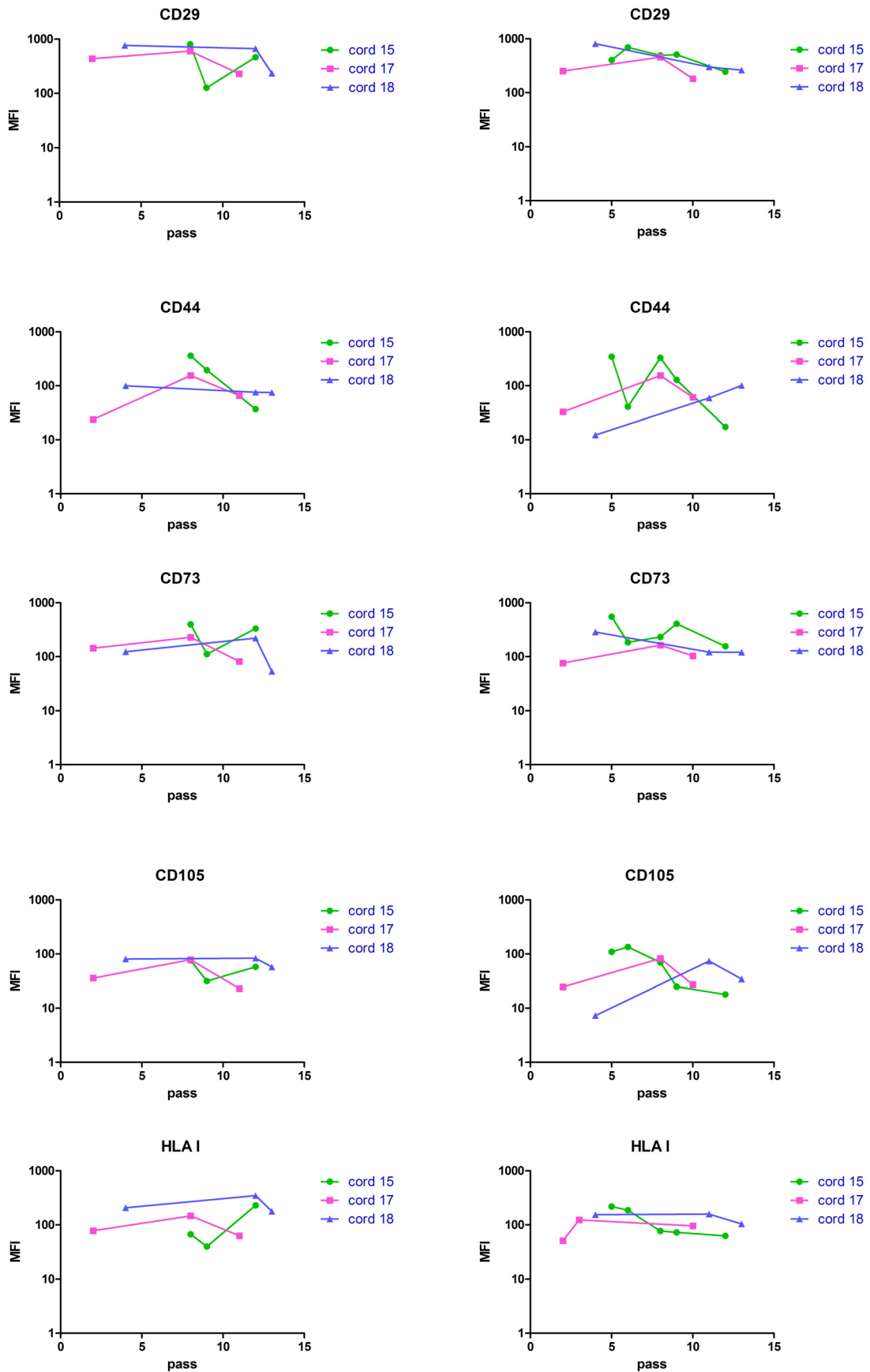


Fig.18 Intensità di fluorescenza media (MFI) dei diversi marcatori di superficie delle MSC in dipendenza dei vari passaggi cellulari. A sinistra le cellule coltivate in DMEM addizionato di FBS, a destra quelle coltivate in terreno più FBS e LF.

In ogni caso, presi tutti assieme i dati mostrano un'espressione più o meno positiva del CD44, CD105, CD73, CD29 ed HLA-I, sia nelle cellule coltivate con il solo FBS che in quelle coltivate sia con FBS che con LF. La variabilità di intensità di espressione in presenza di liquido follicolare è comunque maggiore per il CD44 e per il CD105, mentre i valori sono più compatti per il CD29 e per l'HLA-I; per il CD73 la situazione è intermedia. In presenza del solo FBS c'è una maggior dispersione dei punti nel grafico, ad indicare una maggiore variabilità nell'intensità di fluorescenza.

Le molecole CD14, CD34, CD45 e CD31 rimangono sempre negative sia in presenza di liquido follicolare che del solo FBS in modo abbastanza compatto, fatta eccezione per una maggior dispersione dei punti riguardanti il CD31 (fig.19).

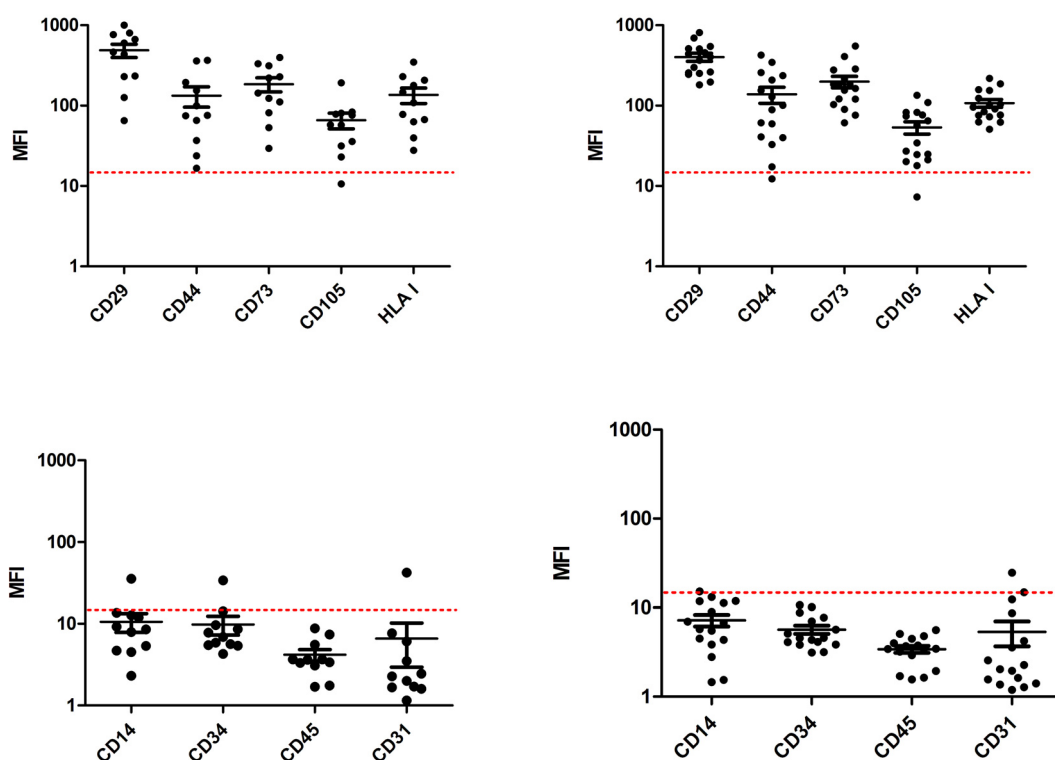


Fig.19 Intensità di fluorescenza media (MFI) dei diversi marcatori di superficie delle MSC, analizzati indipendentemente dal cordone e dal passaggio cellulare. A sinistra le cellule coltivate in DMEM addizionato di FBS, a destra quelle coltivate in terreno più FBS e LF. Sopra i marcatori descritti in letteratura come positivi e sotto quelli negativi. La linea rossa tratteggiata rappresenta il limite di positività. Le letture fatte per le cellule coltivate in presenza di FBS e LF sono di più.

6.1.3 Caratteristiche di crescita

Come descritto in letteratura, le MSC hanno la capacità di raddoppiare la propria popolazione in breve tempo. Nei grafici sotto abbiamo riportato le curve di crescita di due campioni: abbiamo analizzato l'andamento di crescita nei primi 5 passaggi corrispondenti a

circa 15 giorni di coltura. Nel campione A, nelle cellule coltivate nei due terreni non si evidenziano grandi differenze, fatta eccezione per una piccola battuta di arresto, negli ultimi passaggi, nelle cellule coltivate con il solo FBS (fig.20A). Nel grafico a destra, invece, le cellule coltivate con entrambi gli additivi, dopo un iniziale rallentamento mostrano, nei successivi passaggi, una crescita esponenziale (fig.20B).

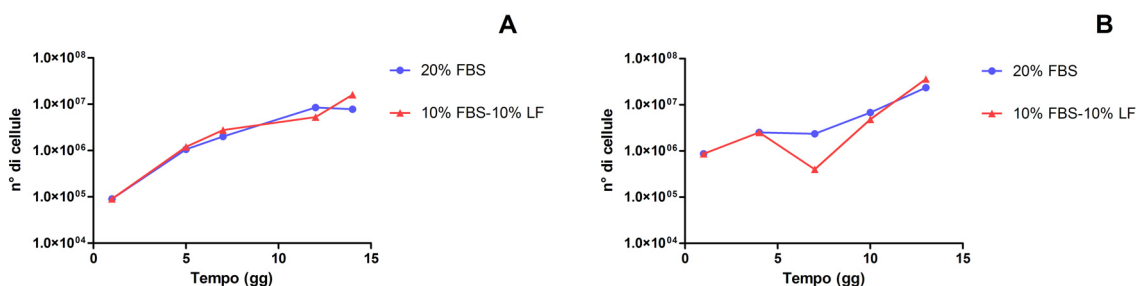


Fig.20 Curve di crescita di due campioni, analizzate nei primi 5 passaggi, corrispondenti a circa 15 giorni di coltura.

Queste cellule, in particolare in presenza del liquido follicolare, tendono ad aggregare subito quindi è possibile che si siano verificati degli errori nella conta cellulare o nella successiva semina.

Le cellule coltivate nelle due condizioni, sono state portate a passaggi elevati, 22-25 passaggi (dai due ai tre mesi di coltura), anche se risultava evidente il cambio di morfologia, l'aumento di dimensioni e un profondo rallentamento del tempo di crescita. Non abbiamo notato grandi differenze nelle diverse condizioni di coltura, anche se, almeno al microscopio, le cellule coltivate in presenza di LF sembravano stare meglio, essere più piccole e continuare comunque a duplicarsi anche oltre il P25, anche se molto lentamente.

6.1.4 Differenziamento adipogenico

Abbiamo cercato di verificare se le MSC, coltivate nei due diversi terreni, siano in grado di compiere il differenziamento in senso adipogenico e se c'è qualche differenza tra le due condizioni di coltura.

Come possiamo notare dalle immagini, le cellule che stanno differenziando in adipociti già al 23° giorno di induzione acquistano una morfologia meno allungata e più tondeggianta rispetto ai corrispettivi controlli negativi (fig.21A,B) e nelle MSC coltivate con 10% FBS e 10% LF si vedono già i vacuoli di grasso (fig.21B).

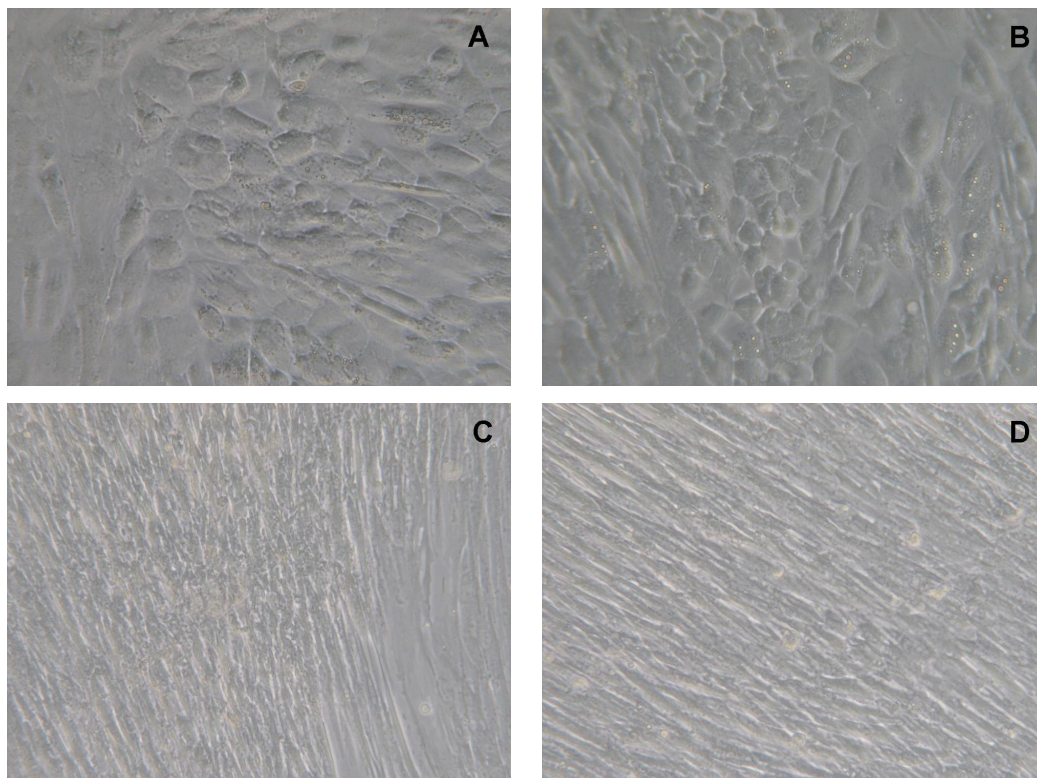


Fig.21 Foto scattate al giorno 23 di induzione. Sopra (A, B) le cellule sulle quali è stato indotto il differenziamento adipogenico; sotto (C, D) i rispettivi controlli. A sinistra (A, C) le cellule coltivate con il solo FBS; a destra (B, D) le cellule coltivate sia in presenza di FBS che di LF. Le cellule in cui è stato indotto il differenziamento sono più rotondeggianti e in presenza dell'LF (B) sono già presenti i vacuoli.

Procedendo alla colorazione con Oil Red O delle cellule al termine del processo induttivo, abbiamo ottenuto l'evidenziazione del contenuto lipidico dei vacuoli formatisi all'interno delle cellule indotte (fig.22).

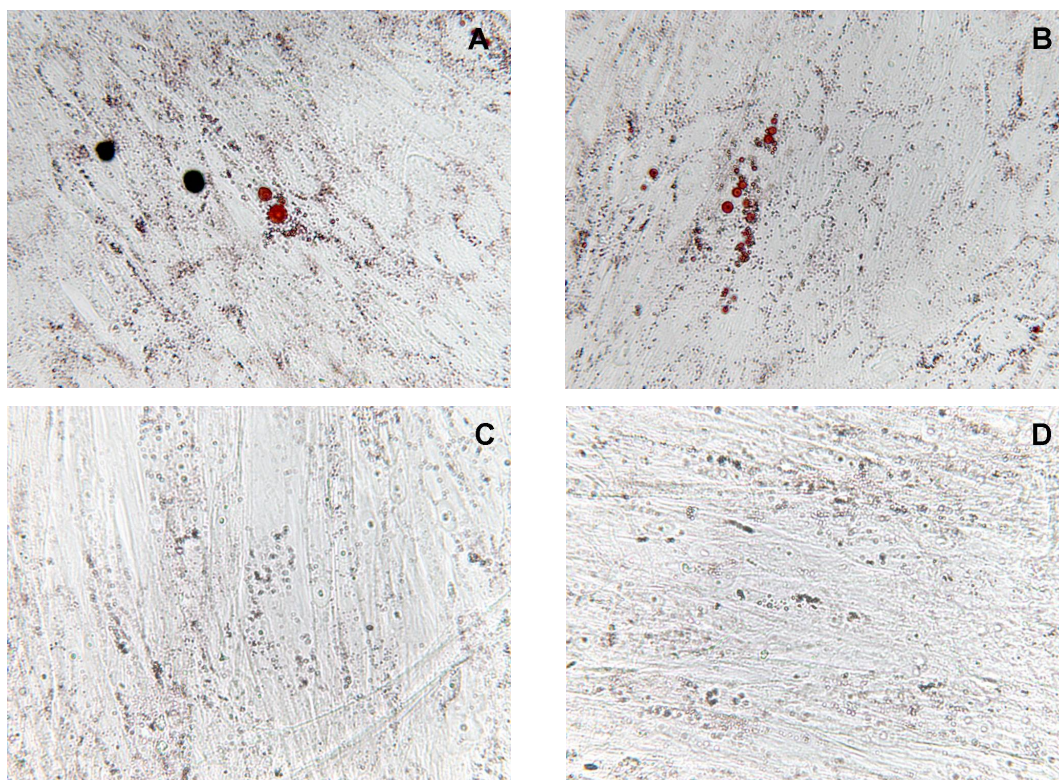


Fig.22 Sopra (A, B): le cellule sulle quali è stato indotto il differenziamento adipogenico; sotto (C, D): i rispettivi controlli. A sinistra (A, C): le cellule coltivate con il solo FBS; a destra (B, D): le cellule coltivate sia in presenza di FBS che di LF. Le cellule in cui è stato indotto il differenziamento presentano dei vacuoli che si sono colorati con l'Oil Red O, in maggior numero nelle cellule coltivate sia con FBS che con LF.

Si possono notare in rosso i vacuoli, anche se di piccole dimensioni rispetto a quelli presenti negli adipociti maturi.

Le cellule dei controlli negativi non manifestano la presenza di vacuoli, come confermato dalla colorazione.

Quello che possiamo dire, anche se necessita di ulteriori verifiche, è che nelle cellule coltivate con il liquido follicolare, è più evidente la differenziazione in senso adipogenico rispetto a quelle coltivate con il solo siero fetale bovino.

6.2 Effetto delle MSC sulla proliferazione di linfociti

6.2.1 Inibizione della proliferazione

L'aggiunta di MSC riduce in modo rilevante la risposta proliferativa di linfociti in seguito a stimolazione con PHA. L'effetto risulta evidente osservando il cambiamento nella distribuzione delle generazioni linfocitarie dopo tre giorni dallo stimolo (fig.23).

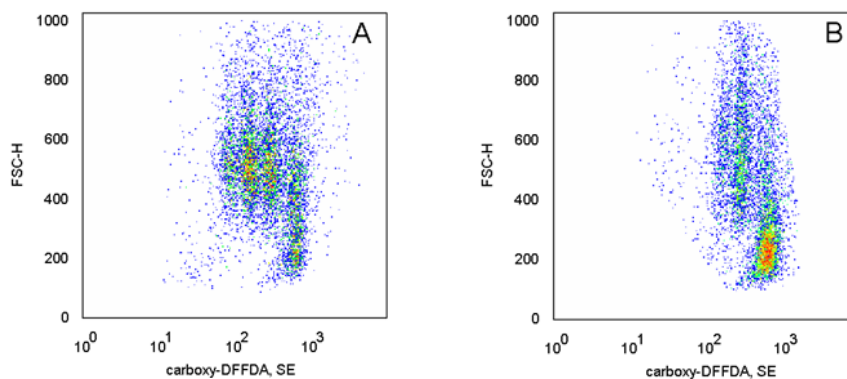


Fig.23 Proliferazione di PBMC attivati con la PHA (A); riduzione della proliferazione dei PBMC attivati con la PHA in presenza di MSC (B): si nota un aumento di intensità della popolazione più a destra che rappresenta le cellule resting e una corrispondente diminuzione delle popolazioni più a sinistra (cellule proliferate).

Nelle condizioni utilizzate si assiste circa ad un dimezzamento della proliferazione in presenza di MSC, mentre i risultati sono un po' peggiori nel caso che si utilizzino cellule irradiate. Questo andamento è stato riprodotto in tre esperimenti indipendenti ma i numeri sono insufficienti a rendere statisticamente significativa la differenza. Tuttavia l'effetto sulla proliferazione appare evidente, con la forte riduzione della produzione di citochine linfotrope, con particolare riferimento all'IFN- γ .

Per quanto riguarda le altre citochine i dati più evidenti riguardano la forte riduzione del TNF- α e il massiccio aumento dell'IL-6.

Misurazioni effettuate sulle sole MSC (dati non riportati) non hanno mostrato rilevante produzione di nessuna citochina eccetto che per l'IL-6, prodotta in elevate quantità, simili a quelle riscontrate in co-cultura (nell'ordine dei 5000 pg/ml). E' ragionevole pensare che l'IL-6 misurata nelle co-culture sia quindi prodotta dalle MSC. Per quanto riguarda l'IL-4 e l'IL-10 non si è osservato l'aumento precedentemente descritto da altri autori per le MSC da midollo osseo (fig.24).

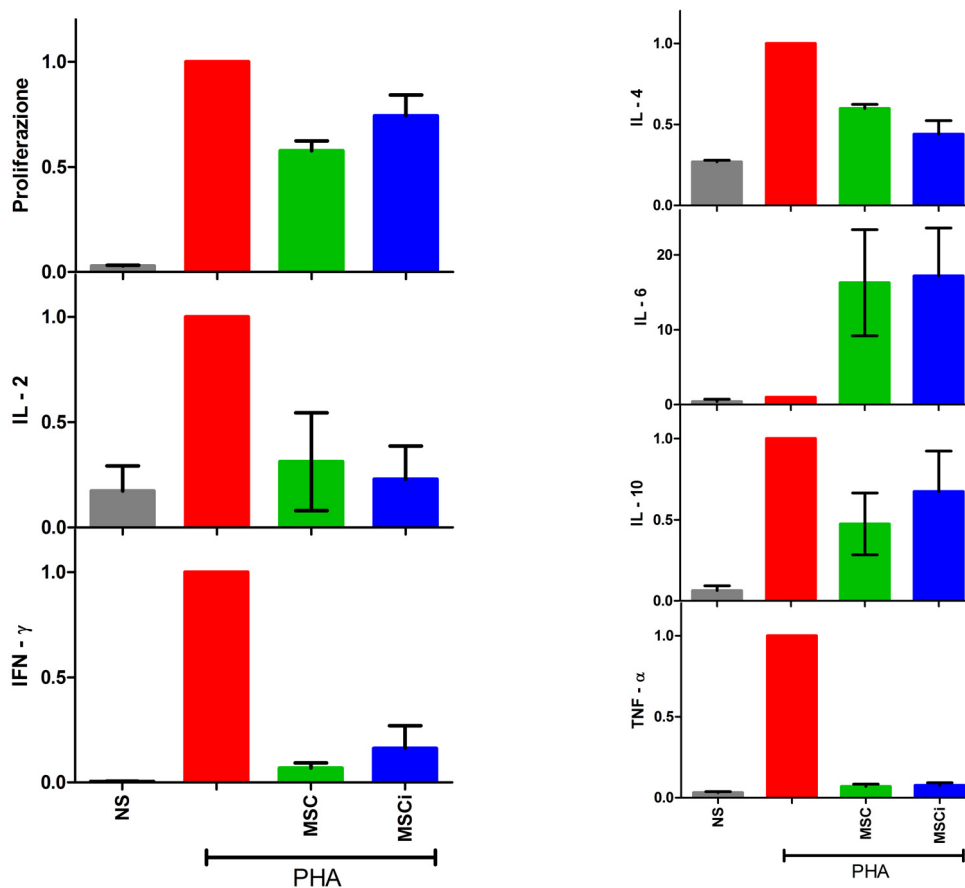


Fig.24 Il grafico rappresenta la media dei tre esperimenti (tab.2). In ogni esperimento i dati ottenuti per le cellule stimulate in assenza di MSC sono stati posti per convenzione uguale a 1 (barra rossa) e gli altri risultati sono stati espressi in percentuale rispetto a questo. A sinistra andamento della proliferazione e delle citochine linfotrope, a destra le altre citochine.

Il test di proliferazione è stato ripetuto in un'occasione paragonando l'effetto delle MSC coltivate con i due diversi tipi di supplemento. Come si può vedere nella figura non ci sono rilevanti differenze nei risultati ottenibili con i due tipi di cellule né nella proliferazione né nella produzione di citochine (fig.25).

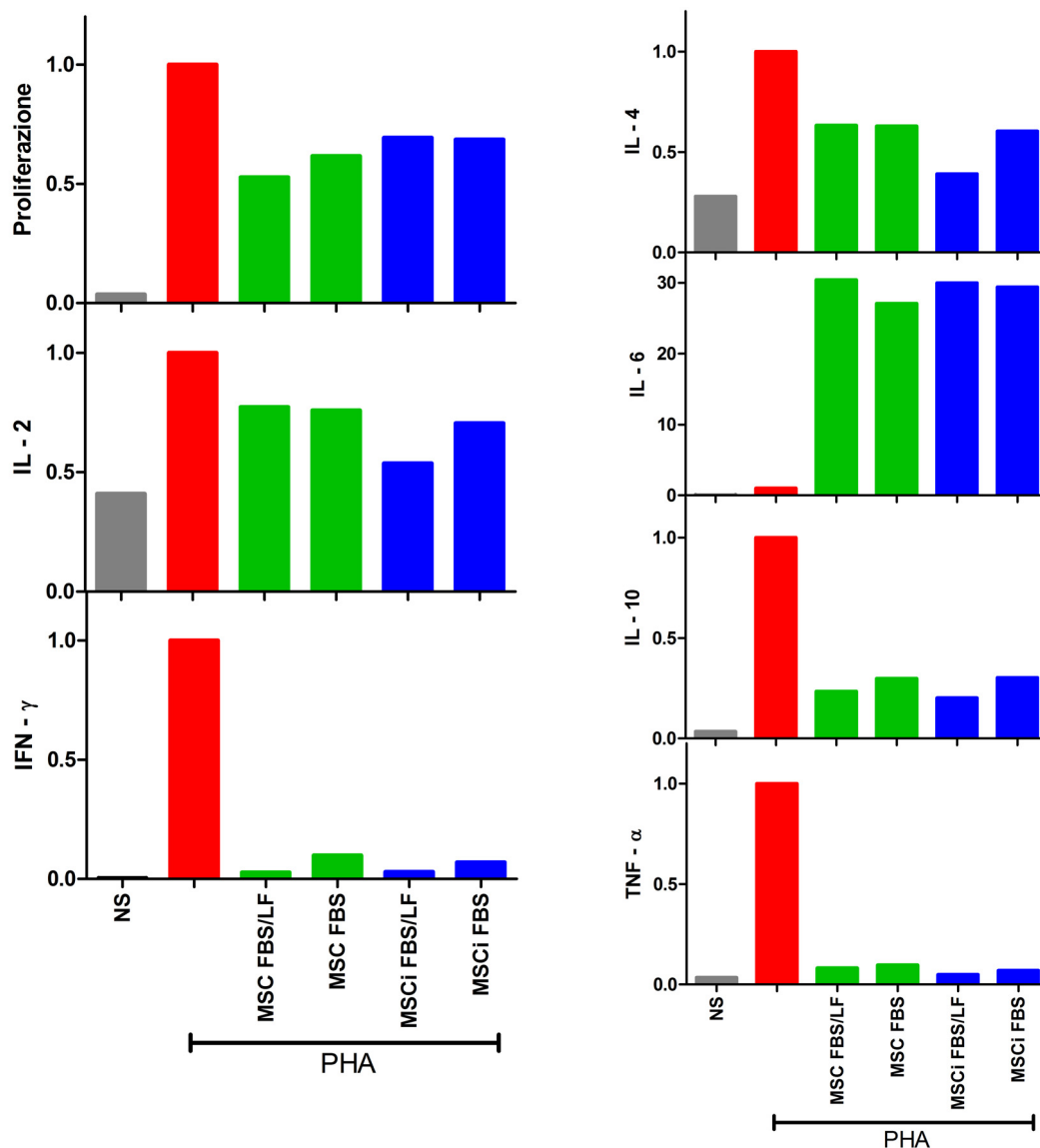


Fig.25 Il grafico rappresenta i risultati dell'esperimento n° 3 (vedi tab.2). I dati ottenuti per le cellule stimolate in assenza di MSC sono stati posti per convenzione uguale a 1 (barra rossa) e gli altri risultati sono stati espressi in percentuale rispetto a questo. A sinistra andamento della proliferazione e delle citochine linfotrope, a destra le altre citochine.

6.2.2 Necessità del contatto cellulare o di mediatori solubili: studio in transwell

Per esaminare se l'effetto inibitore sulla proliferazione sia dovuto a meccanismi dipendenti dal contatto cellulare o alla produzione di mediatori solubili abbiamo effettuato il test di soppressione utilizzando il modello del *transwell*. I risultati mostrano che l'inibizione della proliferazione non si mantiene nel caso in cui le MSC vengano separate dai linfociti per mezzo di una membrana semipermeabile (*transwell*) (fig.26). Questo dato fa ipotizzare la necessità di un contatto cellulare affinché l'effetto delle MSC si realizzi. Tuttavia una certa

riduzione della produzione di citochine linfotrope (in particolare IFN- γ) anche in *transwell*, suggerisce che un ruolo possa essere giocato anche da mediatori solubili.

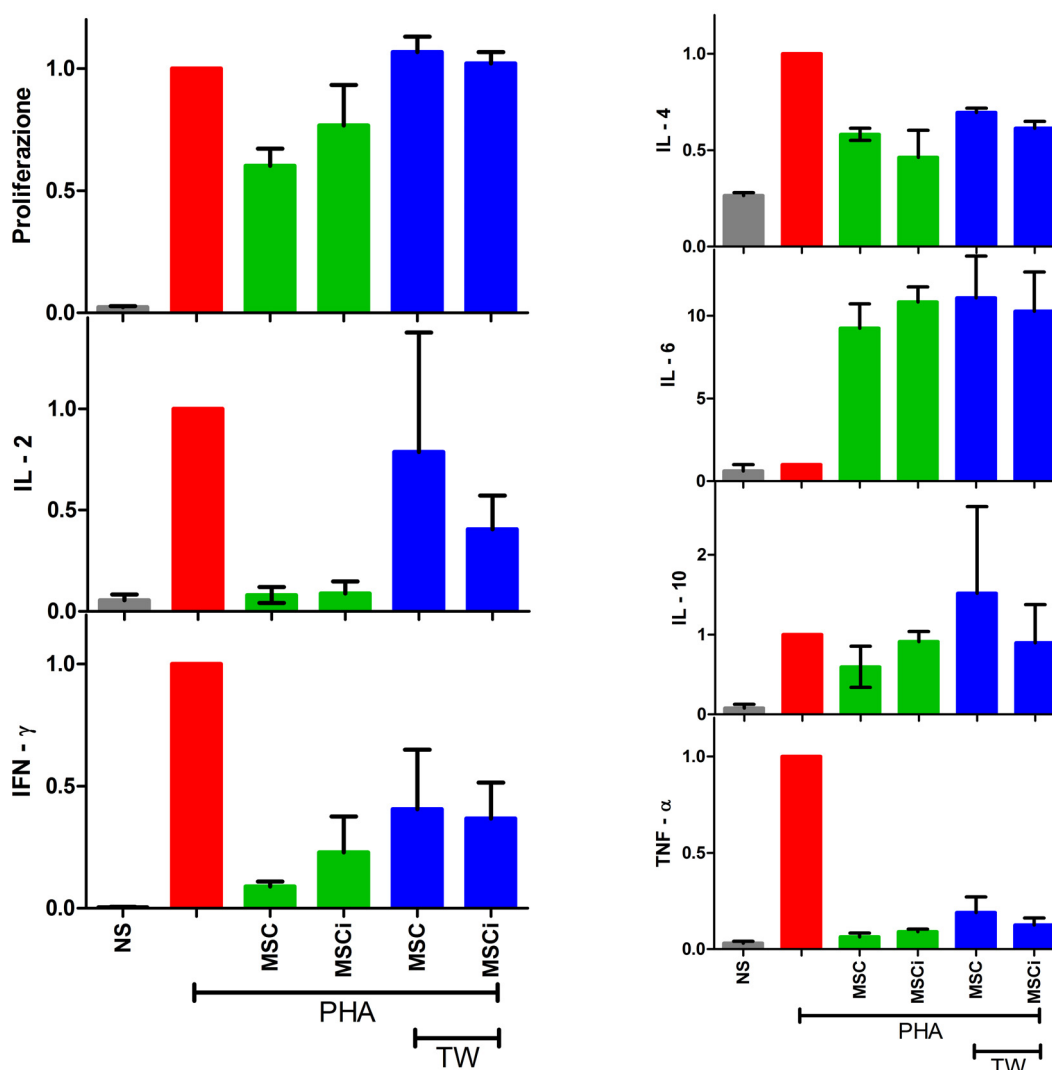


Fig.26 Il grafico rappresenta la media di due esperimenti (esp.1,2 tab.2). In ogni esperimento i dati ottenuti per le cellule stimulate in assenza di MSC sono stati posti per convenzione uguale a 1 (barra rossa) e gli altri risultati sono stati espressi in percentuale rispetto a questo. A sinistra andamento della proliferazione e delle citochine linfotrope, a destra le altre citochine.

6.2.3 Ruolo dell'HLA-G sull'inibizione della proliferazione mediata dalle MSC coltivate con le due condizioni di coltura

Precedenti studi hanno dimostrato un ruolo dell'HLA-G, prodotto dalle MSC, nell'effetto antiproliferativo di queste cellule. Abbiamo perciò analizzato l'effetto di un anticorpo bloccante l'HLA-G nel nostro contesto sperimentale. I risultati mostrano che nessuna delle concentrazioni utilizzate dell'anticorpo anti-HLA-G modifica in modo apprezzabile la soppressione della proliferazione e della produzione di citochine (fig.27).

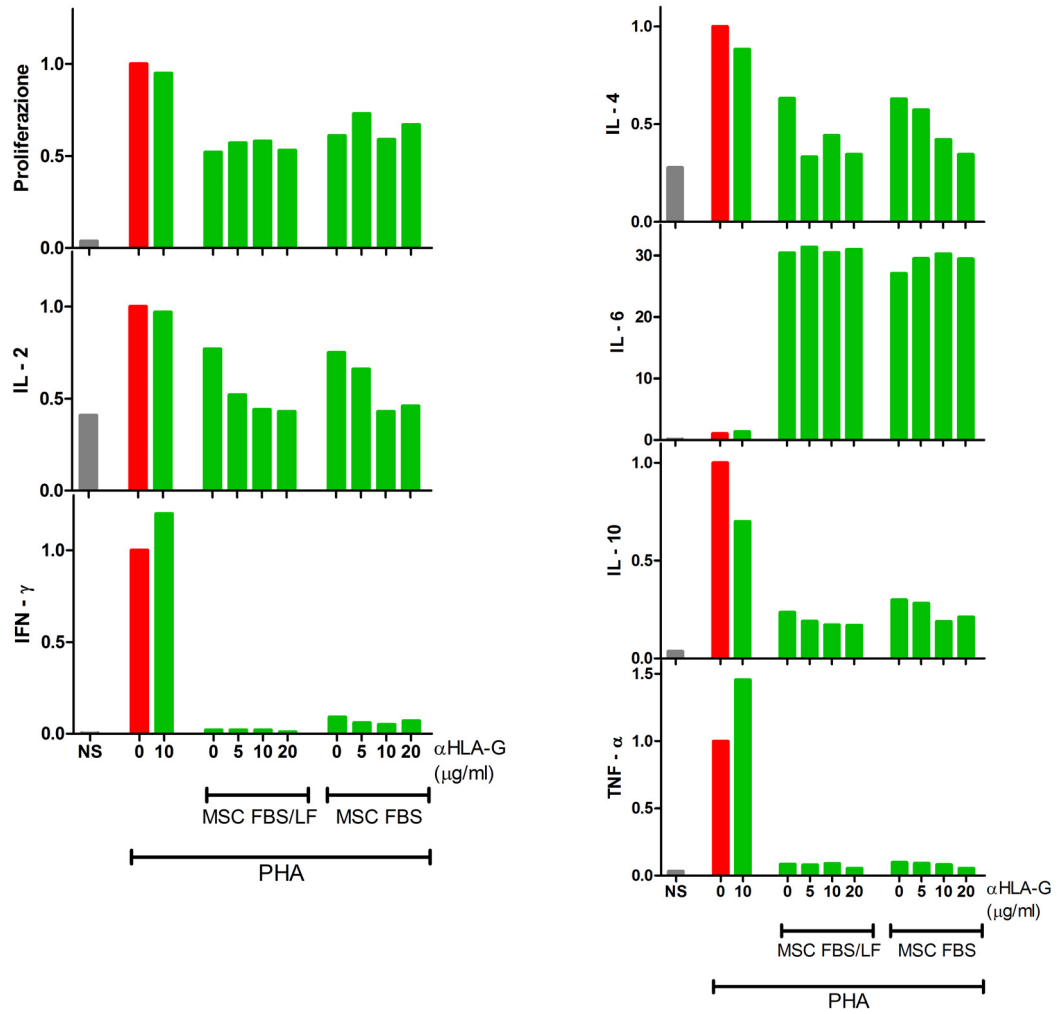


Fig.27 Il grafico rappresenta i risultati dell'esperimento n° 3 (vedi tab.2). I dati ottenuti per le cellule stimulate in assenza di MSC sono stati posti per convenzione uguale a 1 (barra rossa) e gli altri risultati sono stati espressi in percentuale rispetto a questo. A sinistra andamento della proliferazione e delle citochine linfotrope, a destra le altre citochine.

7. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE

Le MSC presentano un grande interesse sia per la medicina rigenerativa che per la loro attività immunomodulatoria. In questo lavoro, ci siamo focalizzati su quest'ultima caratteristica, ed in particolare abbiamo valutato la possibilità di ottenere dal cordone ombelicale umano cellule dotate di caratteristiche immunomodulatorie.

Per quanto riguarda la procedura di isolamento, il sistema più efficiente e riproducibile nelle nostre mani è stato quello basato sulla sezione fisica della gelatina di Wharton in modo da ottenere le cellule aderenti in seguito a migrazione spontanea dal tessuto alla plastica.

Abbiamo dimostrato come in tal modo si possano ottenere grandi quantità di cellule con le caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche tipiche delle MSC. L'analisi citometrica sembra risentire di maggior variabilità rispetto al fenotipo morfologico. E' tuttavia dubbio che questa variabilità rispecchi caratteristiche stabili delle cellule, dato che in successivi passaggi di coltura si possono osservare fluttuazioni nell'espressione di alcuni marcatori, a cui non corrispondono cambiamenti della morfologia cellulare o del comportamento in coltura.

Abbiamo anche valutato se l'aggiunta di liquido follicolare umano potesse condizionare una maggiore stabilità e capacità di crescita delle MSC. In realtà, non si evidenzia alcun cambiamento significativo nelle cellule coltivate con i due tipi di supplemento, se si eccettua un diverso aspetto morfologico, che potrebbe tuttavia essere condizionato più dalle caratteristiche fisiche del fluido (alto contenuto in proteoglicani) che dall'effetto di fattori di crescita. Dato che i campioni coltivati in presenza di liquido follicolare si presentano in generale più difficili da gestire (variabilità nella necessità di trattamento con tripsina, facile formazione di aggregati cellulari), crediamo che questo supplemento non meriti di essere ulteriormente valutato per questo scopo.

Allo scopo di sostituire il siero fetale bovino con altri supplementi di crescita stiamo valutando l'ipotesi di utilizzare il lisato piastrinico umano o il siero di sangue cordonale, che hanno mostrato in recenti lavori buone caratteristiche nel sostegno della crescita delle MSC.

L'attività immunomodulante delle MSC è stata studiata per mezzo di test di proliferazione linfocitaria dopo stimolo con PHA e con anti-CD3 anti-CD28. L'effetto dell'aggiunta delle MSC sulla proliferazione indotta da PHA è risultato evidente. Nel nostro contesto sperimentale le MSC comportano un dimezzamento della proliferazione linfocitaria e non un completo azzeramento come in altri lavori; peraltro questo risultato viene ottenuto con un rapporto di circa 1 a 10 tra MSC e linfociti, almeno 10 volte inferiore a quello utilizzato in altri lavori (dove la proliferazione veniva misurata con timidina triziata e potevano essere

studiati numeri inferiori di linfociti). A sostegno dell'importanza di questo effetto antiproliferativo è anche il dato di un completo azzeramento della produzione di IFN- γ in seguito all'aggiunta di MSC.

Le proliferazioni ottenute con anti-CD3 e anti-CD28 sono risultate troppo basse per evidenziare con certezza un effetto immunosoppressivo delle MSC anche se l'analisi della produzione dell'IFN- γ (dati non mostrati) suggerirebbe l'esistenza di una potente attività immunosoppressoria anche in questo contesto.

La prontezza dell'azione immunosoppressiva e la relativa indipendenza dal tipo di stimolo ha suggerito che l'effetto delle MSC sia più generalmente antiproliferativo e non specificatamente immunosoppressivo. Di fatto è possibile che questa funzione antiproliferativa faccia parte del ruolo fisiologico delle cellule mesenchimali nella nicchia emopoietica allo scopo di mantenere in uno stato di quiescenza i precursori emopoietici.

I meccanismi dell'azione antiproliferativa non sono conosciuti. Recenti studi basati sulle MSC ottenute da midollo osseo hanno suggerito un ruolo fondamentale dell'HLA-G nel mediare l'effetto soppressivo.

I nostri dati dimostrano tuttavia che il contatto cellulare è necessario perché l'azione soppressiva si verifichi completamente e che l'inibizione dell'HLA-G per mezzo di anticorpi bloccanti non modifica né la proliferazione né la produzione di citochine.

Sulla base di questi dati è ipotizzabile che altri fattori, attraverso il contatto cellulare o in seguito ad un contatto cellulare, siano responsabili dell'azione antiproliferativa descritta.

Recenti lavori hanno a questo proposito sottolineato l'importanza di altre molecole come l'indolamine 2,3-diossigenasi e di conseguenza potrebbe essere utile valutare la produzione di queste sostanze anche nel nostro modello.

Prima di far ciò crediamo prioritario però rispondere alla domanda se il contatto cellulare abbia un ruolo permissivo (*licensing*) o effettore nella soppressione. A questo scopo abbiamo programmato di valutare l'azione immunosoppressiva nel modello del *transwell* da parte di MSC precedentemente incubate o meno con linfociti attivati.

La conoscenza di questi meccanismi è particolarmente importante per interpretare il diverso successo della terapia con MSC in diversi pazienti.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol.* 1963;62:327-336.
2. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963;197:452-454.
3. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 1964;24:1544-1551.
4. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968;2:1366-1369.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282:1145-1147.
6. Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature.* 2001;414:88-91.
7. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature.* 2001;414:92-97.
8. Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst.* 1967;38:549-552.
9. Kahan BW, Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst.* 1970;44:1015-1036.
10. Rosenthal MD, Wishnow RM, Sato GH. In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1970;44:1001-1014.
11. Evans MJ. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1972;28:163-176.
12. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154-156.
13. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:7634-7638.
14. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature.* 1992;359:550-551.
15. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* 1992;70:841-847.
16. Vescovi AL, Feroni C, Ferrari D, Galli R, Gritti A. Le cellule staminali neurali e la loro capacità di transdifferenziamento. *Prospettive in pediatria.* 2001;31:329-333.
17. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006;441:1068-1074.
18. Diaz-Flores L, Jr., Madrid JF, Gutierrez R, et al. Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol Histopathol.* 2006;21:995-1027.
19. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature.* 2001;414:98-104.
20. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006;441:1075-1079.
21. Fang TC, Alison MR, Wright NA, Poulson R. Adult stem cell plasticity: will engineered tissues be rejected? *Int J Exp Pathol.* 2004;85:115-124.
22. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393-403.
23. Benirschke K, Kaufmann P. Anatomy and pathology of the umbilical cord. In: Springer, ed. *Pathology of the human placenta.* New York; 2006.

24. Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon* (1918). 1972;99:276-280.
25. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174-1178.
26. Salvaneschi L, Perotti C, Martinetti M, et al. Raccolta e caratterizzazione delle cellule cordonali. *La trasfusione del sangue*. 2000;45:247-252.
27. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2:83-92.
28. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980;56:289-301.
29. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641-650.
30. Pistoia V, Uccelli A, Moretta L. Le cellule staminali mesenchimali: nuove protagoniste nell'immunoregolazione. *Gaslini*. 2008;40:73-78.
31. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008.
32. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131:324-336.
33. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*. 1982;1:87-94.
34. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*. 2007;25:2886-2895.
35. Sadler TW. Second week of development: bilaminar germ disc. In: Wilkins W, ed. *Langmann's Medical Embriology*. Philadelphia; 2004:51-64.
36. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91:1017-1026.
37. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1477-1486.
38. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007;21:1733-1738.
39. Nilsson SK, Haylock DN, Johnston HM, Occhiodoro T, Brown TJ, Simmons PJ. Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgment at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation in vitro. *Blood*. 2003;101:856-862.
40. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3213-3218.
41. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 2002;20:530-541.
42. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994;84:4164-4173.
43. Kuci S, Wessels JT, Buhning HJ, et al. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood*. 2003;101:869-876.
44. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 2002;30:783-791.

45. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7841-7845.
46. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
47. Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44:215-230.
48. Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:235-244.
49. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181:67-73.
50. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003;116:1827-1835.
51. Djouad F, Bony C, Haupl T, et al. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R1304-1315.
52. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22:1330-1337.
53. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21:50-60.
54. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, et al. Isolation and characterization of Oct-4(+)/HLA-G (+) mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol*. 2008.
55. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007;25:319-331.
56. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25:1384-1392.
57. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*. 2006;24:781-792.
58. Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev*. 2006;2:155-162.
59. Xu W, Zhang X, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:623-631.
60. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22:377-384.
61. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
62. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. 2004;77:192-204.
63. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*. 2004;77:174-191.
64. Wu KH, Zhou B, Lu SH, et al. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2007;100:608-616.
65. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006;36:2566-2573.

66. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007;262:509-525.
67. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105:1815-1822.
68. Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* 2005;90:516-525.
69. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:619-648.
70. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:197-223.
71. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107:1484-1490.
72. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008;111:1327-1333.
73. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells.* 2008;26:151-162.
74. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838-3843.
75. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004;103:4619-4621.
76. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003;101:3722-3729.
77. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105:2821-2827.
78. Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation.* 2003;76:1208-1213.
79. Rasmuson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2007;82:887-893.
80. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells.* 2008;26:1275-1287.
81. Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells.* 2008;26:212-222.
82. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107:367-372.
83. Traggiai E, Volpi S, Schena F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells.* 2008;26:562-569.

84. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:386-398.
85. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. 2008;26:2865-2874.
86. Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:328-337.
87. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994;56:283-294.
88. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*. 1989;60:334-339.
89. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000;6:1282-1286.
90. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*. 2001;29:244-255.
91. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106:1755-1761.
92. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2007;61:219-227.
93. Kassem M, Ankersen L, Eriksen EF, Clark BF, Rattan SI. Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporos Int*. 1997;7:514-524.
94. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95:209-214.
95. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001;344:385-386.
96. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8932-8937.
97. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363:1439-1441.
98. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371:1579-1586.
99. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. 2007;28:219-226.
100. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110:2764-2767.
101. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24:115-124.
102. Lund RD, Wang S, Lu B, et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*. 2007;25:602-611.

103. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006;18:1089-1096.