

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SVILUPPO E RIPRODUZIONE UMANA**

**Ciclo XXV**

**Settore Concorsuale di afferenza: 05/H2 - ISTOLOGIA**

**Settore Scientifico disciplinare: BIO/17**

**Caratteristiche biologiche e potenziale applicativo delle cellule  
staminali derivate da membrane fetali**

**Presentata da: Dott.ssa Roberta Costa**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof.ssa Elisabetta Caramelli**

**Prof.ssa Laura Bonsi**

**Esame finale anno 2013**

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
1. Le cellule staminali	
2. Le cellule staminali adulte	
2.1 <i>La plasticità delle cellule staminali adulte</i>	
3. La placenta: embriologia, struttura e funzione	
3.1 <i>Embriologia</i>	
3.2 <i>Struttura della placenta umana a termine</i>	
3.3 <i>Funzione</i>	
4. La placenta come sorgente di cellule staminali	
4.1 <i>Cellule mesenchimali stromali da membrane fetali umane</i>	
4.2 <i>Cellule epiteliali da membrana amniotica</i>	
5. Caratteristiche immunologiche delle cellule derivate da membrane fetali	
6. Potenziale applicativo delle cellule derivate da membrane fetali	
6.1 <i>Applicazioni cliniche delle membrane fetali</i>	
6.2 <i>Studi preclinici per patologie a carico del sistema nervoso</i>	
6.3 <i>Studi preclinici per patologia diabetica</i>	
6.4 <i>Studi preclinici per ischemia cardiaca</i>	
6.5 <i>Studi preclinici per patologie a carico del tessuto epatico</i>	
6.6 <i>Studi preclinici per fibrosi polmonare</i>	
7. Cellule staminali derivate da membrane fetali verso l'applicazione clinica.	
7.1 <i>Aspetti generali</i>	
7.2 <i>Aspetti immunologici</i>	
<b>Scopo del lavoro</b>	<b>33</b>
<b>Capitolo 1 – Caratterizzazione biologica e funzionale delle cellule epiteliali da membrana amniotica in terreno di coltura standard e in terreno privo di siero.</b>	<b>35</b>
1. <u>Materiali e Metodi</u>	35
1.1 Isolamento di cellule epiteliali da membrana amniotica umana (hAECs)	
1.2 Espansione cellulare in terreno con e senza siero	
1.3 Allestimento di colture cellulari tridimensionali <i>in vitro</i>	
1.4 Analisi del potenziale proliferativo	
1.5 Caratterizzazione immunofenotipica	
1.6 Analisi molecolare di espressione dei geni di staminalità	
1.7 Analisi del potenziale differenziativo <i>in vitro</i>	
1.7.1 <i>Differenziamento osteogenico</i>	
1.7.2 <i>Differenziamento pancreatico endocrino</i>	
1.8 Analisi molecolare del differenziamento in senso osteogenico e pancreatico endocrino	
1.9 Valutazione istologica del differenziamento osteogenico	
1.10 Analisi immunofenotipica del differenziamento pancreatico su colture cellulari classiche bidimensionali	
1.11 Analisi in immunofluorescenza del differenziamento pancreatico su colture tridimensionali	
1.12 Analisi delle capacità immunomodulatorie <i>in vitro</i>	
1.12.1 <i>Effetto di hAEC sulla proliferazione di cellule mononucleate attivate – Analisi del ciclo cellulare</i>	
1.12.2 <i>Espressione dell'antigene HLA-G su hAECs in co-coltura con cellule mononucleate attivate</i>	
1.13 Analisi statistica	
2. <u>Risultati</u>	44
2.1 Isolamento di hAEC e analisi della capacità proliferativa	

2.2	Caratterizzazione immunofenotipica	
2.3	Analisi molecolare di espressione marcatori staminalità e proliferazione	
2.4	Analisi del potenziale differenziativo <i>in vitro</i>	
2.4.1	<i>Differenziamento osteogenico</i>	
2.4.2	<i>Differenziamento pancreatico su colture bidimensionali classiche</i>	
2.4.3	<i>Valutazione del differenziamento pancreatico endocrino su colture tridimensionali</i>	
2.5	Analisi delle proprietà immunomodulatorie	
2.5.1	<i>Azione di hAECs sulla proliferazione di PBMCs attivati</i>	
2.5.3	<i>Espressione dell'antigene HLA-G su hAECs in co-coltura con PBMCs attivati.</i>	
3.	<u>Discussione</u>	55
	<b>Capitolo 2 – Cellule stromali da membrane fetali di topo (mFMSC) e fibroblasti embrionali murini (mEF): analisi comparativa delle caratteristiche funzionali e immunomodulatorie <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> in un modello di trapianto allogenico nel sistema nervoso centrale di topi immunocompetenti.</b>	<b>58</b>
1.	<u>Materiali e metodi</u>	58
1.1	Animali	
1.2	Isolamento e allestimento di colture cellulari di mFMSC e mEF.	
1.3	Analisi immunofenotipica	
1.4	Valutazione del potenziale differenziativo	
1.5	Esperimenti di co-coltura di mFMSC o mEF con cellule microgliali	
1.6	Esperimenti di trapianto cellulare a livello del sistema nervoso centrale	
1.7	Analisi istologica – immunofluorescenza	
1.8	Analisi istologica – quantificazione	
1.9	Analisi statistica	
2.	<u>Risultati</u>	63
2.1	Isolamento e caratterizzazione immunofenotipica di mFMSC e mEF	
2.2	Caratterizzazione funzionale di mFMSC e mEF	
2.3	Analisi dell'effetto immunomodulatorio di mFMSC e mEF <i>in vitro</i>	
2.4	Analisi quantitativa di sopravvivenza cellulare dopo trapianto a livello del sistema nervoso centrale (CNS).	
2.5	Analisi quantitativa della risposta delle cellule gliali al trapianto di mFMSC e mEF	
2.6	Analisi quantitativa dei livelli di neo-angiogenesi nei trapianti di mFMSC e mEF	
2.7	Analisi dell'effetto pro-angiogenico <i>in vitro</i>	
3.	<u>Discussione</u>	73
	<b>Bibliografia</b>	<b>77</b>

# Introduzione

## 1. Le cellule staminali

Le cellule staminali rappresentano una prospettiva interessante e promettente come candidate per approcci di terapia cellulare e medicina rigenerativa, che fondano le loro basi sulla possibilità di utilizzare cellule vitali al fine di riparare, sostituire e riportare ad una normale funzione fisiologica tessuti ed organi danneggiati o con funzionalità alterata. L'interesse nei confronti delle cellule staminali deriva dall'insieme di alcune caratteristiche ben precise, che vengono utilizzate per definire una cellula staminale in quanto tale.

Per definire una cellula come staminale vengono infatti utilizzati quattro criteri (Anderson et al, 2001): il primo riguarda la capacità di andare incontro a molteplici e sequenziali divisioni cellulari di auto-mantenimento (*self-renewal*). Il secondo criterio riguarda la capacità di generare una progenie cellulare con le stesse caratteristiche della cellula madre. La capacità di queste cellule di proliferare teoricamente in modo illimitato, e senza presentare alterazioni del patrimonio genetico, ha attirato l'attenzione della comunità scientifica. Una volta identificati e chiariti i meccanismi che sottintendono al differenziamento e alla proliferazione cellulare si potrebbe infatti arrivare alla ricostruzione di tessuti ed organi partendo da poche cellule staminali. Come terzo criterio si valuta il potenziale differenziativo, per cui una cellula staminale deve essere in grado di differenziare in almeno un tipo cellulare diverso rispetto a quello cui dovrebbe andare incontro in relazione alla sua derivazione originale. A riguardo, se già da tempo è nota la capacità delle cellule staminali emopoietiche (HSC) di dare origine a tutte le cellule ematiche, più recente è la scoperta della capacità delle cellule staminali nervose (NSC) di differenziare in neuroni, astrociti ed oligodendrociti (Gage 2000), di cellule miosatelliti che rigenerano il muscolo scheletrico, condroblasti del pericondrio che possono ricostituire la cartilagine, cellule ovali del fegato, cellule staminali preduttali del pancreas, cellule staminali basali del tessuto epiteliale e cellule staminali della cornea. Ad oggi continuano numerosi studi sulle cellule staminali mesenchimali (MSC), scoperte nello stroma del midollo osseo, che mostrano la capacità di differenziare in fibroblasti, osteoblasti, condroblasti, adipociti (Haynesworth et al, 1992) ed in diversi altri commissionamenti (muscolo scheletrico, endotelio, cellule del miocardio). Infine, come quarto ed ultimo criterio di staminalità si considera la capacità delle cellule staminali di ripopolare un tessuto di origine danneggiato; quando vengono trapiantate in seguito ad un danno tissutale rispondono a segnali e fattori prodotti dal tessuto lesionato e giungono al sito di danno prendendo parte alla ricostruzione del tessuto originario. Questo comportamento è già stato ampiamente dimostrato per le HSC e più

di recente anche per i progenitori di cellule epatiche (Overturf et al, 1997) e per le NSC (Svendsen et al, 1999; Uchida et al, 2000).

L'insieme di questi criteri permette quindi di attuare una classificazione delle cellule staminali, prendendone in considerazione l'origine e le capacità differenziative. Innanzitutto la cellula staminale per eccellenza è costituita dallo zigote, unica cellula realmente totipotente in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari specializzati presenti in un individuo adulto. Anche le cellule staminali embrionali (ESC) rispondono ai criteri di staminalità citati in precedenza (Martin et al 1981; Thomson et al, 1998). Esse vengono isolate dalla massa interna della blastocisti e sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari adulti e per questo vengono definite pluripotenti. Le caratteristiche differenziative ad ampio spettro sono accompagnate da un'alta capacità proliferativa, ma le ESC presentano anche rischi legati principalmente all'alta immunogenicità, scatenata in seguito a trapianto allogenico, e alla capacità di proliferare *in vivo* portando alla formazione di teratomi. Inoltre la specifica derivazione delle cellule staminali embrionali, che comporta la distruzione dell'embrione umano, solleva ovvi problemi di carattere etico, che ne hanno limitato e ne limitano tuttora l'utilizzo.

I problemi etici e i limiti tecnici legati all'utilizzo delle ESC hanno spinto la comunità scientifica ad ampliare gli studi sulle biologia delle cellule staminali, arrivando alla creazione delle *induced Pluripotent Stem Cell* (iPSC), ovvero cellule somatiche riprogrammate in senso staminale. Le iPSC sono state ottenute per la prima volta dal lavoro di due ricercatori giapponesi, Takahashi e Yamanaka, i quali hanno riprogrammato fibroblasti di topo in cellule pluripotenti usando un virus contenente i geni codificanti per quattro specifici fattori di trascrizione: Oct 4, Klf4, Sox2 e cMyc (Takahashi and Yamanaka, 2006). Da questi primi esperimenti si è poi passati all'utilizzo di cellule di partenza derivate da tessuto adiposo per finire ai linfociti T circolanti, mostrando l'allettante prospettiva di poter ottenere cellule pluripotenti paziente-specifiche con un semplice prelievo di sangue. Tali cellule per quanto molto simili alle staminali embrionali non possono essere però considerate identiche ad esse, e restano dei limiti nell'utilizzo *in vivo* delle iPSC legati soprattutto alle scarse conoscenze sulla stabilità a lungo termine e sulla sicurezza dell'uso di iPSC in approcci di terapia cellulare.

Infine le cellule staminali adulte, identificate e derivate ormai da tutti i tessuti dell'organismo umano, presentano un potenziale proliferativo e differenziativo più ristretto rispetto a ESC e iPSC, ma proprio per questo vengono considerate più sicure (Diaz-Prado et al, 2011). Le cellule staminali adulte (ASC) sono infatti considerate multipotenti, ovvero in grado di dare origine, sotto l'azione di opportuni stimoli, ad alcuni tra tutti i *lineages* cellulari (Wagers et al, 2004). Tra le cellule staminali adulte hanno attirato particolare interesse le cellule staminali mesenchimali (MSC), identificate per

la prima volta nel midollo osseo. Queste cellule sono infatti considerate multipotenti in quanto presentano la capacità di differenziare verso vari *lineages* cellulari e inoltre sono state studiate per le loro caratteristiche di immunomodulazione, che le rendono particolarmente attraenti nell'ottica di approcci di terapia cellulare. Le caratteristiche di modulazione sul sistema immunitario sono state analizzate e valutate come possibile soluzione per fenomeni di *graft versus host* in seguito a trapianto d'organo (Le Blank et al, 2005; Le Blank, 2006). Le MSC derivate da midollo inoltre hanno mostrato l'assenza di tumorigenicità e una buona versatilità nell'utilizzo in casi di trapianto, ma presentano anch'esse alcuni limiti legati principalmente alla procedura di recupero del tessuto di partenza. Queste cellule vengono isolate principalmente da sangue midollare, il cui recupero è ottenuto tramite una metodica invasiva e dolorosa per il donatore e che porta ad una resa esigua in termini di numero di cellule ottenute, che devono quindi essere espanse con fasi di coltura *in vitro* per poter ottenere un numero di cellule utile per pensare ad applicazioni cliniche. Inoltre vi è un calo fisiologico nel numero di MSC presenti nel midollo che va in parallelo con l'età del donatore e che riduce ulteriormente la resa all'isolamento (Ilancheran et al, 2009).

## **2. Le cellule staminali adulte**

L'insieme di queste considerazioni spinge quindi a cercare ed identificare nuove sorgenti di cellule staminali che siano sicure, facilmente accessibili e in grado di fornire un numero di cellule sufficiente per successive applicazioni cliniche e in assenza di vincoli etici.

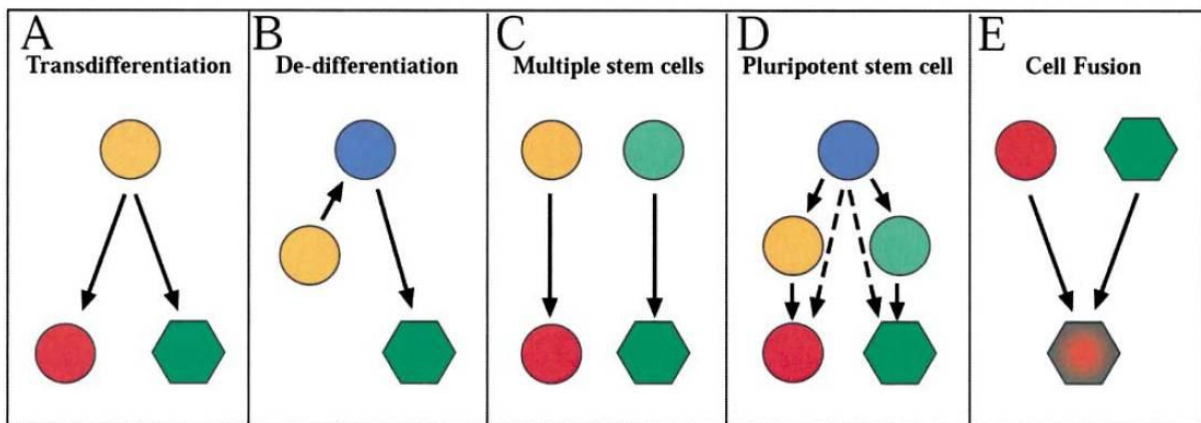
La ricerca di nuove sorgenti di cellule staminali ha mantenuto l'attenzione sulle cellule staminali adulte, che sono state identificate nella maggior parte dei tessuti adulti e non sono in quelli storicamente ritenuti ad alto *turn over* cellulare (sangue ed epidermide), ma anche in quei tessuti considerati perenni (tessuto nervoso centrale e miocardio) (Wagers et al, 2004). Le cellule staminali adulte (ASCs) sono cellule multipotenti, la cui funzione principale è costituita dal mantenimento dell'omeostasi tissutale, provvedendo al normale riciclo cellulare e al riparo di eventuali danni. Generalmente questa popolazione di cellule staminali è localizzata a livello di nicchie di staminalità, ovvero zone anatomiche specifiche di ogni tessuto in grado di mantenere lo stato indifferenziato e la staminalità di queste cellule. Di fondamentale importanza per questo sarà la presenza all'interno della nicchia di elementi in grado di mantenere il potenziale staminale, sia tramite il contatto cellula-cellula e cellula-matrice sia tramite l'azione di fattori diffusibili. Altrettanto importante è l'esclusione di stimoli proliferativi e differenziativi che devono poter raggiungere le cellule staminali solo in caso di danno tissutale o altre necessità fisiologiche. Nel mantenimento della staminalità un ruolo importante è costituito dalla regolazione dell'espressione genica di alcuni fattori di trascrizione specifici. E' noto ormai che vi siano alcuni geni che

codificano per fattori di trascrizione con azione fondamentale nel mantenere la staminalità, quindi la capacità di auto-mantenimento e differenziamento delle cellule staminali. Tra questi fattori: Oct 4, Nanog e Sox 2. OCT 4 (*Octamer protein binding*) è un fattore di trascrizione espresso esclusivamente a livello dei blastomeri e delle cellule pluripotenti negli stadi precoci dell'embrione. Durante lo sviluppo embrionale l'espressione di Oct4 si osserva a livello dell'epiblasto, solo fino a che si mantiene uno stato indifferenziato, mentre l'espressione risulta down regolata nelle fasi di differenziamento e sviluppo dell'embrione. Nell'adulto Oct4 si trova espresso solo nelle cellule germinali e in caso di carcinoma embrionale. Oct4 è un fattore di trascrizione che attiva e blocca la trascrizione di altri geni target interagendo con altri importanti fattori di trascrizione, uno su tutti SOX2. Quindi Oct4 è considerato indispensabile per il mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule embrionali e nelle prime fasi di sviluppo embrionale (Rizzino, 2009). SOX 2 (*SRY-related box protein*) fa parte di una famiglia di fattori di trascrizione composta da circa 20 membri ed è stato estremamente studiato negli ultimi anni. Anche Sox 2, come Oct4, si è dimostrato indispensabile per le prime fasi di sviluppo embrionale e l'inattivazione di uno solo di questi due geni è letale per l'embrione. Oct 4 e SOX2 inoltre cooperano per l'attivazione dell'espressione di altri geni tra cui Nanog (Rizzino, 2009). NANOG (*homeobox protein Nanog*) è una proteina di 305 aminoacidi dotata di un omeodominio conservato e localizzata nelle cellule a livello nucleare. Il grande interesse nei confronti di Nanog è dettato dalla sua azione nel mantenere la pluripotenza delle cellule indifferenziate. Ad esempio un aumento nell'espressione di Nanog può annullare la necessità di utilizzare il fattore inibente la leucemia (LIF) per mantenere la pluripotenza in colture di cellule staminali embrionali di topo, mentre la sua assenza determina un differenziamento spontaneo e in assenza di altri fattori (He et al, 2009). La rete costituita da questi tre fattori di trascrizione necessita una fine regolazione, in senso positivo o negativo, visto che una loro ipo o iper-espressione potrebbe alterare le caratteristiche di staminalità e pluripotenza delle cellule staminali. L'espressione di questi fattori risulta fondamentale per la definizione di staminalità e la caratterizzazione anche delle popolazioni staminali ritrovate nei tessuti adulti, in quanto la loro espressione è una caratteristica imprescindibile per poter definire una cellula staminale, anche nel caso delle ASCs.

### **2.1 La plasticità delle cellule staminali adulte**

Il tema della plasticità delle cellule staminali adulte è oggetto di ampio dibattito nella comunità scientifica. Con il termine plasticità si intende la capacità delle cellule staminali di differenziare verso *lineages* lontani o comunque diversi da quello di origine e ha portato a considerare troppo rigidi i principi classici di tessuto-specificità e di commissionamento cellulare. Nonostante i

numerosi studi *in vivo* che suggeriscono che la plasticità sia una caratteristica delle cellule staminali adulte, non si è ancora giunti ad una definizione univoca dei meccanismi alla base di questo fenomeno. Wagers e colleghi hanno definito la plasticità come la capacità delle cellule staminali adulte, teoricamente commissionate verso uno specifico *lineage* cellulare, di differenziare verso cellule di un tessuto di origine differente, se sottoposte all'azione di un particolare microambiente. Questo fenomeno come risultato dovrebbe dare in primo luogo la comparsa di differenti tipi cellulari ottenuti da una singola cellula di origine, in seconda battuta dovrebbe portare a cellule differenziate con caratteristiche morfologiche e funzionali *in vitro* e *in vivo* tipiche del tessuto finale e infine ottenere cellule in grado di persistere sia in presenza che in assenza di danno tissutale.



**Fig. 1.** Possibili meccanismi proposti per il fenomeno di plasticità delle cellule staminali adulte (Wagers et al, 2004)

I meccanismi proposti come possibile spiegazione per questo fenomeno sono sostanzialmente cinque (Fig.1) : A) il trans differenziamento, che consiste nella capacità di una cellula staminale adulta di dare origine a cellule del suo naturale commissionamento e a popolazioni cellulari di *lineages* differenti. B) Il de-differenziamento, che si verifica quando una cellula già commissionata torna a uno stadio più primitivo e re-differenzia poi lungo un nuovo *lineage*. C) La persistenza, nella stessa nicchia, di cellule staminali di differenti origini. Questa ipotesi rende fondamentale dunque un'accurata caratterizzazione iniziale delle cellule staminali adulte per dimostrare l'esistenza di un vero fenomeno di plasticità, escludendo l'ipotesi di una contaminazione di cellule staminali di diverse origini. D) La possibilità di avere, all'interno delle nicchie di staminalità, specifiche popolazioni di cellule staminali pluripotenti, capaci per definizione di dare fenomeni di plasticità. E) La fusione cellulare che molti autori negli ultimi anni hanno proposto come processo fisiologico per il ringiovanimento e la riparazione di una grande varietà di tessuti (Wagers et al,



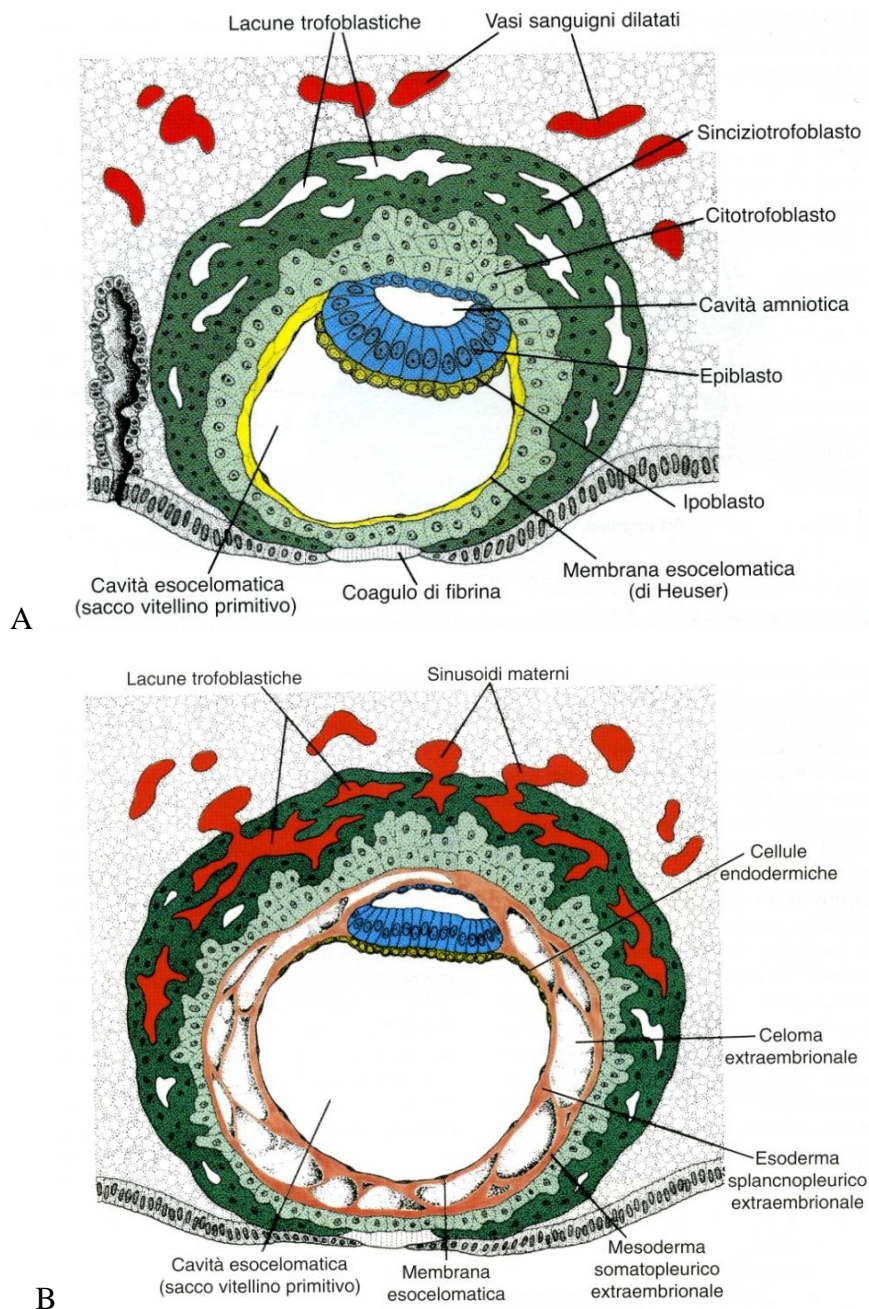
2004). Perché una cellula cambi il suo destino, essa deve comunque rispondere a fattori di crescita e segnali specifici, in grado di determinare quali geni debbano essere attivati e quali no, e anche questi fattori contribuiscono ad influenzare il *pattern* di espressione genica di una cellula staminale e quindi anche il suo potenziale in termini di plasticità (Blau et al, 2001).

### **3. La placenta: embriologia, struttura e funzione**

#### **3.1 Embriologia**

A 6-7 giorni dalla fecondazione si assiste all'impianto della blastocisti nella parete uterina e la placenta inizia a svilupparsi. In questa fase la blastocisti è costituita da una parete epiteliale esterna, composta dal trofoblasto, che circonda e racchiude la cavità della blastocisti. All'interno di questa cavità, concentrate ad un polo della cavità stessa, si trova un gruppo di cellule che costituisce la massa cellulare interna. L'embrione, il cordone ombelicale e l'epitelio della membrana amniotica derivano dalla massa cellulare interna. La blastocisti in questa fase di impianto, aderisce all'endometrio materno e le cellule del trofoblasto iniziano ad erodere la decidua materna facilitando così l'impianto della blastocisti. All'8°-9° giorno le cellule del trofoblasto nella regione di impianto proliferano portando a formare un strato bi laminare del trofoblasto: lo strato esterno costituisce il sinciziotrofoblasto, mentre quello interno costituisce il citotrofoblasto. In questa fase anche le cellule della massa cellulare interna si differenziano in due strati: l'epiblasto, uno strato di cellule cilindriche adiacente a quella che diventerà la cavità amniotica, e l'ipoblasto, uno strato di cellule piccole e cubiche adiacenti alla cavità della blastocisti. Questi due strati cellulari insieme formano il disco embrionale. In seguito, alcune cellule dall'epiblasto migrano e vanno a localizzarsi tra il citotrofoblasto e il sottostante disco embrionale, creando un piccolo spazio che successivamente diventerà la cavità amniotica. Le cellule derivate dall'epiblasto, che vanno a circondare la futura cavità amniotica, vengono chiamati amnioblasti e daranno origine all'epitelio amniotico. Nel frattempo alcune cellule dell'ipoblasto migrano lungo la parete della cavità della blastocisti dando luogo alla membrana esocelomatica che racchiude il sacco vitellino primario. Cellule della membrana esocelomatica e dell'adiacente citotrofoblasto formano poi il reticolo extraembrionale, lungo il quale migrano cellule derivate dall'ipoblasto che formeranno un tessuto connettivo detto mesoderma extraembrionale. Quest'ultimo circonda quindi il sacco vitellino e la cavità amniotica e successivamente costituirà il mesoderma amniotico e corionico (Fig.2). Siamo a 11-12 giorni dalla fecondazione quindi prima della gastrulazione, che avviene durante la terza settimana di gestazione, e che porta alla formazione, a partire dal disco embrionale, dei tre foglietti

embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma) da cui derivano tutti gli organi e tessuti dell'embrione (Parolini et al, 2008; Evangelista et al, 2008, Sadler 2013).

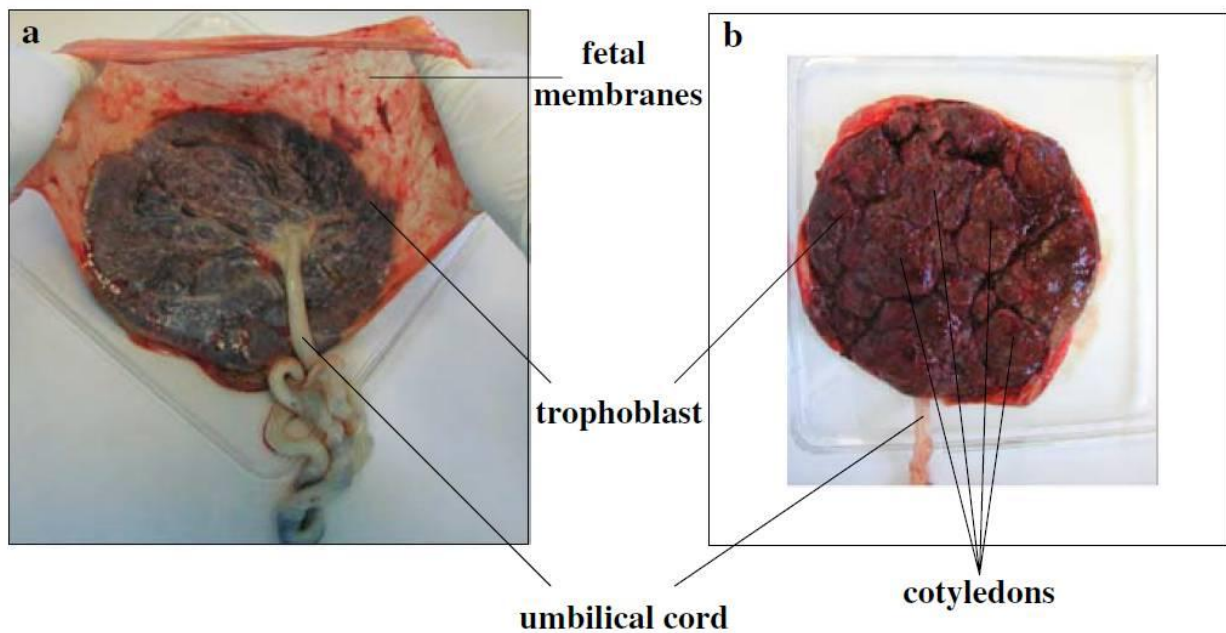


**Fig. 2.** A. Blastocisti umana al 9° giorno. Il disco embrionale è costituito da epiblasto e ipoblasto. B. Blastocisti al 12° giorno. Il mesoderma extraembrionale prolifera e riempie lo spazio tra membrana esacelomatica e trofoblasto, circondando sacco vitellino e cavità amniotica (Sadler, 2013).

### 3.2 Struttura della placenta umana a termine

Ad un'analisi macroscopica (Fig. 3) la placenta viene descritta come un organo di aspetto discoidale con diametro di 15-20 cm e spessore di 2-3 cm. Essa è composta da un disco corionico, da cui si dipartono i villi coriali, che prende contatto diretto con la parete uterina durante la gravidanza e alle

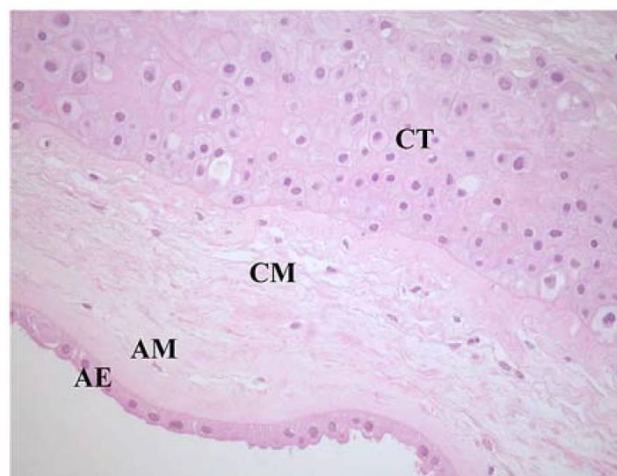
cui estremità si estendono le membrane fetali: amniotica e coriale, che coprono una superficie di circa 700-1200 cm<sup>2</sup>.



**Fig. 3.** Placenta umana a termine. a. Placenta vista dal lato fetale; si possono distinguere le membrane fetali, che continuano dalle estremità del disco coriale e il cordone ombelicale. b. Placenta vista dal lato materno; si possono osservare i cotiledoni che raccolgono al loro interno i villi coriali, dove avvengono gli scambi tra madre e feto (Evangelista et al, 2008).

Il disco corionico si affaccia direttamente sulla cavità amniotica ed è costituito da diverse strutture. Dal lato materno del disco si estendono i villi coriali, che ancorano la placenta all'endometrio materno attraverso le cellule del trofoblasto e presentano diverse funzioni fondamentali per lo scambio di nutrienti e gas tra madre e feto. I villi della placenta a termine sono costituiti da vasi capillari e da un sottile strato mesenchimale mentre una membrana basale separa questo nucleo stromale da uno strato ininterrotto di cellule di sinciziotrofoblasto; tra il sinciziotrofoblasto e la membrana basale si trovano invece cellule del citotrofoblasto (Evangelista et al, 2008). Verso il lato fetale il disco corionico presenta corion e membrana amniotica; il corion è composto di una regione esterna ai villi con cellule di trofoblasto e di uno strato mesenchimale, mentre la membrana amniotica, è costituita da uno strato di mesoderma amniotico e uno strato di epitelio. Sempre dal lato fetale del disco coriale si diparte il cordone ombelicale che contiene al suo interno i vasi fetali, due arterie e una vena che trasportano sangue da e verso il feto durante tutta la gravidanza. La superficie delle membrane fetali si estende dalle estremità del disco corionico per andare a creare la cavità amniotica all'interno della quale si sviluppa il feto (Parolini et al, 2008).

Tra le due membrane fetali la membrana amniotica è quella più esterna, ovvero affacciata dal lato fetale e a diretto contatto con il liquido amniotico. La membrana amniotica, o amnion, è una membrana sottile, semitrasparente e avascolarizzata, che non solo delimita la cavità amniotica, ma ricopre tutto il disco corionico continuando lungo tutto il codone ombelicale e la pelle del feto. Essa è costituita da uno strato epiteliale esterno, a contatto con il liquido amniotico e costituito da un monostrato di cellule epiteliali appoggiate su una lamina basale, al di sotto della quale si trova uno strato di tessuto connettivo. Quest'ultimo strato rappresenta la componente mesenchimale della membrana amniotica, è composto prevalentemente da una matrice di fibronectina e collagene (tipo I e III) all'interno della quale si trovano cellule mesenchimali di morfologia fibroblastoide e una seconda popolazione di cellule con caratteristiche monocito-macrofagiche (Magatti et al, 2008). Al di sotto della componente mesenchimale della membrana amniotica si trova il corion liscio (distinto dal corion frondoso caratterizzato dalla presenza dei villi coriali). Il corion liscio, o membrana coriale, è costituito da uno strato di mesoderma, simile in composizione a quello presente nella membrana amniotica, e da un sottostante strato di trofoblasto (Evangelista et al, 2008; Parolini et al, 2008). In Figura 4 un'immagine istologica delle due membrane fetali.



**Fig. 4.** Colorazione istologica di membrane fetali da placenta a termine (Ematossilina-Eosina). AE: epitelio amniotico; AM: strato mesenchimale amniotico; CM: strato mesenchimale amniotico; CT: strato di trofoblasto corionico (Evangelista et al, 2008).

### **3.3 Funzione**

La placenta è un organo deciduo e di fondamentale importanza per lo sviluppo del feto, in quanto permette una serie di funzioni basilari per la sopravvivenza e lo sviluppo del feto durante tutta la gravidanza. Primi tra tutti la sintesi di metaboliti e gli scambi di nutrienti e gas tra madre e feto, ma anche attività endocrina di secrezione ormonale e un'azione protettiva. Il trasporto placentare è

favorito dall'ampia superficie di scambio offerta della placenta che aumenta di dimensioni in relazione alla crescita del feto. Lo scambio di ossigeno e CO<sub>2</sub> tra sangue materno e fetale avviene per diffusione passiva mentre la diversa la pressione osmotica nei vasi garantisce passaggio di acqua e un meccanismo di trasporto attivo garantisce apporto di sali minerali, sostanze nutritive quali zuccheri, aminoacidi e lipidi (Gude et al, 2004; Bauman et al, 2002; Cariappa et al, 2003; Haggarty 2002). Il metabolismo placentare è un aspetto di fondamentale importanza già dai primi stadi di gestazione, poiché l'embrione necessita da subito di un forte apporto energetico ed è totalmente dipendente dalla circolazione materna per il suo sviluppo.

La placenta però rappresenta anche una protezione per il feto, in quanto costituisce una barriera ematochimica, bloccando il passaggio al feto di alcune sostanze potenzialmente tossiche o dannose, anche se restano molti medicinali in grado di attraversare la placenta senza difficoltà determinando danni all'embrione (Marin et al, 2003). La placenta è considerata una barriera protettiva nei confronti del feto in quanto permette anche il passaggio di anticorpi materni che forniscono un'immunità passiva al feto che non ha un sistema immunitario maturo e perfettamente funzionante. La placenta costituisce quindi un filtro verso parassiti del sangue, ma non è altrettanto efficace per patogeni come virus e batteri, alcuni dei quali sono in grado di attraversare la placenta e infettare il feto. L'attività endocrina della placenta comprende la secrezione di ormoni fondamentali per il mantenimento della gravidanza e per riprogrammare la fisiologia della madre durante tutta la gestazione (Gude et al, 2004).

Un'altra funzione fondamentale è rappresentata dalla sorveglianza immunitaria che la placenta mette in atto proteggendo l'embrione dall'attacco del sistema immunitario della madre. Le cellule fetali durante la gravidanza potrebbero essere considerate come semi-allogene, poiché esprimono geni paterni, ma nonostante questo non viene attaccato dal sistema immunitario della madre (Moffett and Loke, 2004). Questa situazione di tolleranza materno/fetale si basa su una serie di meccanismi diversi. Tra questi meccanismi un posto di rilievo spetta sicuramente alla configurazione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità classe I (HLA classe I) espresse dal citotrofoblasto. Le molecole HLA-G presenti sulle cellule extravilluose del citotrofoblasto hanno un ruolo nella resistenza di queste cellule alla lisi mediata dalle cellule *natural killer* presenti nell'utero materno, inibendone attività litica e la migrazione verso la placenta. Anche i linfociti T presenti nella decidua materna, pur essendo a contatto con il trofoblasto non riescono a riconoscere come estranee le cellule trofoblastiche che mancano di HLA-A e-B e quindi non lo attaccano.

#### **4. La placenta come sorgente di cellule staminali**

Nel tentativo di trovare una sorgente di cellule staminali adulte in grado di superare i limiti legati all'utilizzo delle ESCs o delle MSCs da midollo osseo, vari gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione sulla placenta umana come possibile fonte di cellule staminali. Il fatto che i tessuti placentari derivino da uno stadio di sviluppo embrionale precoce va a sostegno dell'ipotesi che essa possa contenere cellule che hanno mantenuto la plasticità tipica delle cellule embrionali da cui derivano (Evangelista et al, 2008). Inoltre placenta ed annessi embrionali sono considerati tessuti giovani, in confronto al resto dei tessuti adulti che accompagnano l'organismo per tutta la durata della vita, e per questo le cellule staminali derivate da essi potrebbero essere caratterizzate da un ridotto rischio di avere danni al DNA. In ultimo, ma non per questo meno importante, la placenta ha un ruolo fondamentale nel mantenere uno stato di tolleranza materno-fetale durante la gravidanza, evitando che il sistema immunitario della madre reagisca al feto allogenico. Questa caratteristica suggerisce che le cellule derivate da placenta possano mantenere esse stesse un comportamento di tipo immunomodulatorio, che le renda in grado di controllare e inibire l'attivazione del sistema immunitario e ne faccia quindi uno strumento ideale per applicazioni terapeutiche basate sull'utilizzo di cellule staminali.

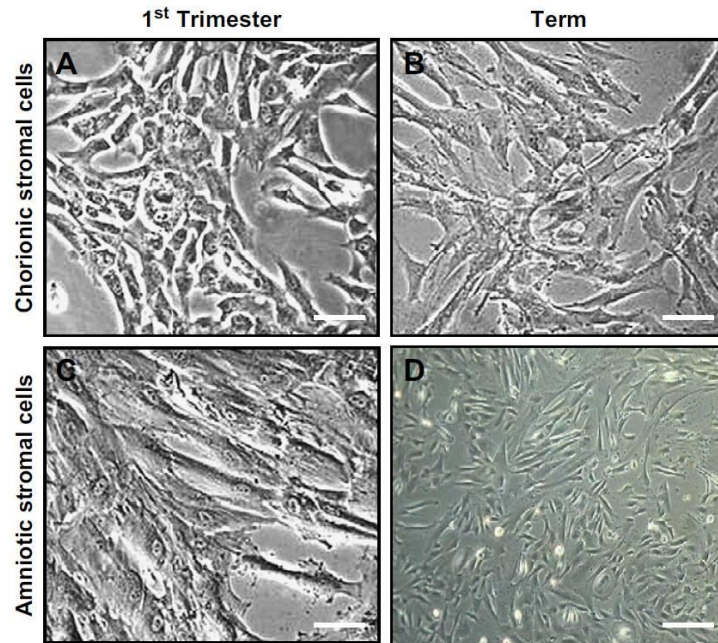
Numerosi studi hanno indagato la presenza di cellule staminali e progenitori nelle varie parti che compongono la placenta (Matikainen and Laine, 2005) e hanno portato ad isolare queste cellule dalla placenta *in toto*, dalla porzione fetale e da quella materna della placenta, e da tutte le componenti delle membrane fetali (Yen et al, 2005; In't Anker et al, 2004). Le cellule staminali identificate dalla placenta includono: cellule mesenchimali (Fukuchi 2004), ematopoietiche (Amos and Gordon, 1995), trofoblastiche e cellule staminali multi/pluripotenti (Tamagawa et al, 2004; Miki et al, 2005). Miki e colleghi hanno dimostrato la possibilità di isolare cellule con caratteristiche di ESCs dalla membrana amniotica, senza però inizialmente identificare l'esatta localizzazione di queste cellule all'interno della membrana amniotica o all'interno degli altri tessuti placentari (Miki et al, 2005). In uno studio successivo hanno quindi approfondito le loro ricerche per determinare dove queste cellule, positive per i marcatori di staminalità, fossero localizzate esattamente all'interno della placenta. I loro lavori hanno indicato che le cellule positive per marcatori di superficie specifici per le cellule staminali (TRA 1-61, TRA 1-81) sono localizzate su tutta la porzione epiteliale della membrana amniotica. Inoltre risultano disperse, con una distribuzione casuale, su tutta la superficie della membrana e non in una nicchia specifica di staminalità e nemmeno organizzate spazialmente da una serie di segnali regolatori esterni. Nello stesso studio è stata analizzata anche la positività a SSEA 4, marcatore tipico delle ESCs, che risulta debolmente espresso nelle cellule dell'epitelio della membrana amniotica e negativo per la porzione

mesenchimale. L'insieme dei dati raccolti ha portato a concludere che l'epitelio della membrana amniotica contenga cellule staminali pluripotenti a diversi stadi differenziativi e ha spinto i ricercatori ad articolare un'ipotesi sul perché cellule residenti nella membrana amniotica mantengano caratteristiche di cellule pluripotenti. La derivazione diretta della porzione epiteliale della membrana amniotica dall'epiblasto e la sua localizzazione spazialmente separata dal centro dell'organogenesi potrebbe infatti far sì che essa non riceva tutti i fattori di crescita e i segnali che normalmente dirigono il differenziamento cellulare, permettendo quindi alle cellule ivi residenti di sfuggire a questa influenza differenziativa e di mantenere caratteristiche che le avvicinano alle cellule staminali pluripotenti (Miki et al, 2007).

#### **4.1 Cellule mesenchimali stromali da membrane fetali umane**

Le cellule mesenchimali stromali da membrana amniotica (hAM-MSCs) e corion (hCOR-MSCs) derivano dal mesoderma extraembrionale e possono essere isolate da membrane al primo, secondo o terzo trimestre, ma la maggior parte degli studi si riferiscono a MSCs isolate da placenta a termine (Moore and Persaud 1998, Evangelista et al, 2008). Entrambe le popolazioni di cellule mesenchimali stromali vengono isolate grazie a trattamento enzimatico delle membrane fetali (con collagenasi e DNAsi), dopo che queste ultime vengono separate manualmente per semplice trazione meccanica e dopo che lo strato epiteliale delle membrane amniotica e quello trofoblastico del corion vengono rimossi grazie a un trattamento rispettivamente in tripsina e dispasi (In 't Anker et al, 2004; Soncini et al, 2007). Diversi studi effettuati per valutare la resa cellulare, ovvero il numero di MSCs che è possibile isolare da membrane fetali, dimostrano che si possono ottenere  $40 \times 10^6$  hAM-MSCs da un'intera membrana amniotica (resa di  $4 \times 10^6$  hAM-MSCs/100 cm<sup>2</sup>, considerando una superficie media totale per membrana di circa 1000 cm<sup>2</sup>) e circa il doppio per il corion (Bilic et al, 2008; Alviano et al, 2007; Parolini et al, 2008). Sia hAM- che hCOR-MSCs aderiscono e proliferano facilmente su plastica per colture cellulari, e possono essere espanse fino ad arrivare al 5°-10° passaggio in coltura, con una capacità proliferativa per le hAM-MSCs leggermente inferiore rispetto alla controparte isolata dal corion. A livello morfologico sia hAM che hCOR MSCs mostrano un aspetto *fibroblast like* (Fig. 5) ed esprimono antigeni di superficie classici associati alle MSCs da midollo osseo; esse infatti sono positive per CD166, CD105, CD90, CD73, CD44, CD29 e CD13, mentre risultano negative per l'espressione dei marcatori emopoietici (CD34, CD45) e monocitari (CD14) classici. Inoltre è stata verificata l'espressione di superficie di antigeni tipici delle ESCs come SSEA4, anche se non è stata confermata da analisi in immunofluorescenza (Miki et al, 2007), e del mRNA del marcatore di cellule staminali pluri e multi potenti Oct 4 (Bilic et al, 2008; Alviano et al, 2007; Kim et al, 2007). Infine l'analisi di marcatori di superficie per hAM e

hCOR MSCs mostra una limitata espressione degli antigeni HLA-ABC e una mancata espressione di HLA-DR, indicando quindi un potenziale stato immunoprivilegiato per queste popolazioni cellulari (Portmann-Lanz et al, 2006; Wolbank et al 2007), suggerendone un possibile utilizzo in clinica.



**Fig. 5.** Morfologia delle cellule mesenchimali isolate da membrane fetali. A e B: cellule mesenchimali isolate da corion (scala 20  $\mu$ m); C e D: cellule mesenchimali da membrana amniotica (C scala 20  $\mu$ m; D: 40  $\mu$ m) (Ilancheran et al, 2009).

Entrambe le popolazioni isolate dalla porzione mesenchimale delle membrane fetali sono state analizzate per le loro caratteristiche di pluripotenza e quindi stimulate a differenziare verso i *lineages* mesenchimali classici, ovvero osteogenico, adipogenico e condrogenico. Inoltre è stato analizzato anche il potenziale differenziativo verso tipi cellulari appartenenti a tutti e tre i foglietti germinativi, quindi in senso ectodermico (neurale) (Portmann-Lanz et al, 2006; Sakuragawa et al, 2004), mesodermico (cellule muscolo scheletriche, endoteliali e cardiomiciti) (Alviano et al, 2007; Ilancheran et al, 2007; Ventura et al, 2007) ed endodermico (epatico) (Tamagawa et al, 2007). Un'analisi dettagliata sulle hAM-MSCs ha mostrato infatti che queste cellule rispondono ad uno stimolo in senso neuronale e gliale esprimendo marcatori specifici di entrambi i citotipi, come MAP2 (*human microtubule-associated protein 2*) e GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Sakuragawa et al, 2004). Sempre hAM-MSCs rispondono ad un differenziamento in senso endoteliale aumentando l'espressione dei recettori del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), di ICAM1 (*Intracellular adhesion molecule 1*), di CD34 e del von Willebrand factor, e rispondono allo stimolo in senso cardiomiogenico aumentano l'espressione di geni (GATA4 e Nkx

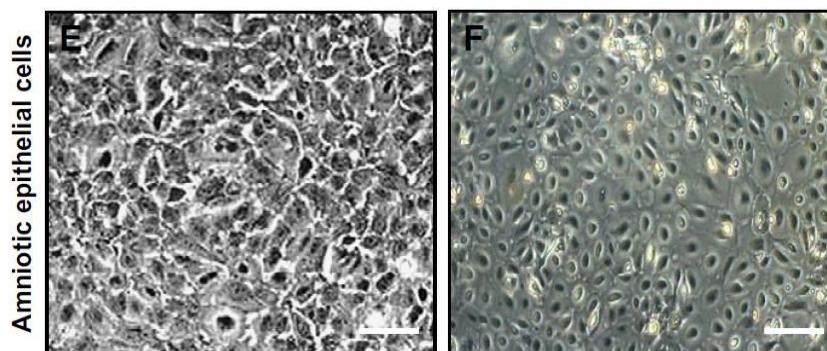


2.5) e proteine tipiche (catena pesante della miosina sarcomerica) (Ventura et al, 2007). Il differenziamento in senso cardiaco ed endoteliale è stato mantenuto anche in prove di trapianto *in vivo* in ratti infartuati, mostrando anche una buona funzionalità nel migliorare la riparazione del tessuto cardiaco (Ventura et al, 2007). Infine le hAM-MSCs hanno mostrato anche la capacità di differenziare verso cellule in grado di esprimere marcatori tipici di epatociti (Tamagawa et al, 2007).

Oltre alle capacità differenziali *in vitro* le cellule mesenchimali stromali da membrane fetali sono state utilizzate per approcci basati su trapianto *in vivo*. Bailo e colleghi hanno infatti dimostrato che hAM-MSCs e hCOR-MSCs possono essere utilizzate in trapianti xenogenici in ratto e maiale, mostrando successo e buona persistenza del trapianto e mettendo anche in evidenza la capacità migratoria di queste cellule. Le MSCs utilizzate per il trapianto sono state ritrovate in molteplici organi e tessuti *in vivo* dopo infusione di tipo intravenosa o intraperitoneale. La capacità di migrare di queste cellule è stata confermata anche dall'espressione di molecole di adesione e migrazione (L-selectina, VLA-5, CD29), così come di metallo proteinasi (MMP-2 e -9) (Bailo et al, 2004).

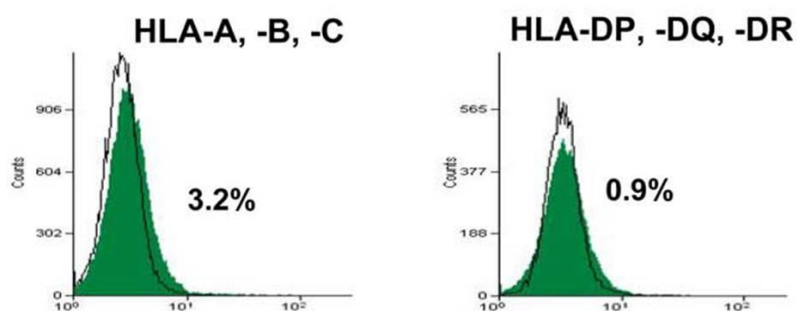
#### **4.2 Cellule epiteliali da membrana amniotica**

Le cellule epiteliali di membrana amniotica (hAECs) vengono isolate dopo separazione manuale meccanica delle membrane fetali e grazie al trattamento enzimatico dell'amnios in tripsina o dispasi. Questi enzimi infatti riescono a scindere i legami che le cellule dell'epitelio instaurano tra loro e con la lamina basale sottostante e permettono quindi di ottenere colture di hAECs, che *in vitro* crescono in adesione e assumono un aspetto poligonale, definito *cobblestone like* (Fig. 6) (Parolini et al, 2008). Da una membrana amniotica ottenuta da gravidanza a termine è possibile isolare fino a  $200-300 \times 10^6$  hAECs e in coltura in presenza di EGF (*Epidermal Growth Factor*) le hAECs proliferano facilmente fino a formare un monostrato cellulare (Terada et al, 2000; Miki et al 2005, Miki and Strom, 2006). L'alta densità cellulare non disturba la coltura inibendone la crescita cellulare, ma al contrario è stato dimostrato che la coltura ad alta densità porta alla formazione di strutture simili a sferoidi, che mantengono le caratteristiche osservate per le cellule cresciute in monostrato. Esperimenti di proliferazione *in vitro* hanno mostrato un fenomeno di senescenza replicativa per queste cellule, che dopo 6-10 passaggi in coltura arrestano progressivamente la loro fase replicativa. Questo fenomeno si può verificare anche prima se le cellule vengono seminate a bassa densità e potrebbe essere spiegato dall'assenza di telomerasi per le hAECs (Miki et al 2005; Miki and Strom, 2006, Ilancheran et al, 2007). È stata quindi stimata come densità di semina ottimale un numero di cellule pari a circa 100.000 cellule/cm<sup>2</sup> (Miki 2005).



**Fig. 6.** Morfologia delle cellule epiteliali da membrana amniotica (scala 40 µm) (Ilancheran et al, 2009).

L'analisi immunofenotipica ha indicato come principale marcatore per questa popolazione cellulare le citocheratine, a conferma della loro natura epiteliale, mentre i marcatori classici delle cellule di origine mesenchimale sono assenti. Un discorso a parte può essere fatto per la vimentina, classico marcatore mesenchimale, che sembra assente in hAECs all'isolamento, ma sembra comparire in coltura. Questi dati indicano che la coltura *in vitro* e il microambiente in cui si trovano le cellule possono indurre fenomeni di dedifferenziamento delle hAECs (Miki and Strom, 2006), per le quali si potrebbe parlare anche di eterogeneità fenotipica (Terada et al, 2000; Miki and Strom, 2006, Parolini et al, 2008). Tra gli antigeni di superficie presenti sulle hAECs ricordiamo ABCG2 (ATP binding cassette transporter G2), CD9, CD24, E-caderina e le integrine  $\alpha 6$  e  $\beta 1$ . Inoltre le hAECs esprimono i marcatori tipici di cellule staminali SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60 e TRA 1-81 (Miki et al 2005; Ilancheran et al, 2009; Evangelista et al, 2008). L'analisi di espressione per marcatori molecolari tipici di cellule staminali pluripotenti conferma l'espressione di Oct4, SOX2, FGF4, Rex1 e Nanog da parte dell hAECs (Miki et al 2005; Miki and Strom, 2006; Ilancheran et al, 2009; Parolini et al, 2008). Infine l'espressione a bassi livelli degli antigeni HLA-A, -B, -C (di classe I) e la quasi totale assenza degli antigeni HLA di classe II (-DR, -DP, -DQ) (Fig. 7), accompagnati dalla capacità di secernere fattori immunosoppressivi, sembrano delineare per le hAECs un profilo di immunoprivilegio, riducendo il rischio di rigetto in casi di allotrapianto (Kubo et al 2001; Kamiya et al 2005; Li et al, 2005; Ilancheran et al, 2007).



**Fig. 7.** Analisi di espressione degli antigeni HLA su hAECs (Ilancheran et al, 2007).

Le hAECs sono state testate anche per la loro sicurezza, in ottica di possibili utilizzi *in vivo*, valutandone la capacità di formare teratomi *in vivo*. La formazione di teratomi è caratteristica delle ESCs e ne costituisce anche uno dei limiti principali, mentre le hAECs, pur presentando caratteristiche fenotipiche simili alle ESCs, una volta iniettate in topi SCID non hanno portato alla formazione di teratomi, anche se l'assenza a lungo termine di formazioni tumorali deve essere ulteriormente verificata ( Miki et al 2005; Miki and Strom 2006; Ilancheran et al, 2009).

Le capacità differenziative delle cellule epiteliali amniotiche sono state evidenziate da vari gruppi di ricerca, che hanno dimostrato che queste cellule rispondono *in vitro* al differenziamento verso cellule della linea mesodermica, quindi in senso osteogenico, adipogenico, cardiomiogenico e miogenico (Miki et al, 2005; Miki and Strom 2006; Miki et al 2007; Ilancheran et al, 2007; Insausti et al, 2010; Diaz-Prado et al, 2010), ma anche verso *lineages* ectodermici (neurale) ed endodermici (pancreatico, epatico).

Diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che le hAEC in coltura classica presentano marcatori tipici delle cellule nervose, come nestina, MAP2 e GFAP, e sono in grado di produrre fattori neurotrofici (Neurotrophin 3, NGF e BDNF) e neurotrasmettitori come acetilcolina e catecolamine (Sakuragawa et al, 1996; Sakuragawa et al, 1997; Elwan and Sakuragawa, 1997). Questi dati vanno a supporto dell'ipotesi che l'amnios sia coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso durante l'embriogenesi umana e sostengono anche l'idea della risposta delle hAECs a uno stimolo differenziativo in senso neurale *in vitro* (Koyano et al, 2002). Diversi protocolli di differenziamento *in vitro* hanno infatti mostrato aumento nell'espressione di marcatori tipici di neuroni e cellule gliali (nestina, MAP2, GFAP) e anche cambiamento morfologico delle cellule epiteliali, che assumono una morfologia più allungata tipica di cellule nervose (Miki et al, 2005; Ilancheran et al, 2007). Numerosi studi hanno confermato anche la capacità differenziativa delle hAECs verso *lineages* mesodermici, con particolare attenzione al commissionamento epatico e pancreatico. Le hAECs rispondono al differenziamento epatico aumentando l'espressione di geni per albumina (Alb) e alfafetoproteina (AFP) e assumendo la morfologia tipica degli epatociti, fino a presentare funzioni epatiche classiche con l'espressione di citocromi coinvolti nel metabolismo di farmaci (CYP1A). Anche il differenziamento pancreatico endocrino ha spinto le hAECs ad adottare morfologia e organizzazione ultrastrutturale tipica delle cellule pancreatiche, accompagnata dall'espressione di geni *markers* come Pdx1, Pax6, Nkx2.2 e glucagone, ma senza arrivare all'espressione di insulina (Miki et al 2005; Ilancheran et al, 2007).

L'insieme di dati raccolti sembra sostenere dunque l'ipotesi che le cellule epiteliali amniotiche abbiano caratteristiche di cellule staminali, con una buona plasticità e in grado di rispondere

all'azione di fattori di crescita e molecole differenziative specifiche. Tutto questo fa dell'epitelio amniotico una sorgente di cellule staminali di forte interessante per possibili approcci di medicina rigenerativa.

## **5. Caratteristiche immunologiche delle cellule derivate da membrane fetali**

L'infiammazione è un meccanismo di risposta messo in atto dal sistema immunitario per proteggersi da lesioni ed infezioni, ma se non controllata può rappresentare un svantaggio per l'organismo *in toto*, non solo per il rischio di rigetto di trapianti d'organo o cellule, ma anche per l'azione diretta in patologie a base autoimmune e infiammatorie croniche. La possibilità di modulare la risposta immunitaria senza sopprimerla totalmente potrebbe fornire quindi una chiave di svolta per aumentare la percentuale di successo, evitando il rigetto del trapianto. La capacità di immunomodulare la risposta immunitaria si basa sulla possibilità di inibire gli effetti deleteri dell'infiammazione promuovendone di contro gli effetti rigenerativi e riparativi. La terapia cellulare è stata proposta anche in quest'ottica, per trattare patologie che vedono un coinvolgimento dell'infiammazione nella loro eziopatogenesi. L'uso di cellule staminali e progenitori in particolare sembra giustificato dalla capacità di queste cellule di agire non tanto rimpiazzando le cellule del tessuto danneggiato, ma piuttosto, come osservato per le MSCs, esercitando un effetto trofico e di modulazione della risposta immunitaria dell'ospite, riducendo i segnali apoptotici e aumentando quelli riparativi e angiogenici. Le caratteristiche anti-infiammatorie e immunomodulatorie sembrano appartenere in maniera generalizzata alle cellule staminali derivate da placenta. Questa idea è supportata dalle peculiarità dell'organo stesso, in particolare dal punto di vista immunologico, e analizzarne l'assetto immunitario durante la gravidanza potrebbe fornire un punto di partenza per studiare le caratteristiche immunologiche delle cellule staminali da essa derivate.

Il feto ha un corredo genetico composto per metà da DNA paterno e per metà materno, per questo si può dire che presenti antigeni "semi-allogeni" che potrebbero teoricamente essere riconosciuti dal sistema immunitario della madre, ma nonostante questo la maggior parte delle gravidanze viene portata a termine senza fenomeni di rigetto. In quest'ottica placenta e membrane fetali, che rappresentano l'interfaccia tra madre e feto, partecipano alla creazione di un ambiente di tolleranza immunologica e le cellule staminali residenti in questi tessuti potrebbero conservare le stesse interessanti caratteristiche. Cellule isolate dalle diverse regioni della placenta presentano bassi livelli di antigeni altamente polimorfici HLA di classe Ia (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e sono privi degli antigeni HLA di classe II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) e di molecole co-stimolatorie coinvolte nell'attivazione del linfociti T (CD40, CD80 CD86); all'opposto esprimono l'antigene HLA-G, noto per la capacità di modulare la risposta immunitaria (Parolini et al, 2008; Parolini et al,

2010; Evangelista et al, 2008; Manuelpillai et al, 2011). Gli antigeni HLA sono molecole che costituiscono il complesso maggiore d'istocompatibilità MHC e tramite le quali i peptidi estranei vengono presentati ai linfociti T. In caso di trapianto, gli antigeni HLA allogenici vengono riconosciuti come se fossero antigeni HLA autologhi che presentano peptidi estranei e di conseguenza portano all'attivazione della risposta immunitaria nell'ospite. La loro assenza o un'espressione limitata sulle cellule derivate da placenta suggerisce quindi la capacità di ingannare il sistema immunitario e di non attivarlo. Studi *in vitro* mostrano che cellule isolate dalle membrane fetali non solo non inducono una risposta immunitaria in esperimenti di MLR (*mixed lymphocyte reactions*) con linfociti allogenici o xenogenici, ma sono in grado anche di sopprimere la proliferazione di linfociti stimolati con mitogeni o alloantigeni (Wolbank et al, 2007; Magatti et al, 2008; Bailo et al, 2004). Inoltre le cellule isolate da membrana amniotica bloccano la maturazione dei monociti a cellule dendritiche (Magatti et al, 2009). L'azione immunomodulatoria esercitata dalle cellule derivate da placenta sembra coinvolgere non solo interazioni dirette cellula-cellula, ma anche meccanismi basati sull'azione di alcuni fattori solubili. Alcuni esperimenti condotti utilizzando il sovrantante di cellule di membrana amniotica, o sistemi *transwell* che impediscono il contatto diretto tra cellule, hanno mostrato che esso stesso è in grado di inibire la risposta immunitaria. Tra i fattori coinvolti: l'enzimaIDO (indoleamina 2,3-diossigenasi), il TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), l'interleuchina 10 (IL-10), la prostaglandina E-2 (PGE-2), la forma solubile dell'antigene HLA-G, il ligando per Fas (*Fas ligand* o CD95L) e il fattore inibente la migrazione (MIF). IDO è un enzima che catabolizza il triptofano, aminoacido essenziale richiesto per la proliferazione dei linfociti T, e portando a un calo dei livelli di triptofano regola la proliferazione dei linfociti T (Munn et al, 1998; Munn et al, 1999). La forma solubile dell'antigene HLA-G induce apoptosi in linfociti T CD8<sup>+</sup> attivati e inibisce la proliferazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> citotossici; inoltre HLA-G espresso dalle cellule del trofoblasto inibisce l'attività di cellule NK (*natural killer*) ed è possibile che agisca allo stesso modo anche quando è espresso da cellule isolate da membrana amniotica (Fournel et al, 2000; Bainbridge et al, 2000; Thellin et al, 2000; Rizzo et al, 2007). Anche il TGF $\beta$  ha un ruolo nel modulare la risposta immunitaria: esso è coinvolto in meccanismi che portano al blocco dello sviluppo e della funzione dei linfociti T, agendo sulla sintesi di DNA e di conseguenza sulla proliferazione dei linfociti T attivati (McKarns and Kaminski, 2000; Li et al, 2006). PGE-2 è un mediatore con un ruolo importante nella modulazione immunitaria, in grado di sopprimere l'attivazione dei linfociti T e di agire sulla maturazione di macrofagi e cellule dendritiche e di stimolare la produzione di citochine anti-infiammatorie tra cui IL-10 (English, 2013; Harris et al, 2002). Inoltre le cellule derivate da placenta esprimono il ligando per Fas (FasL) che induce apoptosi nei linfociti che presentano il recettore specifico Fas. Infine le

cellule epiteliali amniotiche esprimono il MIF (fattore di inibizione della migrazione), che inibisce la migrazione di neutrofili e macrofagi al sito di infiammazione ( Li et al, 2005).

Nonostante le evidenze *in vitro* sulle capacità immunomodulatorie delle cellule derivate da placenta, quando si passa ad applicazioni *in vivo* è necessario prestare più attenzione, poiché se *in vitro* il sistema è semplificato artificialmente e permette di valutare l'azione di ogni popolazione cellulare singolarmente, *in vivo* ci si trova a dover valutare gli effetti in contemporanea su una molteplicità di popolazioni cellulari che partecipano ad attivare, mantenere o sopprimere la risposta immunitaria. Alcuni studi preclinici hanno dimostrato che cellule derivate da placenta umano sopravvivono dopo trapianto xenogenico in animali immunocompetenti tra cui ratti, maiali e scimmie (Bailo et al, 2004; Sankar and Muthusamy 2003) senza dare fenomeni di rigetto, ma sono necessari ulteriori studi per arrivare a chiarire la complessità dei meccanismi che sottendono questo fenomeno *in vivo*.

## **6. Potenziale applicativo delle cellule derivate da membrane fetali**

### **6.1 Applicazioni cliniche delle membrane fetali**

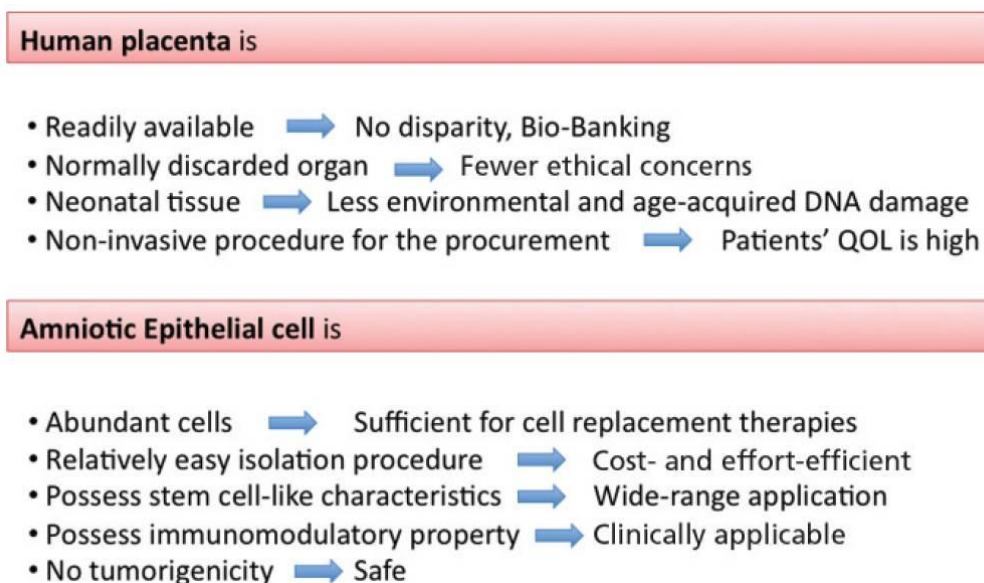
Sono note da tempo le proprietà anti-infiammatorie, anti-batteriche, anti-fibrotiche e di supporto alla ri-epitelizzazione della membrana amniotica. Queste caratteristiche, affiancate alla bassa immunogenicità del tessuto, sono sfruttate da tempo per applicazioni in clinica. I primi utilizzi in clinica della membrana amniotica risalgono al secolo scorso, quando veniva utilizzata per riparare ferite cutanee (Davis, 1910). L'utilizzo si è poi esteso al trattamento di ustioni e per facilitare la guarigione di ulcere cutanee (Faulk et al, 1980; Bennett et al, 1980; Gruss and Jirsch, 1978; Trelford and Trelford-Sauder 1979).

L'uso in oculistica della membrana è noto dagli anni '40 del secolo scorso, quando lembi di membrana amniotica venivano usati per riparare danni corneali, congiuntivali o limbalì o come adiuvante al recupero in seguito a chirurgia (Sorsby et al, 1947; Gomes et al, 2005; Sangwan et al, 2007; Burman et al, 2004). La base di queste applicazioni cliniche si ritrova nelle proprietà anti-infiammatorie e anti-fibrotiche della membrana amniotica che sopprime l'infiammazione tramite il rilascio di fattori solubili e previene il deposito di tessuto cicatriziale e l'angiogenesi (Kim and Tseng, 1995). Il principale utilizzo in oftalmologia consiste in una sorta di bendaggio temporaneo con lembi di membrana amniotica in seguito a bruciature della superficie dell'occhio. La membrana serve da barriera anti-infiammatoria nella fase acuta dell'ustione, limitando angiogenesi e infiammazione, poiché agisce da filtro in grado di bloccare le cellule infiammatorie che infiltrano la

superficie oculare e le spinge in apoptosi tramite attivazione del Fas ligand (CD95) (Kim et al, 2000; Park and Tseng, 2000; Kubo et al, 2001).

Anche se l'utilizzo delle membrane fetali *in toto* continua ad essere considerata una valida opzione terapeutica per alcune situazioni patologiche, l'attenzione della comunità scientifica si è spostata verso lo studio del possibile utilizzo delle singole popolazioni cellulari residenti nelle membrane fetali, ottenendo anche numerosi risultati a sostegno dell'ipotesi che le cellule derivate da placenta possano essere utilizzate con effetti positivi in differenti condizioni patologiche (Parolini et al, 2010). Le cellule derivate da placenta risultano particolarmente interessanti in primo luogo per la facilità di recupero del tessuto di partenza e per l'assenza di problemi etici che ne accompagna l'uso, ma soprattutto per la non tumorigenicità e per le proprietà immunomodulatorie intrinseche di queste cellule, elementi fondamentali per applicazioni cliniche efficaci e sicure (Fig.8).

L'utilizzo delle cellule da membrane fetali in *trials* terapeutici sull'uomo è ancora ad uno stadio iniziale. Tra questi ne è stato realizzato uno per valutare l'azione di hAECs inoculate sotto pelle a sei bambini affetti da malattia da accumulo lisosomiale e l'esito ha mostrato l'assenza di rigetto da parte dell'ospite senza però produrre i benefici terapeutici attesi (Yeager et al, 1985).



**Fig. 8.** Vantaggi delle cellule derivate da placenta e membrane fetali per applicazioni cliniche (Miki, 2011).

## **6.2 Studi preclinici per patologie a carico del sistema nervoso**

Il potenziale differenziativo e le caratteristiche immunologiche delle cellule isolate da membrane fetali ha spinto numerosi ricercatori ad approfondire lo studio sul possibile di utilizzo di queste cellule in approcci di trapianto *in vivo*. Tra i primi aspetti ad essere indagati troviamo il ruolo delle hAECs, spinte a differenziare in senso neurale, nel riparare danni al sistema nervoso centrale grazie

un effetto neuroprotettivo e neurorigenerativo in modelli animali di patologie neurodegenerative. Studi su modelli di ratto e topo per morbo di Parkinson hanno mostrato che hAECs non solo sopravvivono in seguito al trapianto, ma sono in grado di produrre dopamina e di prevenire la degenerazione neuronale, restituendo un effetto neuroprotettivo evidenziato dal miglioramento nel comportamento degli animali malati (Kakishita et al, 2000; Kakishita et al, 2003; Kong et al, 2008). Lo studio condotto da Kakishita è stato realizzato su animali immunodepressi, ma altri sono stati condotti anche su animali immunocompetenti (Yang et al, 2010); in entrambi i casi sono stati osservati effetti benefici in assenza di rigetto. Le osservazioni realizzate grazie a questi studi hanno portato l'attenzione verso l'attività trofica e paracrina delle hAECs; sembra infatti che a guidare i miglioramenti nella funzionalità del tessuto danneggiato sia la capacità delle cellule trapiantate di produrre fattori neurotrofici, tra i quali il fattore neurotrofico derivante dal cervello (BDNF) e il fattore neurotrofico derivante dalla linea delle cellule gliali (GDNF), piuttosto che l'effettiva capacità delle hAECs di differenziare in senso neuronale (Sakuragawa et al, 1997; Sakuragawa et al, 2001; Elwan and Sakuragawa, 1997; Uchida et al, 2000).

Il potenziale delle cellule derivate da placenta è stato analizzato anche su modelli di danno al midollo spinale, dove la reazione infiammatoria, successiva alla lesione fisica primaria, causa un danno secondario dagli effetti importanti (Hausmann, 2003). Cellule epiteliali amniotiche sono state trapiantate con effetti positivi in modelli di lesione al midollo spinale di scimmia in assenza di immunosoppressione. Questo studio ha mostrato sopravvivenza a lungo termine per le hAECs trapiantate senza evidenziare fenomeni infiammatori o di rigetto cellulare ed è stato notato un miglioramento nei test di locomozione, suggerendo un effetto neuroprotettivo delle hAECs che come conseguenza determina un miglioramento nella funzionalità tissutale (Sankar and Muthusamy, 2003). Cellule epiteliali amniotiche sono state utilizzate anche in modelli murini di encefalomyelite autoimmune (EAE), un modello sperimentale animale utilizzato per studiare la patogenesi della sclerosi multipla. McDonald e collaboratori hanno osservato che le hAECs sono in grado di ridurre i sintomi clinici, i livelli di infiammazione del sistema nervoso centrale (CNS), la demielinizzazione e la degenerazione assonale in un modello di EAE. Non solo, ma uno studio successivo, condotto sempre su modelli murini di EAE, ha dimostrato che le hAECs determinano un calo nell'infiltrazione di linfociti T e di monocito/macrofagi in grado di determinare una riduzione della demielinizzazione a livello del CNS (McDonald et al, 2011; Liu et al, 2012).

Un'altra patologia a carico del sistema nervoso centrale che potrebbe ricavare benefici dal trattamento con cellule staminali isolate da placenta è l'ictus. L'ictus rappresenta una patologia dal rilevante impatto sociale ed è caratterizzata da un danno iniziale cui segue una reazione infiammatoria importante, che media la maggior parte dei fenomeni di morte cellulare secondaria.



Per questo l'azione anti-infiammatoria esercitata dalle cellule derivate da placenta potrebbe fornire un'interessante ed efficace opzione terapeutica. Liu e collaboratori hanno mostrato che hAECs, iniettate 24h dopo l'occlusione dell'arteria cerebrale mediana in modelli di ratto, determinano una riduzione della regione infartuata e un miglioramento nell'esito a livello comportamentale e neurologico ed anche una riduzione nei livelli di apoptosi cellulare nelle regioni limitrofe al trapianto (Liu et al, 2008). Resta comunque da valutare con attenzione il momento di infusione cellulare, che deve essere stabilito sulla base della tempistica con cui la reazione infiammatoria si sviluppa nel tempo in seguito al danno primario: i segnali infiammatori immediatamente successivi all'ictus infatti sono utili nel guidare le cellule trapiantate al sito di danno (Robin et al, 2006). Gli effetti dati dall'infiammazione possono avere aspetto positivo o negativo a seconda del momento, successivo al danno, in cui le si osserva. Diventa quindi fondamentale capire il momento esatto in cui effettuare l'infusione di cellule staminali, per poter sfruttare quella finestra terapeutica in cui i segnali infiammatori di migrazione possono guidare la migrazione delle cellule alla regione di danno ischemico e rendere possibile alle cellule di esercitare il loro effetto anti-infiammatorio. Sulla base di questa osservazione cellule epiteliali e mesenchimali amniotiche sono state trapiantate in un modello animale di ictus in assenza di terapia immunosoppressiva, mostrando un'attenuazione dei deficit motori e neurologici per trapianto cellulare realizzato a due giorni dal danno primario (Parolini et al, 2008).

L'insieme di questi studi dimostra che cellule staminali derivate da membrane fetali sono in grado di portare miglioramenti nel trattamento di diverse patologie a carico del sistema nervoso centrale e sembrano farlo attraverso quattro meccanismi principali: la secrezione di fattori neurotrofici che promuovono il recupero tissutale, la pluripotenza che sfrutta il differenziamento in senso neurale e quindi la sostituzione di cellule endogene danneggiate, la funzione trofica e paracrina, mediata dalla secrezione di molecole necessarie per il recupero funzionale delle cellule (citochine, fattori di crescita, ormoni, neurotrasmettitori) e l'azione immunomodulatoria, in grado di modulare la risposta immunitaria endogena (English, 2013).

### ***6.3 Studi preclinici per patologia diabetica***

Le capacità differenziative delle cellule derivate da membrane fetali sono state approfondite anche verso il commissionamento in senso pancreatico. Quest'ultimo assume particolare importanza specialmente se si considera l'impatto della patologia diabetica a livello sociale. Il diabete mellito insulino-dipendente colpisce infatti una buona fetta di tutta la popolazione mondiale e, specialmente per il diabete di tipo I a insorgenza giovanile e con base genetica ed autoimmune, non vi sono terapie risolutive. I pazienti diabetici sono infatti dipendenti da somministrazione quotidiana di

insulina e l'unica terapia risolutiva attualmente disponibile riguarda il trapianto d'organo *in toto* o di isole pancreatiche, che però presentano una serie di limiti e rischi legati alla disponibilità di donatori, al successo della procedura chirurgica in sé e alla necessità di terapia immunosoppressiva per scongiurare il rischio di rigetto (Roche et al, 2005; Dominguez-Bendala et al, 2011). Guardando al diabete da questa prospettiva diventa chiara l'importanza di trovare una sorgente potenzialmente inesauribile di cellule staminali in grado di differenziare verso cellule pancreatiche endocrine. Studi *in vitro* hanno mostrato la capacità di hAECs di differenziare in senso pancreatico, ma sono gli studi *in vivo* che mostrano prospettive ancor più promettenti. Wei e colleghi hanno mostrato che hAECs, immortalizzate e trapiantate nella milza di tipi resi diabetici, sono in grado di normalizzare i livelli di glucosio nel sangue anche per alcune settimane post trapianto. Non solo, ma è stato possibile anche co-localizzare  $\beta 2$  microglobulina umana e cellule secernenti insulina umana, suggerendo la capacità delle hAECs di intraprendere, *in vivo*, il commissionamento in senso pancreatico endocrino (Wei et al, 2003). Sempre nell'ottica di trovare nuove opzioni terapeutiche per il diabete è stata indagata la possibilità di co-trapiantare hAECs non differenziate insieme ad isole pancreatiche di donatore. Questo approccio mira a sfruttare le caratteristiche immunomodulatorie delle cellule epiteliali amniotiche per aumentare la sopravvivenza e ridurre il rischio di rigetto delle isole trapiantate. Lo studio condotto da Qureshi e colleghi indica che è possibile ottenere costrutti cellulari basati sull'associazione di isole pancreatiche e hAECs e tali strutture riescono ad inibire la proliferazione di linfociti T attivati *in vitro*. Questo studio conferma la capacità delle hAECs di creare uno stato di immunosoppressione in grado di azzerare l'immunogenicità naturale delle cellule  $\beta$  pancreatiche presenti nelle isole, grazie alla secrezione di fattori solubili dall'azione anti-infiammatoria (TGF $\beta$ , FasL, HLA-G, IL-10). L'azione immuno-protettiva delle hAECs mostrata *in vitro* sembra aprire le porte per futuri test *in vivo*: l'immunoprotezione data dalle hAECs non va ad alterare la funzionalità e la capacità secretoria delle cellule  $\beta$ , preservandone la sensibilità al glucosio e sostenendone anche la vitalità, grazie al rilascio di specifici fattori di crescita (Qureshi et al, 2011).

#### **6.4 Studi preclinici per ischemia cardiaca**

Le cellule isolate da membrane fetali sono state valutate anche per possibili applicazioni in casi di patologie vascolari e cardiache. Cellule mesenchimali da membrane fetali e da sola membrana amniotica sono state trapiantate in modelli di ratto per infarto cardiaco. Gli animali che hanno ricevuto il trapianto di cellule hanno mostrato un aumento nella densità di vasi capillari, miglioramento nella funzionalità ventricolare e una riduzione del tessuto fibroso cicatriziale (Ventura et al, 2007).

Un modello di ischemia nel ratto ha tratto beneficio dal trapianto di lembi di membrana amniotica. Gli animali trattati hanno infatti mostrato una notevole riduzione della disfunzione cardiaca, nonostante non sia stato possibile ritrovare cellule derivate da membrana amniotica nel tessuto cardiaco dell'ospite. Questa osservazione va ad ulteriore supporto dell'ipotesi di un effetto paracrino mediato dai fattori solubili prodotti dalla membrana amniotica, fattori in grado di promuovere e mediare l'effetto di protezione e rigenerazione tissutale (Cargnoni et al, 2009).

### **6.5 Studi preclinici per patologie a carico del tessuto epatico**

Oltre agli studi precedentemente citati, le cellule isolate da membrana amniotica sono state utilizzate per lo studio di possibili approcci di terapia cellulare e rigenerativa per patologie a carico del fegato. Vari studi *in vivo* sono stati condotti per valutare la propensione delle cellule isolate da membrana amniotica a differenziare in senso epatico. In uno studio condotto da Sakuragawa e colleghi è stata osservata la produzione di albumina e alfafetoproteina (AFP) in seguito a trapianto di hAECs in fegato di topi SCID, osservando anche l'integrazione delle cellule trapiantate nel parenchima epatico (Sakuragawa et al 2000). In aggiunta, antitripsina 1 $\alpha$  e albumina umana sono state identificate nel siero di topi SCID dopo trapianto di hAECs (Miki and Strom, 2006; Takashima et al, 2004). Per quanto riguarda fenomeni fibrotici a livello epatico, hAECs sono state trapiantate in topi immunocompetenti trattati con tetracloruro di carbonio (CCl<sub>4</sub>), molecola in grado di indurre fibrosi epatica. Le cellule trapiantate sono state ritrovate diverse settimane post trapianto, accompagnate da un calo nei livelli di IL-6, TNF $\alpha$  e collagene e da una riduzione nel numero di epatociti apoptotici (Manuelpillai et al, 2010). Questi studi sostengono il potenziale delle cellule epiteliali amniotiche come strumento di rigenerazione epatica, ma restano necessari ulteriori dati circa l'effetto del loro trapianto in modelli di danno epatico acuto o cronico (Evangelista et al, 2008).

### **6.6 Studi preclinici per fibrosi polmonare**

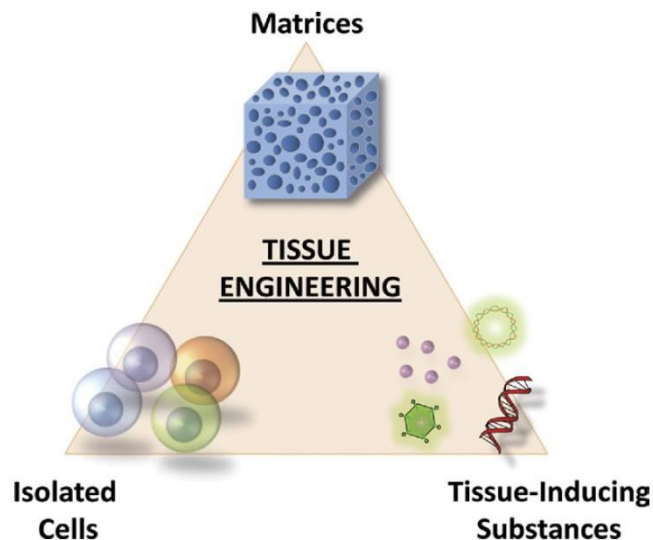
Cellule mesenchimali ed epiteliali derivate da membrana amniotica sono state valutate come trattamento per fenomeni di fibrosi polmonare. Diversi fattori, ereditari, patogenetici, ambientali o legati allo stile di vita, portano a infiammazione polmonare. La reazione infiammatoria determina necrosi e apoptosi cellulare, infiltrazione massiccia di cellule infiammatorie e successivo rilascio di citochine pro-infiammatorie, nonché il deposito attivo di fibre collagene che alterano l'architettura del tessuto stesso compromettendone la funzionalità. Una sospensione cellulare mista di cellule epiteliali e mesenchimali di membrana amniotica sono state infuse in topi immunocompetenti trattati con bleomicina, molecola usata per mimare le fasi di infiammazione e fibrosi polmonare. Le

cellule trapiantate hanno determinato una riduzione nell'infiltrazione di neutrofili e nelle dimensioni dell'area di fibrosi, e in parallelo non è stato osservato un aumento significativo nel numero di macrofagi e linfociti (Cargnoni et al, 2009). Uno studio analogo è stato condotto su topi SCID e ha mostrato la persistenza a lungo termine delle cellule trapiantate e un calo nei livelli di IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e di collagene, accompagnati da rigenerazione e miglioramento nell'architettura del tessuto bersaglio (Moodley et al, 2010).

## **7 Cellule staminali derivate da membrane fetali verso l'applicazione clinica.**

### ***7.1 Aspetti generali***

L'ingegneria tissutale è stata inizialmente definita come una scienza interdisciplinare che unisce i principi dell'ingegneria a quelli della biologia, al fine di sviluppare sostituti biologici capaci di ristabilire, mantenere e migliorare la funzione tissutale (Langer and Vacanti, 1993). L'obiettivo è riprodurre un modello il più fedele possibile al fisiologico microambiente cellulare e per questo sono stati individuati tre pilastri fondamentali: le cellule isolate, i fattori d'induzione e la matrice (Fig. 9). L'importanza della matrice deriva dall'interazione diretta delle cellule con la matrice extracellulare (ECM), che assume importanza per proliferazione, migrazione e differenziamento delle cellule staminali (Lin et al, 2010). Ad esempio studi condotti sul differenziamento in senso endodermico delle cellule staminali suggeriscono il ruolo fondamentale dell'interazione di queste cellule con la ECM per un esito positivo dell'induzione (Brafman et al, 2012). Le cellule rappresentano la componente principale della terapia cellulare, ma la sola provenienza delle cellule non garantisce di per sé il buon esito del trapianto poiché esistono diversi fattori che influiscono sull'efficacia della terapia. Tra questi il numero esatto di cellule da trapiantare, la scelta del momento giusto per il trapianto, l'individuazione di un microambiente favorevole alla crescita cellulare e le condizioni di coltura che devono essere strettamente controllate, affinché la riproducibilità degli esperimenti e la sicurezza siano garantite. Per mantenere una buona proliferazione cellulare devono essere rispettate condizioni specifiche di osmolarità, pH, ossigeno e temperatura, che mimano le condizioni fisiologiche. Inoltre di fondamentale importanza sono anche le plastiche utilizzate per le colture cellulari, che devono essere adatte a facilitare o inibire l'adesione delle cellule, e i mezzi di coltura, che devono contenere tutte le molecole solubili, i nutrienti e i fattori di crescita necessari.



**Fig. 9.** I tre pilastri della medicina rigenerativa (Regenerative Medicine, 2011).

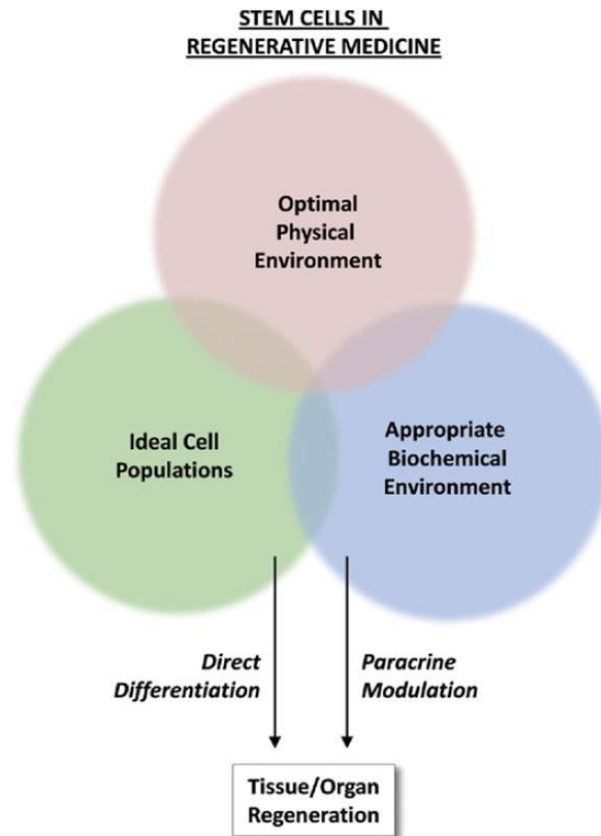
I terreni di coltura possono essere addizionati, a seconda delle necessità specifiche di ciascun tipo cellulare, con *supplements* composti di precursori dell'anabolismo cellulare, vitamine e ioni. Tra i *supplements* fondamentali abitualmente utilizzati ricordiamo i sieri di origine animale, che vengono aggiunti ai terreni basali di coltura e risultano indispensabili per la crescita, il metabolismo e la proliferazione cellulare. Ad esempio il Siero Fetale Bovino (FBS) è uno degli elementi essenziali utilizzati nella maggior parte delle culture cellulari e consiste in un complesso cocktail di fattori di crescita, proteine e ormoni, fondamentali per la crescita delle cellule umane e animali. Negli ultimi trent'anni si è discusso molto sulle applicazioni scientifiche e sulle questioni etiche legate all'uso di FBS nelle colture cellulari, poiché il suo utilizzo non è privo di problemi. Primo su tutti la mancanza di una composizione definita del siero fetale bovino e l'alta variabilità biologica che ne deriva. Nonostante sia un prodotto industriale, e la sua produzione e commercializzazione seguano regimi di qualità, la natura e la derivazione stessa del FBS mantengono livelli di variabilità, anche tra i diversi stock prodotti, che non possono essere eliminati completamente e non possono garantire una esatta riproducibilità degli esperimenti. Inoltre sembra che l'uso di FBS nel terreno di coltura per l'espansione delle cellule destinate al trapianto possa contribuire all'attivazione dei linfociti T e quindi al rigetto. In alcuni modelli murini, l'uso di FBS nell'espansione *ex vivo* di cellule da trapiantare e la reazione del sistema immunitario *in vivo* che ne deriva sono una questione ancora da risolvere (Tonti and Mannello, 2008). Un ulteriore limite è legato ai problemi etici che accompagnano l'utilizzo di animali per la produzione di siero ad uso sperimentale. In ultimo, ma non per questo meno rilevante, i problemi legati alla sicurezza dei prodotti di origine animale. I regimi di controllo qualità delle aziende produttrici non possono infatti azzerare il rischio legato all'origine animale del siero, che potrebbe essere un potenziale vettore per microrganismi patogeni

anche per l'uomo (si stima che il 20-50% del FBS commerciale sia positivo a virus). L'insieme di queste problematiche impedisce l'utilizzo dell'FBS nelle colture cellulari a fini clinici per una possibile terapia cellulare (Van der Valk et al, 2010). Proprio per questi motivi la ricerca si è spostata verso lo studio di terreni totalmente privi di siero e verso l'individuazione di sieri di origine umana come alternativa a quelli animali. In questa prospettiva assumono grande rilevanza i terreni *serum-free*, ovvero terreni privi di siero, ma che prevedono l'aggiunta di *supplements* e fattori di crescita specifici a seconda del tipo cellulare d'interesse. Per facilitare l'utilizzo di questi nuovi terreni è stato creato un unico database interattivo *online*, accessibile gratuitamente, in cui sono contenuti tutti i terreni commerciali disponibili ad oggi ([www.goodcellculture.com](http://www.goodcellculture.com)).

Tra i sieri alternativi di derivazione umana invece particolare attenzione è volta al siero di sangue cordonale (CBS), recuperato in seguito al parto ed estremamente ricco di fattori di crescita. Questo siero è stato già testato su cellule isolate dal midollo osseo e ha portato risultati positivi ed incoraggianti per quanto riguarda crescita, proliferazione e differenziamento cellulare. Un'alternativa al siero umano può essere costituita anche dal lisato piastrinico, derivato della lisi di piastrine umane e ricco di molecole bioattive tra cui proteine di adesione, fattori della coagulazione e i fattori di crescita, come il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita neuronale (NGF) e il *transforming growth factor* (TGF). La capacità del lisato piastrinico di promuovere crescita e differenziamento è stata testata su varie linee cellulari e su culture primarie di cellule mesenchimali da midollo osseo e da cordone ombelicale. I risultati ottenuti fino ad ora dimostrano non solo che il lisato piastrinico costituisce un valido sostituto del siero fetale bovino, ma che è anche capace di aumentare la velocità di proliferazione cellulare (Sankaranarayanan et al, 2011; Phadnis et al, 2006).

## **7.2 Aspetti immunologici**

La medicina rigenerativa e la terapia cellulare si basano su un approccio terapeutico in cui le cellule sono il farmaco e si sfrutta la capacità delle cellule trapiantate di ricostruire un tessuto danneggiato. Questo obiettivo può essere perseguito o sfruttando le capacità differenziali di cellule staminali o progenitori trapiantati, oppure sfruttandone la produzione di fattori di crescita e molecole in grado di sostenere e aiutare le cellule dell'ospite a riparare il danno stesso, ottenendo quindi una sorta di riparazione tissutale endogena spinta dall'azione paracrina di cellule esogene (Fig. 10).



**Fig. 10.** Meccanismi su cui si basa la medicina rigenerativa per riparare tessuti od organi (Regenerative Medicine, 2011).

La terapia cellulare negli ultimi anni sta quindi diventando un'ipotesi sempre più interessante, ma non bisogna dimenticare che parliamo di approcci terapeutici estremamente complessi che devono tener conto di una serie di variabili, nonché di limiti e problematiche che necessitano di ulteriori approfondimenti e che devono essere superati per poter pensare ad applicazioni cliniche concrete. Il primo aspetto da considerare riguarda la sorgente cellulare. La possibilità di una terapia autologa, ossia l'utilizzo di cellule *self* derivate dal ricevente stesso e completamente compatibili sotto il profilo immunitario quindi senza rischio di rigetto, resta la prima scelta rispetto a una terapia allogenica non *self*. L'uso di cellule allogeniche, derivate da un donatore diverso dal ricevente, e la realizzazione di allotrapianti presentano un rischio di rigetto alto e, per quanto si possa cercare di minimizzare questo rischio, le differenze anche minime nei profili immunitari di ricevente e donatore fanno sì che la risposta immunitaria possa sempre essere attivata. In alcuni casi patologici specifici però l'utilizzo di cellule allogeniche è consigliabile e viene preferita ad approcci di tipo autologo. La fine regolazione della risposta immunitaria diventa così un elemento chiave negli approcci di terapia cellulare. Alcuni tipi cellulari tra cui le MSCs e le cellule staminali derivate da placenta, hanno mostrato la capacità di modulare, inibendola, la risposta immunitaria dell'ospite e

hanno spinto a prendere in considerazione il loro uso per realizzare trapianti allogenici. Gli studi sulle capacità immunomodulatorie di queste cellule hanno mostrato un chiaro effetto soppressivo *in vitro*, ma spostandosi ad una visione *in vivo* il panorama diventa più complesso. Studi basati sul trapianto xenogenico di cellule derivate da placenta umana in ratti, maiali e scimmie hanno mostrato la sopravvivenza del trapianto cellulare senza attivazione del sistema immunitario nell'ospite (Bailo et al, 2004; Sankar and Muthusamy, 2003). Questi risultati fanno sperare nella possibilità di usare queste cellule per sviare il rischio di attivazione del sistema immunitario in caso di allo- e xenotrapianti. Tuttavia in uno studio recente cellule derivate da placenta di topo non sono sopravvissute dopo il trapianto sotto capsula renale di modelli murini a causa del rigetto per attivazione del sistema immunitario del ricevente (Prigozhina et al, 2008). In maniera simile diversi studi hanno osservato un rigetto immuno-mediato nei confronti di BM-MSCs murine utilizzate per trapianti allogenici in modelli di topo (Eliopoulos et al, 2005; Tambuyzer et al, 2009; Bergwerf et al, 2009; Ponsaerts et al, 2004). Queste osservazioni, in parte discordanti, portano ad un punto interrogativo sul comportamento delle cellule staminali mesenchimali in caso di allo e xenotrapianti. In questo quadro le capacità immunoregolatore *in vitro* delle cellule staminali derivate da membrane fetali sembrano offrire uno strumento potenzialmente efficace e potrebbe essere interessante arrivare ad utilizzare queste cellule in *trials* clinici per trapianti allogenici nell'uomo. Un limite però viene dal fatto che la maggior parte degli studi *in vivo* realizzati con cellule isolate da placenta hanno utilizzato cellule di derivazione umana per trapianti xenogenici in diversi modelli animali, ma troppo poco si sa circa la sopravvivenza di queste cellule in trapianti allogenici, come ad esempio nel caso dell'uso di cellule di derivazione murina per trapianti allogenici in modelli di topo.



## Scopo del lavoro

La ricerca sulle cellule staminali apre nuove prospettive per approcci di medicina rigenerativa e terapia cellulare. Negli ultimi anni notevole attenzione si è concentrata sulle cellule staminali isolate da placenta e membrane fetali, per la facilità di recupero del materiale di partenza, le limitate implicazioni etiche e le caratteristiche che popolazioni di cellule staminali e progenitori residenti in questi tessuti hanno mostrato. In particolare sembra che a livello dell'epitelio amniotico si concentri una popolazione di cellule (hAECs) con caratteristiche di staminalità e pluripotenza che le avvicinano alle cellule staminali embrionali. Inoltre le cellule epiteliali derivate dalla membrana amniotica hanno suscitato grande interesse anche per le caratteristiche differenziative e immunologiche, che ne fanno un'interessante fonte di cellule per approcci di terapia cellulare. Restano però una serie di limiti tecnici da superare per arrivare ad un'applicazione clinica: l'uso di siero di origine animale nei terreni di coltura e le limitate conoscenze legate alla reazione immunitaria *in vivo*.

Una prima parte di questo lavoro è stata focalizzata sulla verifica delle caratteristiche delle hAECs coltivate in un terreno privo di siero, in confronto a un terreno di coltura classico. Lo studio si è concentrato sull'analisi delle caratteristiche biologiche, immunomodulatorie e differenziative di questa popolazione, con particolare attenzione al differenziamento pancreatico endocrino, per i risvolti che potrebbe avere in clinica come terapia per la patologia diabetica. L'interesse verso le caratteristiche immunomodulatorie mostrate *in vitro* è legato alla possibilità che l'uso di un terreno *serum free* potrebbe ridurre il rischio di rigetto dopo trapianto *in vivo* e avvicinare queste cellule ad un utilizzo concreto in clinica.

Se *in vitro* le proprietà immunoregolatorie delle cellule derivate da membrane fetali sembrano offrire uno strumento potenzialmente efficace per trapianti allogenici nell'uomo, *in vivo* il panorama diventa più complesso. Studi basati sul trapianto xenogenico di cellule derivate da membrane fetali umane in ratti, maiali e scimmie ne hanno mostrato la sopravvivenza senza l'attivazione del sistema immunitario nell'ospite (Bailo et al, 2004; Sankar and Muthusamy, 2003). Tuttavia studi basati sul trapianto di cellule stromali murine in topi immunocompetenti hanno evidenziato fenomeni di rigetto e anche i pochi studi basati sull'allograpianto di cellule da placenta di topo evidenziano rigetti dovuti all'attivazione del sistema immunitario del ricevente (Prigozhina et al, 2008). Queste osservazioni portano ad un punto interrogativo sul reale comportamento delle cellule staminali mesenchimali in caso di allo e xenotrapianti. Un grande limite per queste prove sperimentali deriva dal fatto che la maggior parte degli studi *in vivo* con cellule isolate da membrane fetali hanno utilizzato cellule di derivazione umana per trapianti xenogenici in diversi

modelli animali, ma quasi nulla si sa circa la sopravvivenza di queste cellule in trapianti allogenici, come nel caso di trapianti di cellule di derivazione murina in modelli di topo.

La seconda parte dello studio è focalizzata sulla valutazione delle capacità immunomodulatorie di cellule derivate da membrane fetali di topo (mFMSC). Le caratteristiche biologiche, differenziative e immunomodulatorie *in vitro* delle cellule stromali isolate da membrane fetali di topo sono state analizzate e confrontate con i più studiati fibroblasti embrionali di topo. L'attenzione è stata poi centrata sull'analisi della risposta immunitaria a trapianti di mFMSC a livello del sistema nervoso centrale (CNS) in modelli murini immunocompetenti. La scelta del sito di trapianto deriva dall'interesse specifico legato al potenziale terapeutico per patologie a carico del CNS, ma anche dalla possibilità di analizzare la risposta immunitaria *in loco* verso un trapianto di tipo allogenico in un sito tradizionalmente considerato immunoprivilegiato. Quest'analisi potrebbe quindi chiarire i meccanismi immunitari che vengono attivati in seguito a trapianto allogenico anche nell'uomo, permettendo così di individuare i punti critici per la sopravvivenza cellulare e la riuscita del trapianto.

# **CAPITOLO 1 – Caratterizzazione biologica e funzionale delle cellule epiteliali da membrana amniotica in terreno di coltura standard e in terreno privo di siero.**

## **1. Materiali e Metodi**

### **1.1 Isolamento di cellule epiteliali da membrana amniotica umana (hAECs)**

Tutti i campioni processati sono stati ottenuti previo consenso informato del paziente e in rispetto delle condizioni approvate dal comitato etico scientifico del policlinico Sant'Orsola dell'Università di Bologna.

Placente non patologiche ottenute da parti cesarei, sono state trasferite rapidamente in laboratorio, lavate con PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza) addizionato di penicillina e streptomycina 1% (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 U/ml Streptomycin Pen/Strep, Lonza) ed utilizzate immediatamente. La membrana amniotica è stata separata da quella coriale per semplice trazione meccanica e lembi di membrana (circa 9 cm<sup>2</sup>) sono stati processati per isolarne la componente epiteliale. I frammenti di tessuto sono stati sottoposti ad una prima digestione enzimatica in Trypsina-EDTA 0,25% (Lonza) a 37° per 30 minuti. La fase di digestione enzimatica è stata ripetuta una seconda volta e, per ottenere una sospensione cellulare il più omogenea possibile, le membrane sono state sottoposte a un passaggio su *cell strainer* (100 µm, BD Falcon). La sospensione cellulare così ottenuta è stata neutralizzata con FBS (Fetal Bovine Serum, Lonza) e centrifugata 10 minuti a 1500 rpm. Per ogni isolamento è stata valutata la vitalità cellulare colorando le cellule con Trypan blu e le procedure sperimentali successive sono state realizzate solo su campioni da cui sono state ricavate cellule con vitalità maggiore del 70%. Le cellule sono state piastrate ad una densità di 60-100.000 cellule/cm<sup>2</sup> in terreno di coltura basale e mantenute in incubatore a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>. Dopo 5 giorni sono state eliminate le cellule non aderenti, aspirando il terreno esausto e sostituendolo terreno fresco.

### **1.2 Espansione cellulare in terreno con e senza siero**

Per espansione e mantenimento delle colture cellulari, e per tutte le prove di differenziamento e di immunomodulazione realizzate sulle hAECs, sono stati utilizzati due terreni di coltura in parallelo. Il primo terreno, contenente siero è considerato il terreno di coltura standard per questa popolazione cellulare, mentre il secondo, privo di siero, è un terreno commerciale sviluppato appositamente per

sostenere le colture di cellule epiteliali. In tabella è riportata l'esatta composizione di entrambi i terreni.

<b>A. Terreno ricco di siero - SRM</b>	<b>B. Terreno privo di siero - SFM</b>
<b>DMEM</b> (Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose, Lonza)	<b>Quantum286</b> (PAA The Cell Culture Company)
<b>10% FBS</b> (Fetal Bovine Serum, Lonza)	
<b>10 ng/ml EGF</b> (Epidermal Growth Factor, Sigma-Aldrich)	<b>10 ng/ml EGF</b> (Epidermal Growth Factor, Sigma-Aldrich)

L'andamento delle colture cellulari è stato seguito quotidianamente al microscopio ottico invertito ed tutte le successive prove sperimentali sono state eseguite a 5-7 giorni dall'isolamento, tempo necessario per ottenere colture stabili di hAECs *in vitro*.

### **1.3 Allestimento di colture cellulari tridimensionali *in vitro***

Colture tridimensionali di hAECs sono state allestite seguendo il metodo precedentemente descritto da Debnath e colleghi (Debnath et al , 2003) e sottoposte al successivo differenziamento in senso pancreatico endocrino con protocollo *step-wise*. 100.000 cellule/cm<sup>2</sup> sono state risospese nel rispettivo terreno di coltura, con o senza siero, addizionato di EGF 10 ng/ml e di 2,5% Matrigel a ridotta concentrazione di fattori di crescita (*ECM gel Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma*, Sigma-Aldrich). Le cellule così risospese sono state piastrate in *chamber slides* (da 8 wells) su uno strato composto da Matrigel 100% di circa 1mm di spessore. Dopo 4 giorni in coltura si osserva la formazione di strutture sferoidali inglobati nello strato gelatinoso di matrice. Il terreno è stato cambiato ogni 3 giorni e queste strutture tridimensionali sono state sottoposte al protocollo di differenziamento pancreatico endocrino.

### **1.4 Analisi del potenziale proliferativo**

Per valutare la capacità proliferativa delle hAECs è stata allestita una curva di crescita utilizzando cellule mantenute nei due diversi terreni di coltura. hAECs appena isolate sono state seminate a densità pari a 60.000 cellule/cm<sup>2</sup> in piastre da 24 pozzetti e lasciate aderire alla plastica. A 5 giorni dall'isolamento il terreno di coltura è stato addizionato con 10% di Alamar Blue, un colorante che reagisce in risposta alla riduzione chimica del terreno rilasciando una segnale fluorescente. In base ai valori di fluorescenza emessa è possibile determinare i livelli di proliferazione delle hAECs nei due diversi terreni e creare quindi una curva di crescita. Le letture dei valori di fluorescenza sono state effettuate a giorni alternati, per 15 giorni, tramite lettore di piastra Victor2 Multilabel Counter

(Perkin Elmer) e i valori sono stati graficati come unità arbitrarie di fluorescenza (*AU fluorescence*) in relazione al tempo trascorso in coltura.

### **1.5 Caratterizzazione immunofenotipica**

La caratterizzazione immunofenotipica delle cellule isolate è stata realizzata mediante saggio al citofluorimetro. Le cellule in coltura sono state staccate tramite trattamento proteolitico con una soluzione di Tripsina-EDTA 0,25% per 15 minuti a 37° C e subito fissate utilizzando un apposito kit di fissazione (*Intraprep*, Beckman Coulter ) secondo le indicazioni fornite dal produttore. In primo luogo è stata effettuata una caratterizzazione immunofenotipica ad ampio spettro, per valutare il pannello di marcatori espressi dalle hAEC in confronto a quanto precedentemente osservato per le cellule mesenchimali isolate dalle membrane fetali umane, come descritto in precedenza (Roda et al, 2009). Le hAECs sono state quindi marcate per 45 minuti in ghiaccio al buio utilizzando 1 µg dei seguenti anticorpi monoclonali: anti-CD29, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-CD166, anti-PanCK, anti-SSEA4, anti-Oct4.

Successivamente è stata effettuata una caratterizzazione immunofenotipica limitata ad alcuni soli marcatori di principale interesse per poter confrontarne l'espressione in cellule mantenute nei due diversi terreni di coltura, con e senza siero. L'analisi è stata effettuata utilizzando i seguenti anticorpi: mAb anti CD105, mAb anti panCK, mAb anti SSEA4, mAb anti Oct 4 (Immunotech). Gli anticorpi primari possono essere coniugati con tracciante fluorescente (FITC o PE) o accoppiati ad un anticorpo secondario sempre con tracciante fluorescente (FITC o PE) a seconda della disponibilità. Per l'analisi citofluorimetrica 10<sup>4</sup> eventi per saggio sono stati acquisiti tramite FACS Navio FC (Beckman-Coulter) e l'analisi eseguita con il software Kaluza FC Analysis.

### **1.6 Analisi molecolare di espressione dei geni di staminalità**

La valutazione dell'espressione genica dei marcatori di staminalità è stata condotta tramite real time PCR su hAECs in entrambi i terreni e a passaggi precoci in coltura. Per prima cosa le cellule isolate e mantenute nei due diversi mezzi di coltura sono state lisate in Trizol (Invitrogen) e l'RNA è stato estratto seguendo le indicazioni del produttore. In seguito l'RNA è stato quantificato tramite lettura allo spettrofotometro (*Beckman Coulter DU 700 Series UV/Vis*) settato per la lettura specifica dell'RNA. La sintesi del cDNA è stata realizzata partendo da 1-2 µg di RNA totale e utilizzando RETROscript<sup>®</sup> First Strand Synthesis Kit e oligo dT (Ambion). L'amplificazione del cDNA target è stata eseguita con StepOne Real-Time System (Applied Biosystems) con KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST Master Mix (KAPA Biosystems). I dati sono stati normalizzati sul controllo interno dato dalla  $\beta$ actina (ACTB). Le sequenze dei primer utilizzati sono elencati in tabella.

Gene	Primer F	Primer R
<b>Ki67</b>	TCCTAATACGCCTCTCAAAG	GATTCTGAACCTGACTCTTG
<b>OCT4a</b>	AGAGAAAGCGAACCAGTATC	TTACAGAACCACACTCGG
<b>SOX</b>	CAGACTTCACATGTCCAG	CTCCCATTTCCCTCGTT
<b>Nanog</b>	AGAAATACCTCAGCCTCCAG	CGTCACACCATTGCTATTCTT
<b>b-ACTIN</b>	CCT TCTACAATGAGCTGCG	CCTGGATAGCAACGTACATG

## 1.7 Analisi del potenziale differenziativo *in vitro*

### 1.7.1 Differenziamento osteogenico

Per valutare il potenziale differenziativo delle hAECs isolate e mantenute in coltura nei due terreni in esame, le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 10.000/cm<sup>2</sup> in piastre da 6 pozzetti e lasciate aderire alla plastica delle piastre di coltura. Il terreno basale è stato poi sostituito da uno specifico terreno di induzione la cui composizione è indicata in tabella.

A. Terreno ricco di siero - SRM	B. Terreno privo di siero - SFM
<b>DMEM</b> (Dulbecco's modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose, Lonza)	<b>Q286</b> (PAA The Cell Culture Company)
<b>FBS 15%</b> (Fetal Bovine Serum, Lonza)	
	<b>EGF 10 ng/ml</b> (Epidermal Growth Factor, Sigma-Aldrich)
<b>Dexametasone 10<sup>-8</sup> M</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Dexametasone 10<sup>-8</sup> M</b> (Sigma-Aldrich)
<b>Ac. Ascorbico 50 µg/mL</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Ac. Ascorbico 50 µg/mL</b> (Sigma-Aldrich)
<b>Beta glicerofosfato 3,5 µM</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Beta glicerofosfato 3,5 µM</b> (Sigma-Aldrich)

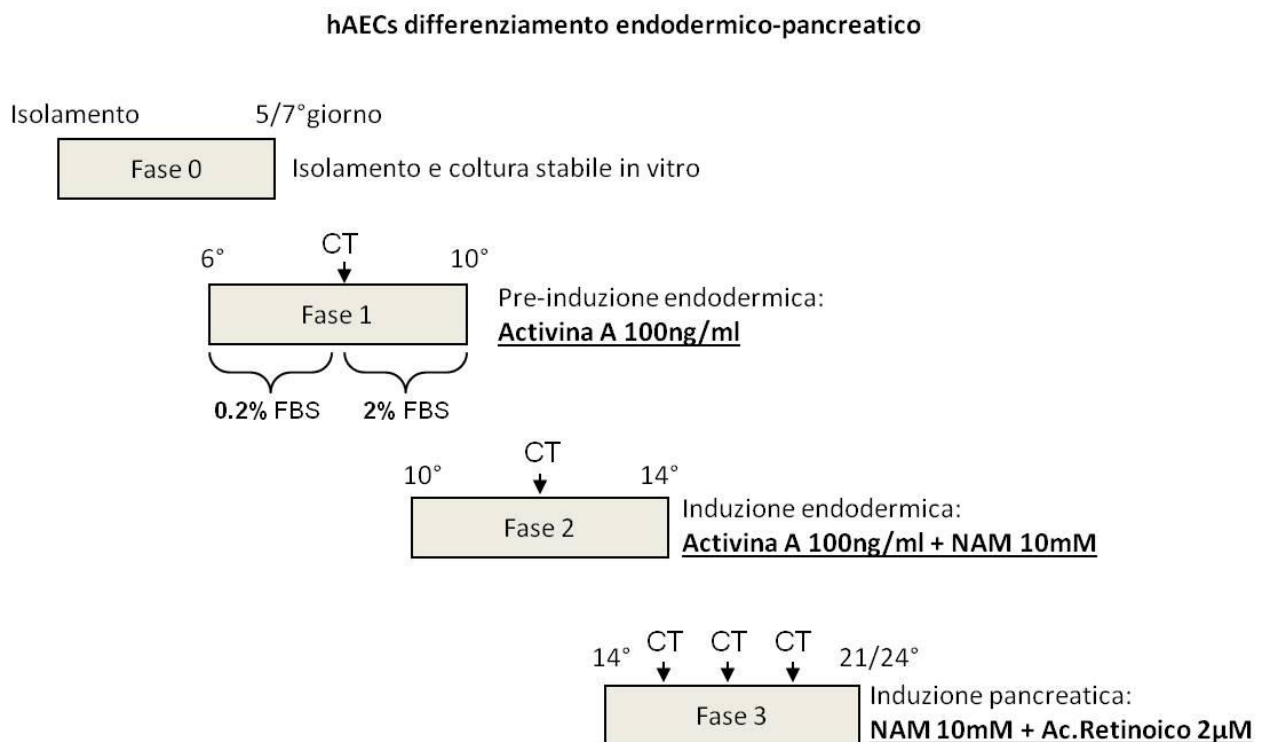
I controlli sono costituiti da hAECs mantenute in coltura, parallelamente alle cellule indotte, ma utilizzando il rispettivo terreno di coltura basale. L'induzione procede per tre settimane con cambi di terreno ogni 3 giorni.

Al termine dell'induzione la parte di cellule destinate alla valutazione di espressione genica dei marcatori di differenziamento sono stati trattati con TriZol (Invitrogen) per la successiva estrazione dell'RNA e le restanti cellule sono state fissate per la successiva valutazione istologica del differenziamento.

### 1.7.2 Differenziamento pancreatico endocrino

Il potenziale differenziativo ad ampio spettro delle hAECs è stato dimostrato in letteratura (Miki et al, 2005; Ilancheran et al, 2007). Di particolare interesse risulta essere la capacità di intraprendere il

commissionamento in senso pancreatico endocrino. hAECs, isolate ed espanse nei due terreni di coltura, sono state piastrate ad una densità di 60.000 cellule/cm<sup>2</sup> e sottoposte ad un protocollo di differenziamento composto da 3 fasi. La prima è costituita da un pretrattamento con Activina A, per stimolare un primo indirizzamento in senso pre-endodermico, seguita da una fase di trattamento endodermico vero e proprio con Nicotinamide, la quale è stata accompagnata nell'ultima fase dall'aggiunta dell'Acido Retinoico, per spingere il differenziamento in senso pancreatico endocrino. Il protocollo di differenziamento è schematizzato in Figura 11.



**Fig. 11.** Schema del protocollo di differenziamento *step-wise*. CT: cambio di terreno esausto con terreno fresco.

I terreni utilizzati nelle diverse fasi del differenziamento sono mostrati in tabella.

*FASE 1 – Induzione pre-endodermica*

<b>A. Terreno ricco di siero - SRM</b>	<b>B. Terreno privo di siero - SFM</b>
<b>DMEM</b> (Dulbecco's modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose, Lonza)	<b>Q286</b> (PAA The Cell Culture Company)
<b>FBS 0,2 e 2%</b> (Fetal Bovine Serum, Lonza)	
<b>Activina A 100 ng/ml</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Activina A 100 ng/ml</b> (Sigma-Aldrich)

*FASE 2 – Induzione endodermico-pancreatica*

<b>A. Terreno ricco di siero - SRM</b>	<b>B. Terreno privo di siero - SFM</b>
<b>DMEM</b> (Dulbecco's modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose, Lonza)	<b>Q286</b> (PAA The Cell Culture Company)
<b>FBS 2%</b> (Fetal Bovine Serum, Lonza)	
<b>Activina 100n g/ml</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Activina 100 ng/ml</b> (Sigma-Aldrich)
<b>Nicotinamide 10 mM</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Nicotinamide 10 mM</b> (Sigma-Aldrich)

*FASE 3 – Induzione pancreatica endocrina*

<b>A. Terreno ricco di siero - SRM</b>	<b>B. Terreno privo di siero - SFM</b>
<b>DMEM</b> (Dulbecco's modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose, Lonza)	<b>Q286</b> (PAA The Cell Culture Company)
<b>FBS 2%</b> (Fetal Bovine Serum, Lonza)	
<b>Nicotinamide 10 mM</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Nicotinamide 10 mM</b> (Sigma-Aldrich)
<b>Acido Retinoico 2 µM</b> (Sigma-Aldrich)	<b>Acido Retinoico 2µM</b> (Sigma-Aldrich)

I controlli sono costituiti da hAEC mantenute nel loro rispettivo terreno di coltura basale; al termine delle 3 settimane di induzione le cellule sono state analizzate per la verifica dell'avvenuto differenziamento.

### **1.8 Analisi molecolare del differenziamento in senso osteogenico e pancreatico endocrino**

L'esito di differenziamento in senso osteogenico e pancreatico endocrino è stata analizzato valutando l'aumento di espressione genica per alcuni geni caratteristici dei commissionamenti presi in esame. Le cellule destinate all'analisi molecolare sono state trattate con Trizol, per procedere alla successiva estrazione di RNA, e analizzati in real time PCR, secondo il protocollo descritto in precedenza e utilizzando le seguenti coppie di primers.

*Geni di differenziamento osteogenico:*

<b>Gene</b>	<b>Primer F</b>	<b>Primer R</b>
<b>Procollagene 1</b>	CCC TGG AAA GAA TGG AGA TG	ATC CAA ACC ACT GAA ACC TC
<b>Runx2</b>	AGT TAC AGT AGA TGG ACC TCG	GGA CAC CTA CTC TCA TAC TGG
<b>Osteocalcina</b>	GAA AGC CGA TGT GGT CAG	GAA AGC CGA TGT GGT CAG



### Geni di differenziamento pancreatico endocrino:

Gene	Primer F	Primer R
<b>Pdx1</b>	GGA TGA AGT CTA CCA AAG CTC	AAC TCC TTC TCC AGC TCT AG
<b>MafA</b>	GAA GTG CCA ACT CCA GAG	CGT ATT TCT CCT TGT ACA GGT C
<b>Nkx2.2</b>	GGC CTT CAG TAC TCC CTG	GTC TCC TTG TCA TTG TCC G
<b>Glucochinasi</b>	TGG TGA AGG TGG GAG AAG	TGC ACT CAG AGA TGT AGT CG
<b>Insulina</b>	GGG AAC GAG GCT TCT TC	ACA ATG CCA CGC TTC TG

#### 1.9 Valutazione istologica del differenziamento osteogenico

Il differenziamento in senso osteogenico è stato analizzato tramite colorazione Alizarin Red (Sigma-Aldrich) in grado di rivelare la formazione di depositi di calcio. Le cellule stimulate in senso osteogenico e i rispettivi controlli non trattati sono stati fissate in formalina 4% e colorati con una soluzione di Alizarin 1% per 20 minuti, lavati con dH<sub>2</sub>O, lasciati asciugare e osservati al microscopio ottico.

#### 1.10 Analisi immunofenotipica del differenziamento pancreatico su colture cellulari classiche bidimensionali

L'esito del differenziamento pancreatico endocrino è stato analizzato anche in citofluorimetria. Al termine del protocollo di induzione al differenziamento le cellule sono state recuperate, tramite trattamento proteolitico con Tripsina-EDTA 0,25%, e marcate con anticorpo monoclonale anti-Insulina (Immunotech) e anti-glucagone (Immunotech). I dati sono stati acquisiti tramite FACS Navio FC (Beckman-Coulter) e analizzati tramite software Kaluza FC Analysis.

#### 1.11 Analisi in immunofluorescenza del differenziamento pancreatico su colture tridimensionali

Gli sferoidi ottenuti nelle colture tridimensionali sono stati fissati in paraformaldeide 2% , 20 minuti a temperatura ambiente, lavati con PBS e permeabilizzato con 0,5% Triton X-100 (Sigma –Aldrich) in PBS per 10 minuti. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS, è stato effettuato il blocco dei siti antigenici aspecifici grazie a una *blocking solution* composta da 5% goat serum (Vector Laboratories), 0,2% Triton X-100 e 0,1% BSA (Sigma-Aldrich). La stessa soluzione è stata preparata fresca ed utilizzata per diluire l' anticorpo primario e secondario. La reazione con l'anticorpo primario è stata condotta a 8°C overnight e il giorno successivo l'anticorpo secondario è stato aggiunto e lasciato reagire per 50 minuti a temperatura ambiente. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi e relative diluizioni: mouse anti-insulina 1:100 (Abcam ab46707); rabbit anti-glucagone (Abcam ab8055); rabbit anti-C-peptide 1:100 (Cell Signalling #4593). Come anticorpi

secondari sono stati utilizzati : goat anti-mouse 1:200 (DyLight 594 Jackson Immuno Research Labs.); goat anti-rabbit 1:400 (Alexa Fluor 488, Molecular Probes), goat anti-rabbit 1:200 (DyLight 594, Thermo Scientific). I nuclei sono stato colorati con Fluoroshield+DAPI (Sigma) e i campioni sono stati osservati al microscopio confocale (Leica TCS SP2). Le immagini sono state acquisite e processate tramite Leica Confocal Software.

## **1.12 Analisi delle capacità immunomodulatorie *in vitro***

### ***1.12.1 Effetto di hAEC sulla proliferazione di cellule mononucleate attivate – Analisi del ciclo cellulare***

Per valutare le proprietà immunomodulatorie delle hAECs queste ultime sono state seminate a densità di 60.000 cellule per cm<sup>2</sup> in piastre 6 wells nei due terreni di interesse, con e senza FBS. Una volta ottenuta una coltura stabile *in vitro*, sono state allestite co-culture di hAECs e cellule mononucleate (PBMCs) umane. Le PBMCs sono state isolate da sangue periferico tramite stratificazione su gradiente di densità (Ficoll Histopaque 1.077, Sigma-Aldrich) e seminate in RPMI 10% FBS (Lonza) in quantità pari a  $2 \times 10^6$  cellule per pozzetto in presenza di hAEC. L'attivazione delle PBMCs è stata ottenuta aggiungendo 5 µg/ml di Lectina PHA (Sigma-Aldrich), molecola con azione mitogena sui linfociti. Le co-culture così allestite sono state mantenute in incubatore per 72h per poi valutare la percentuale di PBMCs nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Al termine dell'incubazione, le PBMCs sono state raccolte, fissate con etanolo 70% a 4°C, e in seguito marcate con propidio ioduro per procedere con l'analisi sul ciclo cellulare tramite lettura al citofluorimetro. Come controllo negativo sono state allestite colture di sole PBMCs non stimolate e, come controllo positivo, colture di PBMCs stimolate con PHA, ma in assenza di hAECs.

### ***1.12.2 Espressione dell'antigene HLA-G su hAECs in co-cultura con cellule mononucleate attivate***

Per completare il quadro di valutazione sulle proprietà immunomodulatorie delle hAECs è stata analizzata l'espressione dell'antigene HLA-G, molecola coinvolta nel sistema di regolazione della risposta immunitaria. Al termine delle 72h di incubazione hAECs, mantenute in co-cultura con PBMCs attivate o in coltura classica in assenza di PBMCs, sono state recuperate per la valutazione in citofluorimetria dell'espressione di HLA-G. Per l'analisi di espressione dell'antigene HLA-G è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-HLA-G-FITC e l'espressione è stata valutata tramite FACS Navio FC (Beckman-Coulter) e i dati elaborati con software Kaluza FC Analysis.

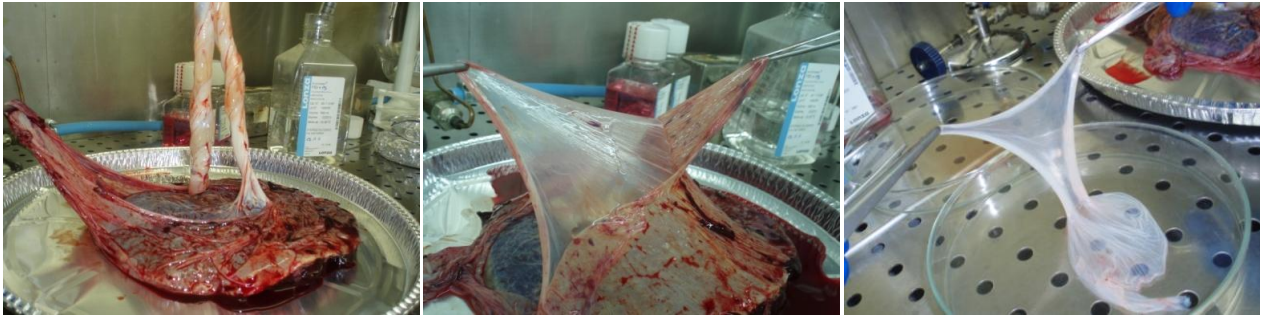
### **1.13 Analisi statistica**

Il T test di Student accoppiato è stato utilizzato per l'analisi statistica dell'espressione genica valutata in real time PCR e per valutare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare per gli esperimenti di immunomodulazione. Per tutti i confronti effettuati il valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## 2. Risultati

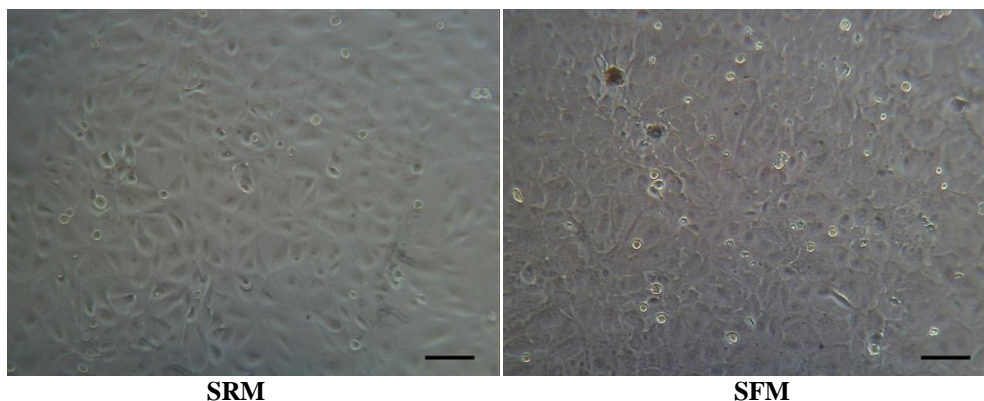
### 2.1 Isolamento di hAEC e analisi della capacità proliferativa

La membrana amniotica è stata separata dal corion e piccoli lembi di circa 9 cm<sup>2</sup> sono stati sottoposti a digestione enzimatica in tripsina. Questo protocollo ha permesso di isolare le cellule dello strato epiteliale della membrana amniotica (Fig.12).



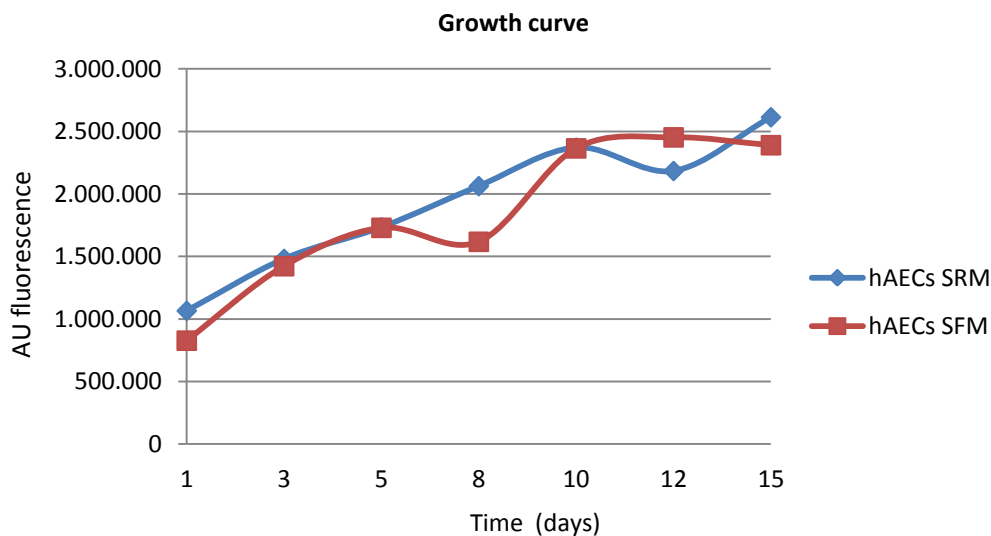
**Fig. 12.** Da sinistra a destra: placenta a termine appena trasferita in laboratorio, la fase di separazione di corion e amnios e un lembo di membrana amniotica prima della digestione enzimatica.

E' stato possibile allestire colture stabili *in vitro* di cellule epiteliali da ciascun campione di membrana amniotica che all'isolamento abbia mostrato una vitalità cellulare maggiore del 70%. La scelta di un valore soglia di vitalità è stata fatta per cercare di limitare le oscillazioni nell'esito dell'isolamento, che sono legate anche alla variabilità biologica intrinseca del tessuto di partenza. Le cellule aderiscono alla plastica in 2-3 giorni e mostrano in coltura una morfologia epiteliale classica con cellule poligonali che crescono a stretto contatto tra loro. La natura epiteliale di queste cellule fa sì che esse crescano di preferenza in strutture che possiamo definire "ad isola", ovvero zone caratterizzate da un'alta densità cellulare, con cellule a stretto contatto tra loro, e con un maggior numero di mitosi e di conseguenza un tasso di proliferazione maggiore. Come mostrato dall'immagine delle hAECs in coltura non vi sono differenze morfologiche tra le cellule isolate e mantenute in terreno ricco di siero (SRM) e quelle in terreno privo di siero (SFM) (Fig. 13).



**Fig. 13.** hAECs in coltura in terreno con (SRM) e senza (SFM) siero. Scala: 50µm.

La velocità di crescita di queste cellule non è particolarmente elevata e la loro origine epiteliale fa sì che esse risentano meno del livello di confluenza in fiasca rispetto alle cellule derivate dallo strato mesenchimale delle membrane fetali. Le hAECs infatti tendono a proliferare anche una volta che il monostrato cellulare ha riempito l'intera superficie di crescita disponibile. Dal grafico relativo alla curva di crescita si evince che la proliferazione delle hAECs non segue l'andamento esponenziale tipico delle cellule derivate dallo strato mesenchimale di membrana amniotica e ampiamente descritto in letteratura (Alviano et al 2007, Bilic 2008), confermando che le hAECs presentano un tasso di proliferazione più lento rispetto alle cellule di derivazione mesenchimale. Inoltre il grafico per la valutazione della crescita cellulare, condotta per 15 giorni, non evidenzia differenze significative per il tasso di proliferazione delle hAECs cresciute nei due terreni di coltura in esame (Fig. 14).

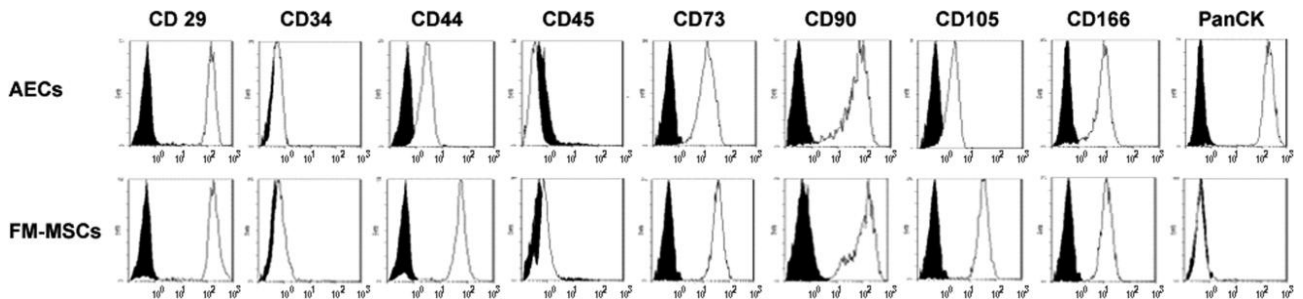


**Fig. 14.** Curva di crescita per hAECs cresciute in SRM e in SFM. Il grafico mostra i valori di fluorescenza restituiti dall'Alamar blue in relazione alla riduzione chimica del terreno di coltura e quindi alla proliferazione cellulare. In ascissa il tempo espresso in giorni e in ordinata la fluorescenza espressa come unità arbitrarie di fluorescenza (AU fluorescence).

## 2.2 Caratterizzazione immunofenotipica

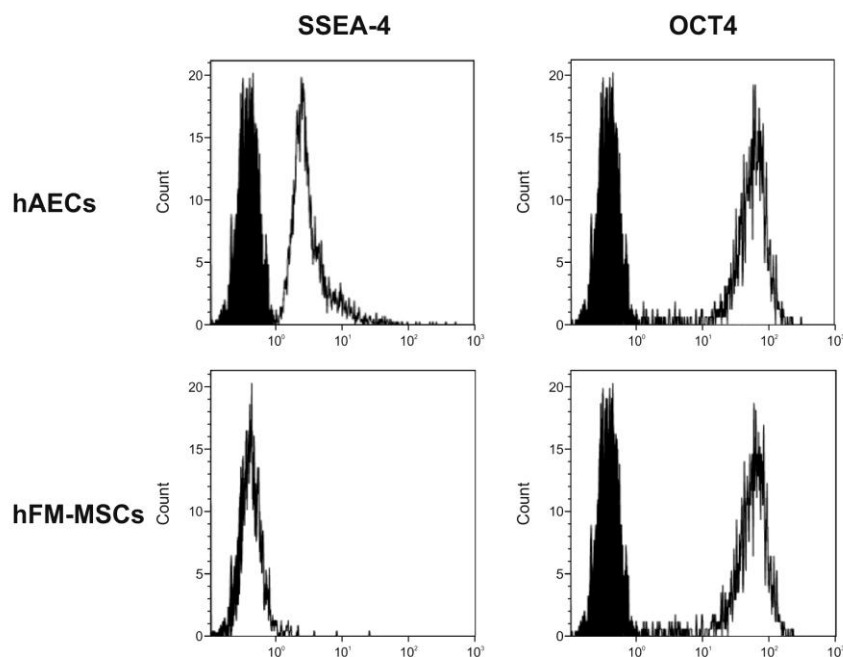
Le popolazioni cellulari isolate sono state successivamente caratterizzate immunofenotipicamente tramite analisi al citofluorimetro. Le hAECs mantenute in terreno di coltura standard contenente siero sono state inizialmente analizzate per un confronto con le cellule mesenchimali isolate da membrane fetali per evidenziare le differenze tra le due popolazioni. La Figura 15 mostra come hAECs e hFM-MSCs mostrino gli stessi livelli di espressione per gli antigeni CD29, CD90 e CD166, mentre entrambe le popolazioni risultano negative per l'espressione dei marcatori

empopoietici classici, CD34 e CD45. Inoltre le hAECs mostrano un'espressione inferiore rispetto alle hFM-MSCs per CD44, CD73, e CD105, mentre l'espressione di citocheratine (panCK) è positiva ed esclusiva della popolazione epiteliale.



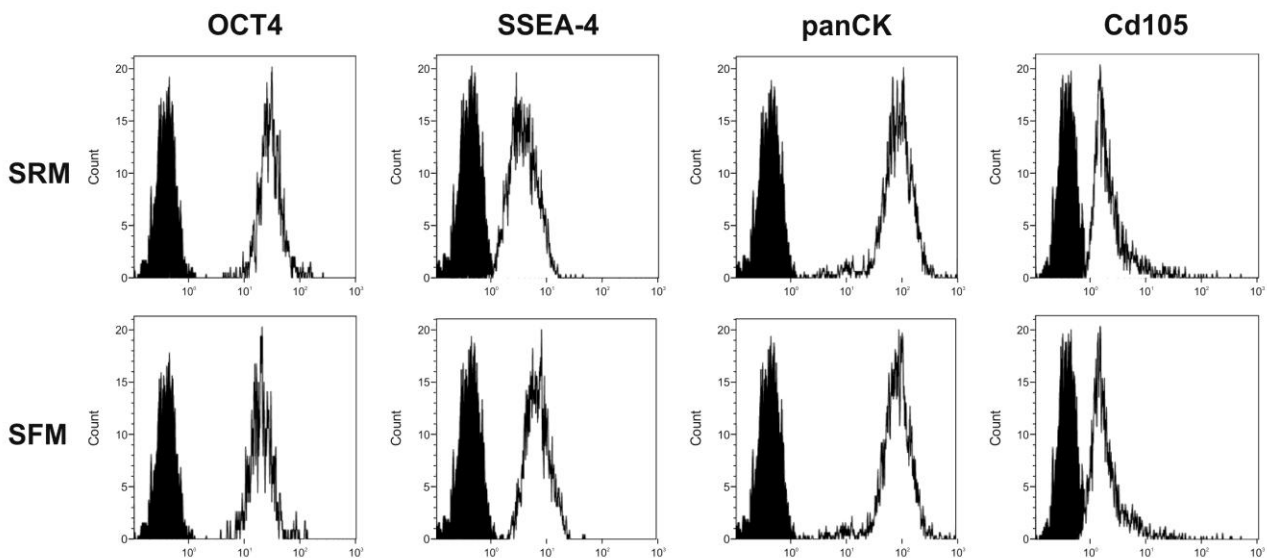
**Fig. 15.** Immunfenotipo a confronto. Il pannello di marcatori analizzati in citofluorimetria evidenzia differenze e analogie di espressione antigenica tra hAECs e hFM-MSCs. Per ogni grafico: gli istogrammi neri indicano il controllo isotipico dell'anticorpo; gli istogrammi bianchi: il livello di espressione per ciascun antigene di interesse (Roda et al, 2009).

Sono stati analizzati anche i livelli di espressione per Oct4, gene *marker* delle cellule staminali pluripotenti, che risulta espresso da entrambe le popolazioni cellulari, e per SSEA-4, antigene di superficie caratteristico delle cellule staminali embrionali, che viene espresso dalle hAECs, ma non dalle hFM-MSCs (Fig. 16).



**Fig. 16.** Analisi in citofluorimetria per l' espressione di Oct4 e SSEA4 tra hAECs e hFM-MSCs. Istogrammi neri: controllo isotipico dell'anticorpo; istogrammi bianchi: livello di espressione dei marcatori di interesse per le popolazioni cellulari in analisi.

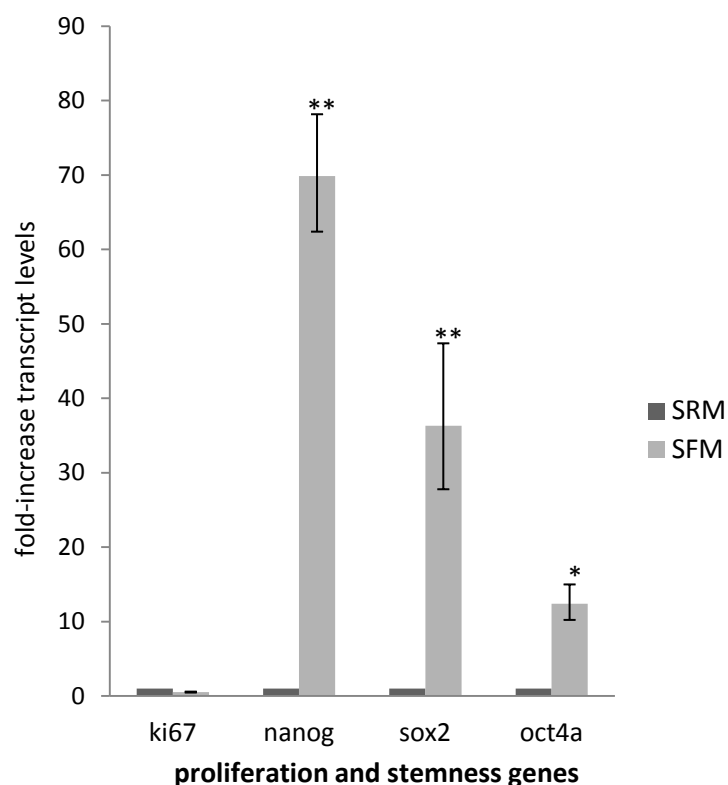
Sulla base di questa prima caratterizzazione realizzata su hAECs mantenute in terreno standard contenente siero, è stata realizzata una caratterizzazione su hAECs isolate e mantenute in terreno con (SRM) e senza siero (SFM), scegliendo un pannello di marcatori ritenuti maggiormente rappresentativi. In Figura 17 si può notare infatti che l'espressione dei marcatori in esame non differisce nei due terreni di coltura utilizzati; l'espressione di CD105, panCK, SSEA4 e Oct4, resta infatti positiva ed invariata per le popolazioni cellulari cresciute nei due terreni di interesse.



**Fig.17.** Immunofenotipi a confronto. La figura mostra l'espressione di alcuni marcatori di maggior interesse per hAECs isolate e mantenute in terreno con (SRM) e senza siero fetale bovino (SFM). Istogrammi neri: controllo isotipico dell'anticorpo; istogrammi bianchi: espressione di ogni marcatore valutato per hAECs. I grafici di citofluorimetria mostrano chiaramente che i due terreni diversi non spingono verso una maggior o minor espressione di marcatori di staminalità e pluripotenza (Oct4 e SSEA4) e non alterano nemmeno l'espressione delle citocheratine (panCK), marcatore tipico delle cellule di origine epiteliale, nè del CD105, marcatore mesenchimale classico.

### 2.3 Analisi molecolare di espressione marcatori staminalità e proliferazione

Il livello di espressione di alcuni geni marcatori di staminalità e proliferazione cellulare è stato valutato tramite real time PCR, su RNA estratto da hAECs mantenute in terreno con (SRM) e privo di siero (SFM). Il grafico (Fig. 17) mostra una maggiore espressione per i geni di staminalità (Nanog, Sox2 e Oct4) nelle cellule mantenute in terreno privo di siero, mentre l'espressione di Ki67, marcatore di proliferazione cellulare, appare leggermente ridotta per le cellule mantenute in terreno in assenza di siero.



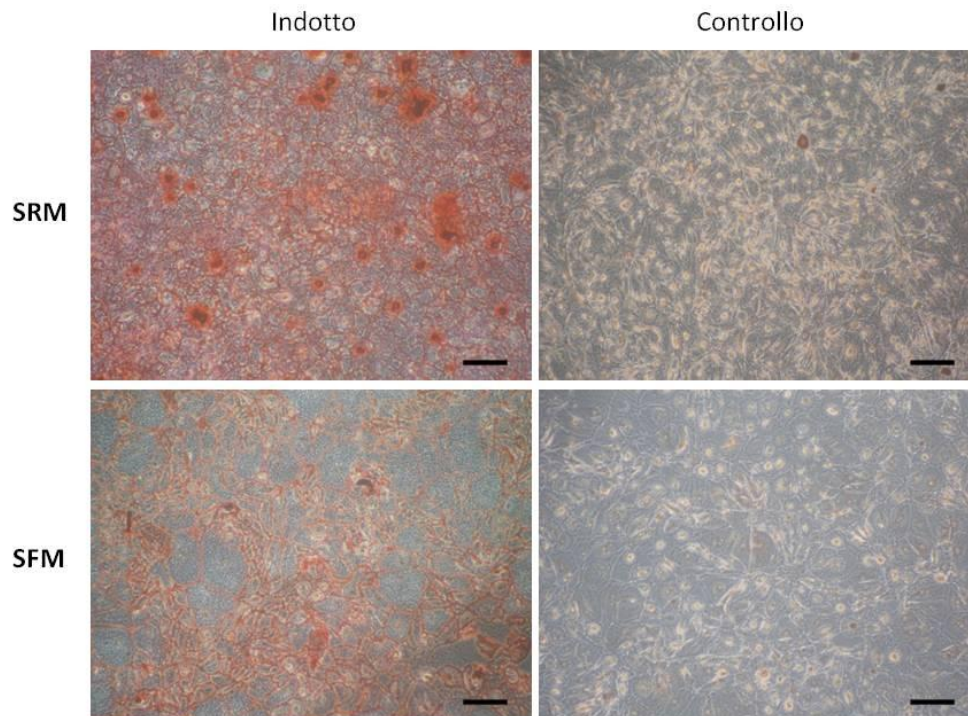
**Fig. 18.** Pannello di espressione molecolare per geni di proliferazione e staminalità. I dati sono graficati come variazione di espressione dei trascritti in relazione ai livelli di espressione nelle cellule cresciute in terreno con siero (SRM). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

## 2.4 Analisi del potenziale differenziativo *in vitro*

### 2.4.1 Differenziamento osteogenico

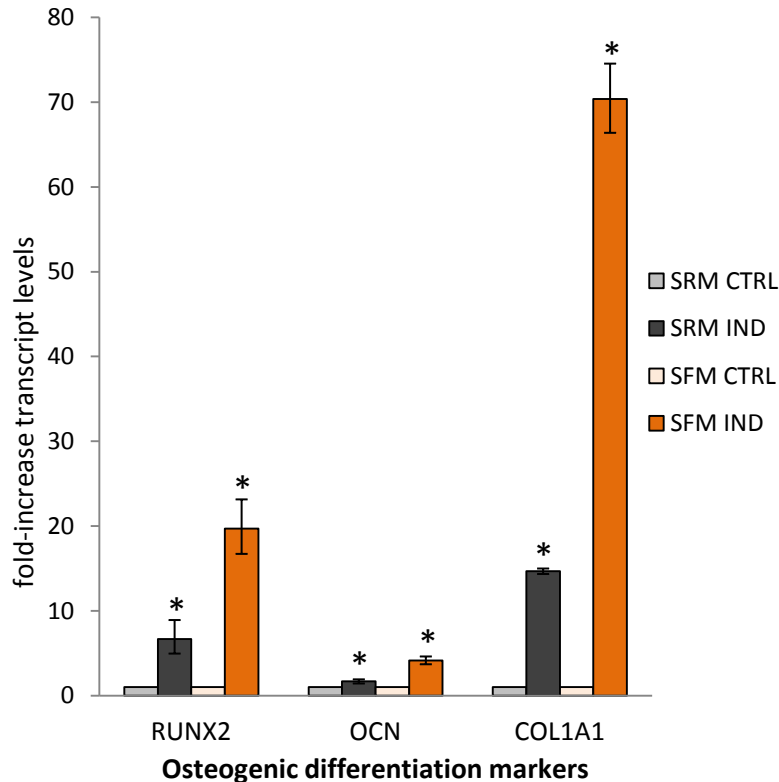
L'analisi del potenziale differenziativo delle hAECs è stato analizzato prendendo in considerazione in primo luogo il differenziamento in senso osteogenico. Questo è considerato un commissionamento cellulare classico, ampiamente studiato e verificato in letteratura anche per le cellule epiteliali della membrana amniotica (Diaz-Prado 2010; Lindenmair 2010). La verifica dell'avvenuto differenziamento è stata realizzata tramite una colorazione istologica classica con Alizarin Red, colorante che colora in rosso i depositi di calcio. Il pannello di immagini in Figura 19 mostra la colorazione effettuata su cellule indotte e non indotte in senso osteogenico. L'induzione è stata condotta in parallelo per le colture cellulari in entrambi i terreni in esame. Le immagini mostrano un'alta percentuale di depositi di calcio nelle cellule stimulate, sia per il terreno contenente siero (SRM) che per quello privo di siero (SFM).





**Fig. 19.** Differenziamento osteogenico. Le immagini mostrano chiaramente la presenza di depositi di calcio (in rosso) nelle cellule stimolante in senso osteogenico, assenti invece nelle colture di controllo non stimolate. Scala = 50  $\mu$ m.

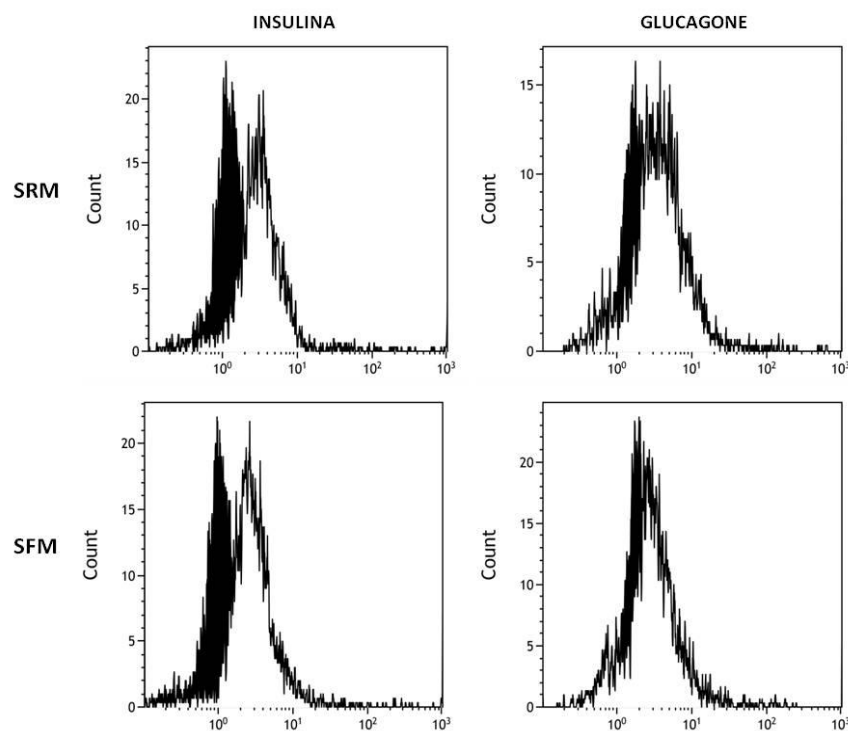
La capacità delle hAEC di intraprendere il commissionamento in senso osteogenico è stata valutata analizzando anche in real time PCR l'espressione di alcuni geni *makers* specifici di questo differenziamento. I grafici in Figura 20 indicano un aumento significativo per l'espressione di Osteocalcina, Runx2 e ProcollageneI nei campioni indotti sia per cellule mantenute in SRM che per cellule mantenute in SFM.



**Fig. 20.** Analisi di espressione per i geni *markers* di differenziamento osteogenico. I dati sono graficati come variazione di espressione dei trascritti in relazione ai livelli di espressione nelle cellule di controllo non stimolate. \*  $p < 0,05$ .

#### 2.4.2 Differenziamento pancreatico su colture bidimensionali classiche

Il differenziamento in senso pancreatico endocrino assume particolare interesse per il possibile risvolto che potrebbe avere in ambito clinico. In letteratura vi sono evidenze riguardo la capacità delle hAECs di intraprendere un commissionamento in senso pancreatico endocrino, ma ancora non vi è un protocollo univoco e ben definito che possa essere utilizzato a tale scopo. Il protocollo *step-wise* da noi utilizzato prevede un'iniziale pre induzione in senso endodermico, che ha l'obiettivo di spingere le hAECs ad assumere caratteristiche endodermiche che le dovrebbero rendere più recettive alla successiva spinta verso un commissionamento pancreatico endocrino vero e proprio. L'analisi del differenziamento pancreatico è stata condotta valutando in citofluorimetria l'espressione di insulina e glucagone, due marcatori di differenziamento pancreatico endocrino. I grafici in Figura 21 mostrano l'espressione di entrambi i marcatori per le hAECs nei terreni in presenza e in assenza di siero. Dai grafici risulta chiaro che il protocollo di induzione porta ad un aumento, pur limitato, dell'espressione di insulina, mentre non porta alcun aumento nei livelli di espressione di glucagone.



**Fig. 21.** Analisi in citofluorimetria del differenziamento pancreatico endocrino. I grafici mostrano i livelli di espressione di insulina e glucagone per le cellule stimulate a differenziare in senso pancreatico endocrino (istogrammi bianchi) e per le cellule di controllo mantenute nel loro rispettivo terreno di coltura basale (istogrammi neri). Per le cellule mantenute in terreno con (SRM) e senza (SFM) siero l'espressione di insulina sembra aumentare in seguito all'induzione al differenziamento, mentre i livelli di glucagone non variano.

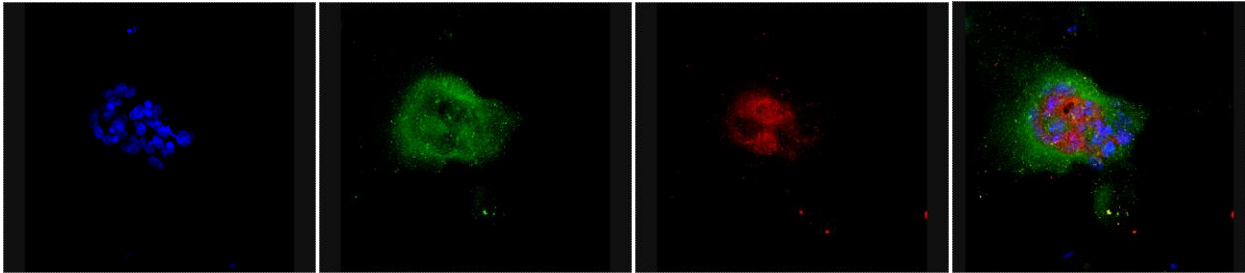
Successivamente all'analisi di espressione proteica è stata condotta anche una valutazione dell'espressione genica, ponendo attenzione ad alcuni geni coinvolti nella fase precoce e in quella terminale del differenziamento pancreatico endocrino (Pdx1, Nkx 2.2, MafA, Glucochinasi e Insulina). L'analisi è stata condotta in real time PCR su hAECs stimulate e non in senso pancreatico, sia per il terreno contenente siero che per quello privo di esso, ma per ogni condizione non è stato evidenziato alcun aumento significativo nell'espressione genica, per tutti i geni valutati.

#### **2.4.3 Valutazione del differenziamento pancreatico endocrino su colture tridimensionali**

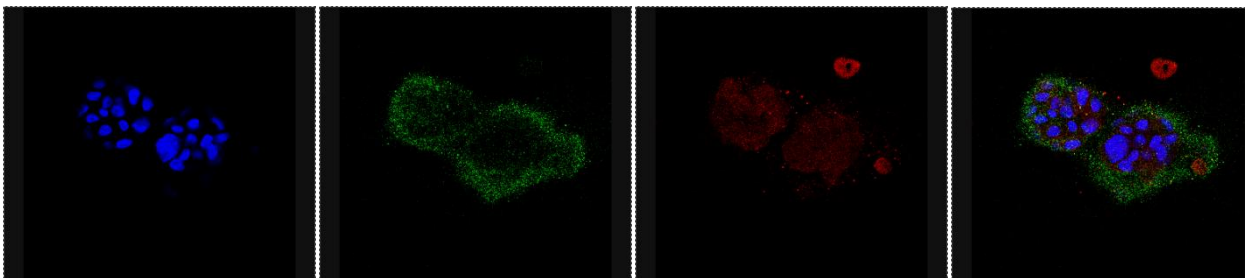
La scelta di allestire colture cellulari tridimensionali da sottoporre al differenziamento pancreatico *step-wise* è legata alla possibilità di ricreare *in vitro* un microambiente il più simile possibile all'architettura delle isole pancreatiche *in vivo*. Le hAECs, seminate in una soluzione di terreno e Matrigel, creano strutture sferoidali in cui le cellule si trovano a contatto fra loro e completamente immerse in una matrice, che partecipa essa stessa allo stimolo differenziativo. Le colture tridimensionali sono state sottoposte a differenziamento pancreatico *step-wise* e l'esito del

protocollo di differenziamento è stato analizzato valutando l'espressione di insulina e glucagone in immunofluorescenza. Già a una prima osservazione degli sferoidi in coltura si nota che i campioni indotti risultano più compatti e di dimensioni maggiori rispetto ai controlli non stimolati. La figura 22 mostra i risultati delle prove di immunofluorescenza che evidenziano un notevole aumento di espressione di sia di insulina che di glucagone per le cellule stimolate in senso pancreatico.

#### SRM



#### SFM



**Fig. 22.** Immunofluorescenza su colture tridimensionali di hAECs indotte in senso pancreatico. Le immagini nel pannello superiore sono rappresentative delle cellule differenziate in terreno con siero (SRM); nel pannello inferiore sono riportate le foto delle cellule differenziate in terreno privo di siero (SFM). La fluorescenza blu indica i nuclei, quella verde l'insulina e quella rossa il glucagone. Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale.

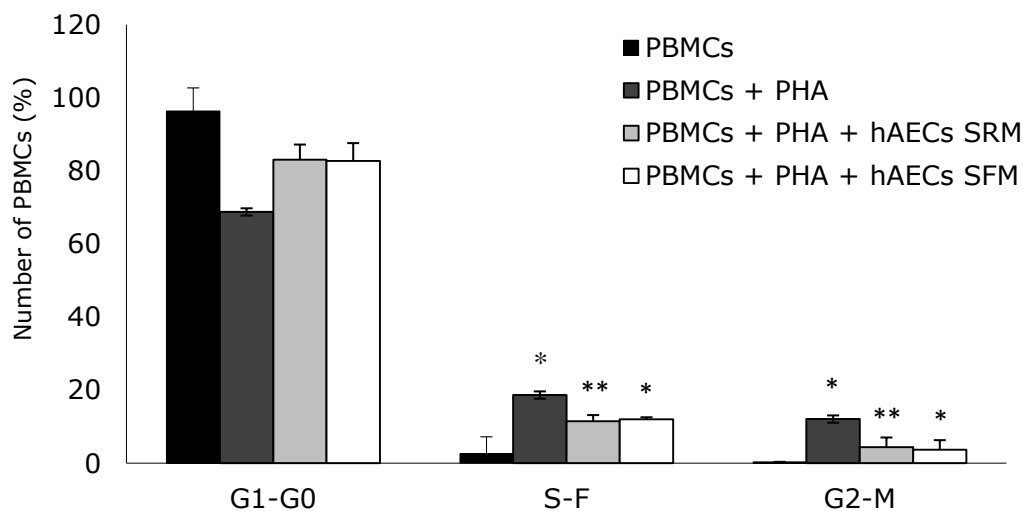
## 2.5 Analisi delle proprietà immunomodulatorie

### 2.5.1 Azione di hAECs sulla proliferazione di PBMCs attivate

Le proprietà immunomodulatorie delle hAECs in terreno con e senza siero sono state indagate analizzando la capacità delle cellule epiteliali di inibire la proliferazione di cellule mononucleate isolate da sangue periferico (PBMCs) e stimolate con PHA.

L'azione inibitoria sulla proliferazione delle cellule mononucleate è stata analizzata valutando la distribuzione di PBMCs, stimolati con PHA, nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 72h in co-coltura con hAEC. Il grafico mostra che quasi la totalità dei PBMCs non stimolati si trovano in fase

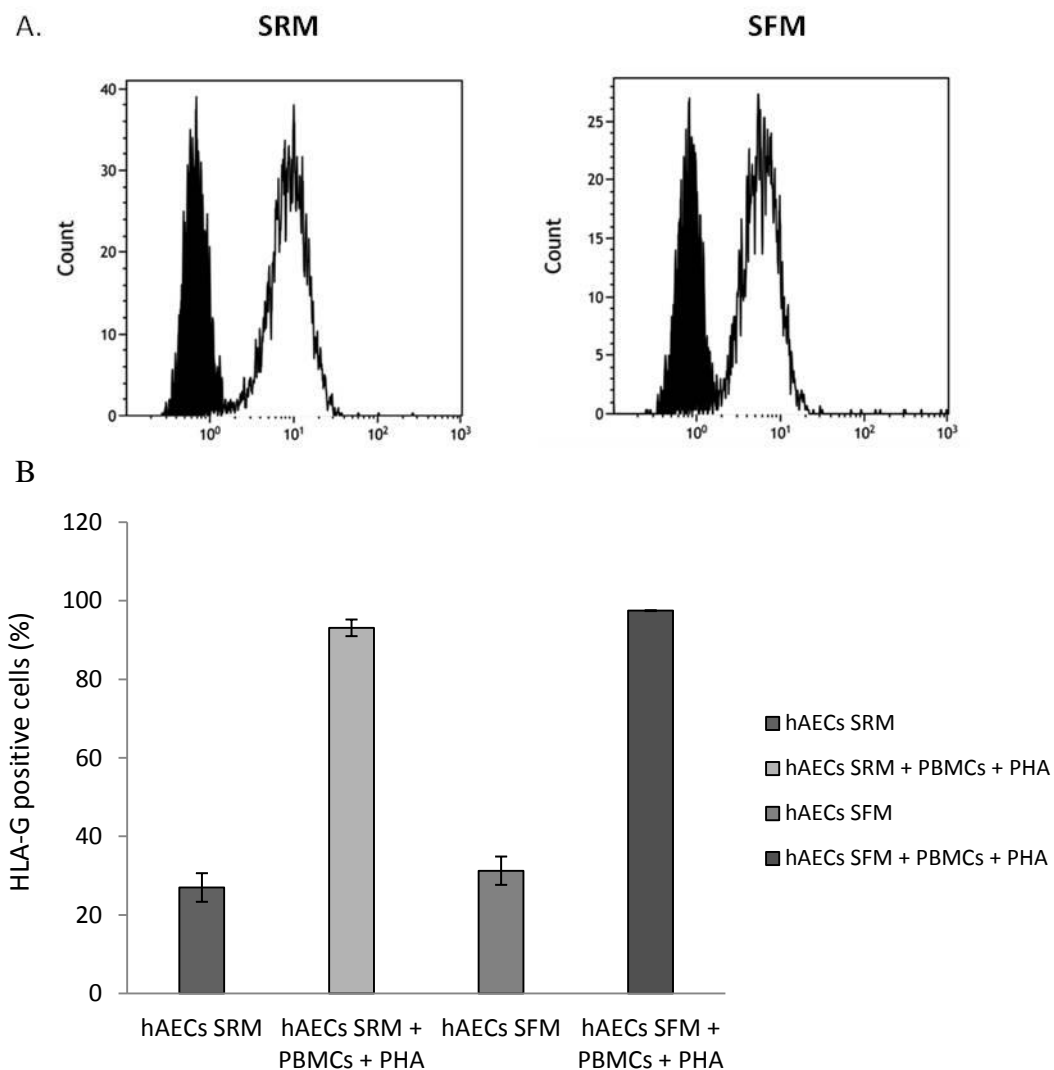
G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> del ciclo cellulare e non stanno quindi proliferando, mentre per i PBMCs stimolati con PHA e in assenza di hAECs vi è un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) della percentuale di cellule in fase S e G<sub>2</sub>M del ciclo, indice di attiva sintesi del DNA e di proliferazione cellulare. Per quanto riguarda i PBMCs stimolati e mantenuti per 72h in co-coltura con le hAECs isolate nei due diversi terreni, la percentuale di cellule in fase di attiva sintesi del DNA e quindi proliferanti, si riduce in maniera altamente significativa ( $p = 0,001$ ), evidenziando la capacità delle hAECs di inibire la proliferazione di PBMCs attivati (Figura 23).



**Fig. 23.** Il grafico mostra le percentuali di PBMCs distribuiti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 72h di incubazione in assenza di PHA e hAEC (PBMCs), in presenza di sola PHA (PBMCs+PHA), in presenza di PHA e hAECs coltivate in terreno con siero (PBMCs + PHA + hAECs SRM) o in presenza di PHA e hAECs coltivate in terreno privo di siero (PBMCs + PHA + hAECs SFM). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p = 0,01$ .

### 2.5.3 Espressione dell'antigene HLA-G su hAECs in co-coltura con PBMCs attivati.

L'antigene HLA-G è notoriamente coinvolto nella modulazione della risposta del sistema immunitario e per questo abbiamo analizzato la sua espressione su hAECs mantenute in co-coltura con PBMCs attivate. L'analisi di espressione proteica è stata condotta in citofluorimetria e ha mostrato che la co-coltura di hAECs con cellule mononucleate stimolate con PHA determina un aumento nell'espressione di HLA-G da parte delle cellule epiteliali. Questa reazione è stata evidenziata sia per le hAECs mantenute in terreno con siero (SRM) che per quelle in coltura con terreno privo di siero (SFM), in maniera simile. In Figura 24 sono mostrati i grafici di citofluorimetria e l'istogramma con le rispettive percentuali di espressione di HLA-G sia per hAECs in coltura da sole sia per hAECs mantenute in co-coltura con PBMCs stimolate.



**Fig. 24.** A. Espressione dell'antigene HLA-G su hAECs, in coltura da sole (istogrammi neri) o dopo co-coltura con PBMCs attivate (istogrammi bianchi). I grafici di citofluorimetria mostrati si riferiscono a un esperimento rappresentativo dell'espressione di HLA-G da parte di hAECs. B. In istogramma sono rappresentate le percentuali di espressione di HLA-G da parte di hAECs, senza e in co-coltura con PBMCs attivate; i grafici si riferiscono ai dati ricavati da un set di replicati sperimentali. SRM: hAECs mantenute in terreno con siero, SFM: hAECs mantenute in terreno privo di siero. I dati sono mostrati come valore medio  $\pm$  deviazione standard.

### 3. Discussione

La ricerca sulle cellule staminali ha aperto nuove prospettive per approcci di terapia cellulare e negli ultimi anni l'interesse della comunità scientifica si è concentrato sulle cellule staminali isolate da placenta e membrane fetali. Questo fenomeno può essere spiegato dalla facilità di recupero del materiale di partenza, dalle limitate implicazioni etiche e dalle caratteristiche mostrate per le popolazioni di cellule staminali e progenitori residenti nei tessuti extraembrionali.

In particolare la membrana amniotica rappresenta una sorgente di cellule staminali caratterizzate da elevato potenziale differenziativo e importanti proprietà immunomodulatorie. Da questa sorgente alternativa, ampiamente disponibile in quanto tessuto di scarto, è possibile isolare due popolazioni cellulari: una di tipo epiteliale (hAECs) e l'altra di derivazione mesenchimale (hAM-MSCs). Nello specifico sembra che le cellule isolate dall'epitelio amniotico mostrino caratteristiche di staminalità e pluripotenza che le avvicinano alle cellule staminali embrionali (Miki et al, 2005). Inoltre le cellule epiteliali amniotiche hanno suscitato grande interesse anche per le caratteristiche immunologiche e per la capacità di rispondere a stimoli differenziativi verso *lineage* cellulari diversi, tra cui commissionamenti in senso ectodermico, mesodermico ed endodermico (Ilancheran et al, 2007; Evangelista et al, 2008). Per arrivare però a un'applicazione clinica restano da fronteggiare alcuni problemi tra cui l'uso di *media* addizionati con siero di origine animale, che non garantisce l'esatta ripetibilità sperimentale e può partecipare all'attivazione del sistema immunitario dell'ospite in caso di trapianto.

La prima parte di questo lavoro è stata focalizzata quindi sulla verifica delle caratteristiche delle hAECs isolate e coltivate in un terreno privo di siero (*serum free*), in confronto a un terreno di coltura classico contenente siero animale. Lo studio è stato centrato sull'analisi delle caratteristiche biologiche e funzionali, con particolare attenzione al potenziale differenziativo in senso pancreatico endocrino e alle caratteristiche immunomodulatorie *in vitro*. L'attenzione verso il commissionamento pancreatico e verso la capacità di modulare la risposta immunitaria è legata alla possibilità che l'uso di un terreno *serum free* possa mantenere inalterate le caratteristiche di pluripotenza e contemporaneamente ridurre il rischio di rigetto dopo trapianto *in vivo*, avvicinando così le hAECs ad un utilizzo concreto in clinica.

L'iniziale caratterizzazione morfologica, immunofenotipica e funzionale delle hAECs ha confermato i dati presentati in letteratura. Inoltre l'utilizzo di un terreno privo di siero non ha interferito con il normale potenziale proliferativo delle hAECs e non ha portato alterazioni nemmeno a livello morfologico e immunofenotipico, mentre per l'espressione di marcatori di staminalità, si nota una maggiore espressione di geni tipici di cellule staminali. Anche il potenziale

differenziativo delle cellule epiteliali, valutato in senso osteogenico e pancreatico, resta invariato. L'analisi funzionale sul potenziale osteogenico ha confermato quanto descritto in letteratura per le cellule cresciute in terreno classico e ha mostrato anche che il terreno *serum free* non altera la capacità di differenziare delle hAECs. La colorazione istologica per i depositi di calcio neoformati e l'analisi di espressione di geni *markers* di osteogenesi evidenziano infatti l'avvenuto commissionamento in senso osteogenico per entrambi i terreni di coltura.

La scelta di testare anche la capacità differenziativa in senso pancreatico endocrino è giustificata dall'interesse verso l'applicazione in clinica come cura per la patologia diabetica. Ad oggi molti sforzi sono stati fatti per identificare una possibile terapia cellulare efficace per questo disturbo, in particolare per il diabete di tipo I, a base autoimmune e in cui le cellule  $\beta$  del pancreas vengono riconosciute come non *self* e diventano bersaglio della risposta immunitaria. Per una futura applicazione in clinica resta però necessario superare i limiti tecnici legati alle condizioni di coltura, che possono ridurre la sopravvivenza del trapianto di cellule (le proteine xenogeniche di origine animale presenti nel siero diminuiscono l'efficienza del trapianto, aumentando la possibilità di rigetto), e le problematiche dovute all'assenza di un protocollo univoco e standardizzato. Il protocollo differenziativo classico descritto in letteratura prevede l'uso di nicotinamide come stimolo chiave, ma da precedenti esperimenti esso appare insufficiente ad ottenere cellule in grado di produrre e secernere insulina (Ilancheran et al, 2007). Abbiamo quindi pensato di utilizzare un trattamento più complesso, definito *step-wise*, che unisse l'azione specifica di alcuni fattori aggiuntivi oltre alla nicotinamide. Il protocollo prevede una prima fase di pre-trattamento con activina A, che dovrebbe spingere le cellule verso un commissionamento endodermico generico, rendendole più recettive ai successivi stimoli pancreatici veri e propri, dati dall'uso di nicotinamide e acido retinoico. Il motivo che ha spinto alla scelta di un differenziamento a fasi successive deriva dalla volontà di riprodurre *in vitro* i meccanismi molecolari dello sviluppo embriologico del pancreas. La scelta di combinare l'azione dell'activina A, della nicotinamide e dell'acido retinoico, è basata sul voler indurre una iniziale specificazione endodermica seguita da un successivo differenziamento in senso pancreatico-insulino secernente, come riportato in letteratura (Fiorina et al, 2011; Task et al, 2012). I risultati ottenuti per il differenziamento *step-wise* di hAECs in entrambi i terreni, con e senza FBS, sembrano però indicare una risposta limitata allo stimolo differenziativo, come mostrato dall'assenza di aumento di espressione per geni marcatori del differenziamento pancreatico endocrino e dal solo leggero aumento di espressione di insulina, rilevato in citofluorimetria. Questo dato di per sé può essere incoraggiante, ma poco solido e sicuramente indice del fatto che il protocollo differenziativo deve essere migliorato. In questo quadro, precedenti esperimenti di differenziamento condotti su piastre rivestite di laminina ed



evidenze di letteratura sull'azione favorevole di molecole come laminina e fibronectina per il differenziamento pancreatico, ci hanno spinti ad utilizzare il protocollo *step-wise* su strutture tridimensionali di hAECs (Lin et al, 2010). La possibilità di individuare un microambiente capace di ricreare le condizioni fisiologiche *in vitro* ha spinto la nostra attenzione verso la possibilità di allestire colture tridimensionali immerse in una matrice composta di laminina e fibre collagene (tipo IV), in grado quindi di mimare la matrice extracellulare (ECM) e di ricreare condizioni favorevoli alla crescita e al differenziamento cellulare. I risultati ottenuti sulle colture tridimensionali sono infatti decisamente più incoraggianti per quanto riguarda la sintesi di insulina e hanno dato ulteriore conferma dell'importanza dell'interazione tra hAECs e ECM per il differenziamento cellulare. (Brafman et al, 2012). Ovviamente la prospettiva futura riguarda la valutazione funzionale del differenziamento ottenuto su sistemi di coltura tridimensionali delle hAECs, analizzando il rilascio di insulina in seguito allo stimolo dato da concentrazioni diverse di glucosio. Queste osservazioni inoltre costituiscono una premessa per poter pensare a una sperimentazione *in vivo* su modelli animali, per poter valutare sì l'efficacia ma anche la sicurezza di questo approccio, con attenzione particolare all'aspetto immunologico e al rischio di rigetto del trapianto.

In seguito alla dimostrazione che l'utilizzo di un terreno di coltura *serum-free* non altera le caratteristiche basali e il potenziale differenziativo delle hAECs, ne abbiamo analizzato anche l'effetto sulle proprietà immunomodulatorie. In letteratura è noto da tempo che le hAECs sono in grado di inibire la proliferazione di cellule mononucleate attivate (PBMCs) e i nostri esperimenti *in vitro* non solo confermano quanto osservato in letteratura, ma indicano che l'azione inibitoria delle hAECs sulla proliferazione di cellule mononucleate viene mantenuta anche dalle cellule epiteliali in terreno *serum free*. In particolare le hAECs sembrano agire bloccando le cellule mononucleate in fase G1/G0 del ciclo cellulare, riducendo il numero di cellule in fase di sintesi del DNA e quindi proliferanti. Le hAECs quindi modulano l'attivazione delle cellule coinvolte nella risposta immunitaria, anche se non è noto nei dettagli il meccanismo con cui questo avviene, ma sembra che sia coinvolta l'azione dell'antigene HLA-G, per il quale si nota un aumento di espressione sulle hAECs mantenute a contatto con le cellule mononucleate attivate. I dati sperimentali portano a pensare che anche le capacità immunomodulatorie delle hAECs non vengano alterate da un terreno privo di siero e aprono il campo a possibili prove di trapianto *in vivo*, che possano aiutare a chiarire ed aggirare gli elementi determinanti nell'attivazione della risposta immunitaria, causa primaria di rigetto.

## **CAPITOLO 2 – Cellule stromali da membrane fetali di topo (mFMSC) e fibroblasti embrionali murini (mEF): analisi comparativa delle caratteristiche funzionali e immunomodulatorie *in vitro* e *in vivo* in un modello di trapianto allogenico nel sistema nervoso centrale di topi immunocompetenti.**

### **1. Materiali e metodi**

#### **1.1 Animali**

Topi femmine C57BL/6 *wild type* (Charles River Laboratories) sono stati incrociati con topi maschi transgenici C57BL/6-eGFP (Jackson Laboratories) per ottenere embrioni e membrane fetali sia positivi che negativi per l'espressione di eGFP. Per gli esperimenti di trapianto cellulare sono stati invece utilizzati 10 topi maschi C57BL/6 *wild type* (Charles River Laboratories) di 8-9 settimane di vita. Per tutti gli esperimenti condotti, gli animali sono stati mantenuti in normale ciclo di alternanza giorno/notte (12-12 ore), con libero accesso ad acqua ed alimenti. Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato etico veterinario dell'Università di Anversa.

#### **1.2 Isolamento e allestimento di colture cellulari di mFMSC e mEF.**

Dall'incrocio di femmine di topi C57BL/6 *wild type* e maschi transgenici C57BL/6-eGFP si ottengono embrioni e membrane fetali o positivi (eGFP+) o negativi (eGFP-) per l'espressione di eGFP. Le cellule da membrane fetali e i fibroblasti embrionali sono stati isolati sia da tessuti eGFP+ che da quelli eGFP-. Per l'isolamento di entrambe le popolazioni cellulari gli embrioni, al 17°-18° giorno di gravidanza, sono stati estratti dall'utero e le membrane fetali sono state separate manualmente dall'embrione e dal disco placentare.

Una volta separate dal resto della placenta, le membrane fetali sono state lavate con PBS e digerite enzimaticamente con il seguente processo di dissociazione: 3 minuti in PBS addizionato con Dispasi (2,5 U/ml, Gibco), 3 ore in RPMI puro (RPMI-1640 medium, Lonza) con aggiunta di Collagenasi A (1,5 mg/ml, Roche) e DNAsi 1 (0,002 mg/ml, Sigma), e 3 minutes in 0.05% Tripsina-EDTA (Invitrogen). La sospensione cellulare così ottenuta è stata seminata a densità di  $7-9 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup> (in piastre da 6 *wells* mantenendo separate le cellule ottenute da membrane diverse) in RPMI al 10% FCS (*foetal calf serum*, Hyclone) con 100 U/ml Penicillina (Invitrogen) e 100mg/ml Streptomicina (Invitrogen).

I fibroblasti embrionali (mEF) sono stati isolati sia da embrioni eGFP+ che eGFP- secondo il protocollo precedentemente descritto in letteratura (Praet et al, 2012). Per l'espansione cellulare i

mEF sono stati mantenuti in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose, Lonza) addizionato con 10% FCS, 100 U/ml Penicillina e 100mg/ml Streptomina, il terreno è stato sostituito ogni 2-3 giorni e le cellule staccate ed espanse in rapporto 1:3 ogni 4-5 giorni.

Per valutare il potenziale proliferativo e allestire la curva di crescita sia le cellule stromali da membrane fetali (mFMSC) che i fibroblasti embrionali (mEF) sono stati seminati a densità di  $9 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup>, staccati, contati ed espansi in rapporto 1:2 ogni 4 giorni. Tutte le colture cellulari sono state mantenute in incubatore umidificato a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

### **1.3 Analisi immunofenotipica**

L'analisi immunofenotipica di mFMSC eGFP- e mEF eGFP- è stata condotta secondo il protocollo precedentemente descritto in letteratura (Bergwerf et al, 2009) ed utilizzando i seguenti anticorpi primari marcati con ficoeritrina (PE) o fluorescina (FITC): PE-rat anti mouse Sca1 (R&D, FAB1226P), PE-mouse anti mouse CD90 (eBioscience, 12-0900-81), PE-rat anti mouse CD44 (eBioscience, 12-0441-81), PE-rat anti mouse MHC class II (eBioscience, 12-5321-82), PE-rat anti mouse CD184 (BD, 551966), PE-mouse anti mouse H2Kb (BD 553570), FITC-rat anti mouse CD45 (eBioscience 11-0451-82), FITC-rat anti mouse CD106 (eBioscience, 11-1061-82), FITC-rat anti mouse CD31 (eBioscience, 11-0311-82), FITC-rat anti mouse CD4 (eBioscience, 11-0041-82), FITC-rat anti mouse CD8a (eBioscience, 11-0081-82), FITC-rabbit anti mouse TGFβ RII (Santa Cruz, sc-1700). Per la valutazione dell'espressione di eGFP, mFMSC e mEF isolati da tessuti positivi per l'espressione di eGFP sono stati analizzati direttamente al citofluorimetro e i dati forniti come percentuale di cellule positive per eGFP. Per tutte le analisi effettuate in citofluorimetria, la vitalità cellulare è stata verificata aggiungendo GelRed (Biotum) alla sospensione cellulare prima di ogni acquisizione al citofluorimetro e i dati mostrati come percentuale di vitalità cellulare. Tutte le analisi sono state realizzate con citofluorimetro Epics XL-MCL (Beckman Coulter) e i dati analizzati utilizzando il software di analisi FlowJo.

### **1.4 Valutazione del potenziale differenziativo**

Per il differenziamento in senso adipogenico, mFMSC e mEF sono stati piastrati a densità di  $2 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup> (in piastre 24 *wells*) e mantenute in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium (Lonza), secondo le indicazioni fornite dal produttore. I controlli, non stimolati, sono stati mantenuti nel loro terreno di coltura basale (rispettivamente RPMI 10% FCS per mFMSC e DMEM 10% FCS per mEF). Al termine delle 3 settimane previste per il protocollo di induzione, le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% e trattate con una soluzione di Oil Red O (Sigma) per colorare i lipidi neutri neo-formati.

Per il differenziamento osteogenico, mFMSC e mEF sono stati piastrati a  $1 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup> (in piastre 24 *wells*) e mantenute in Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium (Lonza), secondo le indicazioni del produttore. Le cellule di controllo, non stimulate, sono state mantenute in terreno di coltura basale. Dopo 3 settimane di induzione al differenziamento, le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% e colorate con una soluzione di Alizarin Red S (Sigma), per evidenziare i depositi di calcio.

Per il differenziamento condrogenico,  $2,5 \times 10^5$  mFMSC o mEF sono state centrifugate per formare un pellet cellulare in provetta e sono state mantenute in Mesenchymal Stem Cell Chondrocyte Differentiation Medium (Lonza) addizionato con TGF $\beta$  3 (Sigma), secondo le indicazioni del fornitore. I pellet cellulari di controllo sono stati mantenuti nel loro rispettivo terreno di coltura basale. Dopo 3 settimane di induzione i pellet cellulari sono stati fissati in paraformaldeide 4% e colorati con Alcian Blue (Sigma). Tutte le colorazioni istologiche sono state valutate tramite osservazione al microscopio ottico invertito.

### 1.5 Esperimenti di co-coltura di mFMSC o mEF con cellule microgliali

Le cellule microgliali BV2 (gentilmente fornite dal Prof. R. Donato, Università di Perugia) sono state espanse in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose, Lonza) addizionato con 10% FCS, 100 U/ml Penicillina e 100mg/ml Streptomicina. Il terreno è stato sostituito ogni 2 giorni e le cellule tagliate ed espanse in rapporto 1:5 ogni 3 giorni e mantenute in incubatore umidificato a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

Per allestire le co-culture di cellule stromali e microglia, mFMSC e mEF sono stati piastrati a concentrazione di  $5 \times 10^4$  cellule/*well* (in piastra da 24 *wells*) e lasciati aderire completamente *overnight*. Il giorno seguente, per valutare l'effetto di mFMSC e mEF sulle cellule microgliali,  $1 \times 10^5$  di BV2/*well* sono state seminate sopra il monostrato confluyente di mFMSC o mEF. Dopo 24 ore di co-coltura, le cellule sono state stimulate con l'aggiunta di lipopolisaccaride (LPS, Invivogen, 1 $\mu$ g/ml) + interferone- $\gamma$  (IFN $\gamma$ , R&D Systems, 500U/ml), per valutare l'effetto di mFMSC e mEF sulle cellule microgliali attivate. Dopo altre 24 ore di incubazione, i sovrantanti sono stati raccolti e analizzati per quantificare la presenza di TNF $\alpha$  and VEGF tramite test ELISA, secondo le indicazioni fornite dal produttore (murine TNF- $\alpha$  ELISA, Biolegend; murine VEGF ELISA, Peprotech). Il disegno sperimentale è schematizzato in tabella:

Day 1 Cell plating	Day 2 Cell plating	Day 3 Stimulation	Day 4 Analysis
	+ BV2	+/- LPS/IFN $\gamma$	ELISA
mFMSC	+/- BV2	+/- LPS/IFN $\gamma$	ELISA
mEF	+/- BV2	+/- LPS/IFN $\gamma$	ELISA

## **1.6 Esperimenti di trapianto cellulare a livello del sistema nervoso centrale**

Il trapianto di cellule a livello del sistema nervoso centrale è stato realizzato su topi C57BL/6 *wild type* immunocompetenti in condizioni di sterilità e secondo le procedure precedentemente descritte (Praet et al, 2012; De Vocht et al, 2012). mFMSC o mEF eGFP+ ( $5 \times 10^4$  cellule in 1.2  $\mu$ l PBS) sono state impiantate nell'emisfero destro alle seguenti coordinate relative al bregma (incrocio della sutura coronale e parietale sulla porzione superiore della volta cranica): 0.5 mm posteriore, 2.2 mm laterale, and 3.3 mm ventrale.

## **1.7 Analisi istologica – immunofluorescenza**

La preparazione del tessuto nervoso per le successive analisi istologiche è stato realizzato seguendo procedure precedentemente ottimizzate (Praet et al, 2012; De Vocht et al, 2012; Reekmans et al, 2012). Criosezioni in serie (10  $\mu$ m di spessore) sono state ottenute dall'intera regione di impianto cellulare utilizzando il criostato Microm HM5000 (Prosan, Merelbeke, Belgium), e registrando tutte le sezioni realizzate in serie.

Le analisi di immunofluorescenza sulle criosezioni ottenute sono state effettuate seguendo protocollo precedentemente descritto (Praet et al, 2012; De Vocht et al, 2012; Reekmans et al, 2012), e utilizzando i seguenti anticorpi: (i) primario rabbit anti-mouse Iba1 (Wako, 019-19741) in combinazione con un anticorpo secondario donkey anti-rabbit marcato con Alexa Fluor® 555 (Invitrogen, A31572), (ii) primario mouse anti-mouse GFAP (Millipore, mab377) in combinazione con un anticorpo secondario goat anti-mouse (Invitrogen, A11068) marcato con Alexa Fluor® 350, (iii) primario rabbit anti-mouse S100 $\beta$  (Abcam, ab52642) in combinazione con un anticorpo secondario donkey anti-rabbit (Invitrogen; A-31572) marcato con Alexa Fluor® 555, (iv) primario rabbit anti-mouse CD31 (Abcam, AB28364) in combinazione con un anticorpo secondario goat anti-rabbit (Abcam, AB6719) marcato con Texas Red. Le analisi di immunofluorescenza sono state realizzate utilizzando i singoli anticorpi o combinazioni specifiche: (i) Iba1 (n = 2 sezioni per ogni animale trapiantato), (ii) S100 $\beta$  + GFAP (n = 2 sezioni per ogni animale trapiantato), (iii) CD31 (n = 1 sezione per ogni animale trapiantato). I nuclei sono stati marcati con TOPRO3 (Life Technologies) e ogni vetrino montato usando Prolong Gold Antifade (Invitrogen, P36930). Le immagini per ogni sezione sono state acquisite con microscopio a fluorescenza Olympus BX51 con fotocamera digitale Olympus DP71.

## **1.8 Analisi istologica – quantificazione**

L'analisi quantitativa per la sopravvivenza cellulare dei trapianti, per la risposta delle cellule di glia e per l'angiogenesi è stata realizzata utilizzando i software di analisi d'immagine NIH ImageJ

(ImageJ) e di analisi di immunofluorescenza TissueQuest (TissueGnostics GmbH), secondo indicazioni precedentemente descritte (De Vocht et al, 2012; Reekmans et al, 2012). L'uso combinato di questi software ha permesso di determinare i seguenti parametri: (i) il volume (in  $\text{mm}^3$ ) di ogni sito di impianto cellulare per mFMSC e mEF; (ii) la densità (in cellule/ $\text{mm}^3$ ) e il numero assoluto di eGFP+ mFMSC ed eGFP+ mEF in ogni sito di impianto cellulare; (iii) la sopravvivenza cellulare per mFMSC e mEF espressa come numero assoluto e in percentuale, calcolata sulla base della vitalità e del numero di cellule trapiantate inizialmente; (iv) la densità (in cellule/ $\text{mm}^3$ ) e il numero assoluto di microglia positiva per Iba1 all'interno di ogni sito di impianto cellulare; (v) la densità (in cellule/ $\text{mm}^3$ ) e il numero assoluto di microglia positiva per Iba1 ai bordi del sito di impianto di mFMSC o mEF, determinati come la regione che si estende per 100  $\mu\text{m}$  attorno al trapianto; (vi) la densità (in cellule/ $\text{mm}^3$ ) di astrociti positivi per S100 $\beta$  ai bordi dell'impianto di mFMSC o mEF; (vii) il grado(espresso in percentuale) di astrogliosi positiva per GFAP ai bordi di ogni sito di impianto cellulare; (viii) la densità (espressa come numero di vasi/ $\text{mm}^2$ ) di vasi sanguigni CD31+ all'interno dei siti di trapianto di mFMSC o mEF.

### **1.9 Analisi statistica**

Tutte le analisi statistiche sono state realizzate utilizzando IBM SPSS Package (versione 20). Il test ANOVA ad una via con correzione post-hoc di Bonferroni è stato utilizzato per valutare le differenze nella crescita cellulare tra i giorni 0, 4 e 8 della curva di crescita e per valutare le differenze nella secrezione di TNF $\alpha$  e VEGF. Il test T di Student per campioni indipendenti è stato utilizzato per valutare le differenze per: (i) volume dei siti di impianto cellulare, (ii) numero totale di cellule al sito di impianto; (iii) numero di cellule eGFP+ all'interno del sito di impianto; (iv) percentuale di cellule vitali; (v) rapporto tra microglia e cellule eGFP+ al sito di impianto cellulare; (vi) densità di microglia ai bordi dei trapianti; (vii) densità di astrociti ai bordi dei trapianti; (viii) percentuale di astrogliosi; (ix) densità di vasi sanguigni ai siti di impianto cellulare. Per tutti i confronti effettuati il valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## 2. Risultati

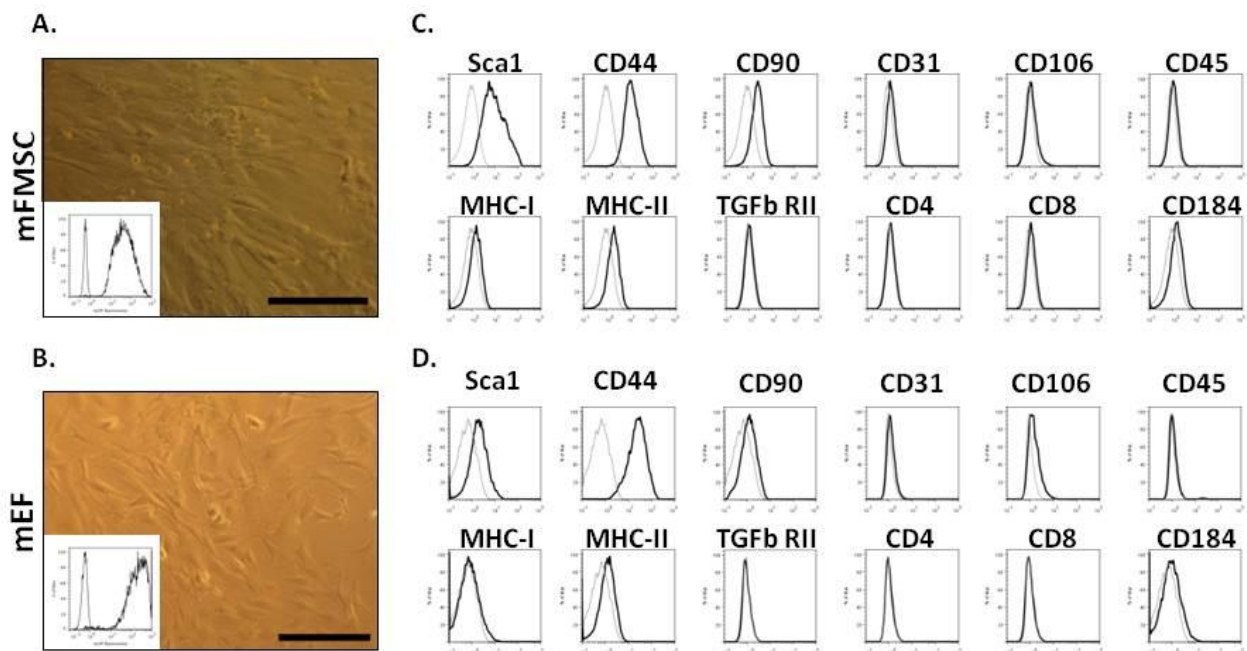
### 2.1 Isolamento e caratterizzazione immunofenotipica di mFMSC e mEF

Cellule stromali da membrane fetali di topo (mFMSC) e fibroblasti embrionali di topo (mEF) sono stati isolati da membrane fetali ed embrioni (Figura 25) di topi C57BL/6 wild-type o topi transgenici C57BL/6-eGFP, che esprimono eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*).



**Fig. 25.** Embrione di topo C57BL/6. Si notano il disco placentare, il cordone ombelicale e le membrane fetali.

E' stato possibile allestire colture *in vitro* sia di mFMSC che di mEF ed entrambe le popolazioni cellulari crescono aderenti in plastica e con morfologia fibroblastoide tipica delle cellule mesenchimali. mFMSC e mEF isolati da topi transgenici per eGFP (C57BL/6-eGFP) mostrano alti livelli di espressione per eGFP, come evidenziato dall'analisi di espressione condotta in citofluorimetria (Fig. 26 A e B).

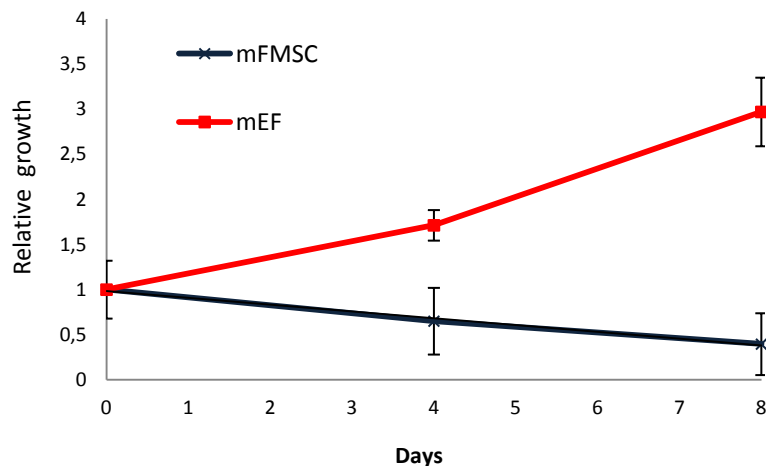


**Fig. 26.** Caratterizzazione di mEF e mFMSC. Pannello A. e B. un'immagine delle cellule in coltura; nel riquadro piccolo l'espressione di eGFP valutata in citofluorimetria (scala 200 µm). Pannelli C. e D. caratterizzazione immunofenotipica (grafici in grassetto: livelli di espressione per ciascun marcatore; curve tratteggiate: controllo isotipico).

La successiva analisi immunofenotipica definisce entrambe le popolazioni come positive per l'espressione di Sca1 e CD44, negative per CD31, CD106, CD45, CD184, CD4, CD8, TGF $\beta$ RII, MHC classe I, e con bassi livelli di espressione per CD90 e MHC classe II (Fig. 26 C e D).

## 2.2 Caratterizzazione funzionale di mFMSC e mEF

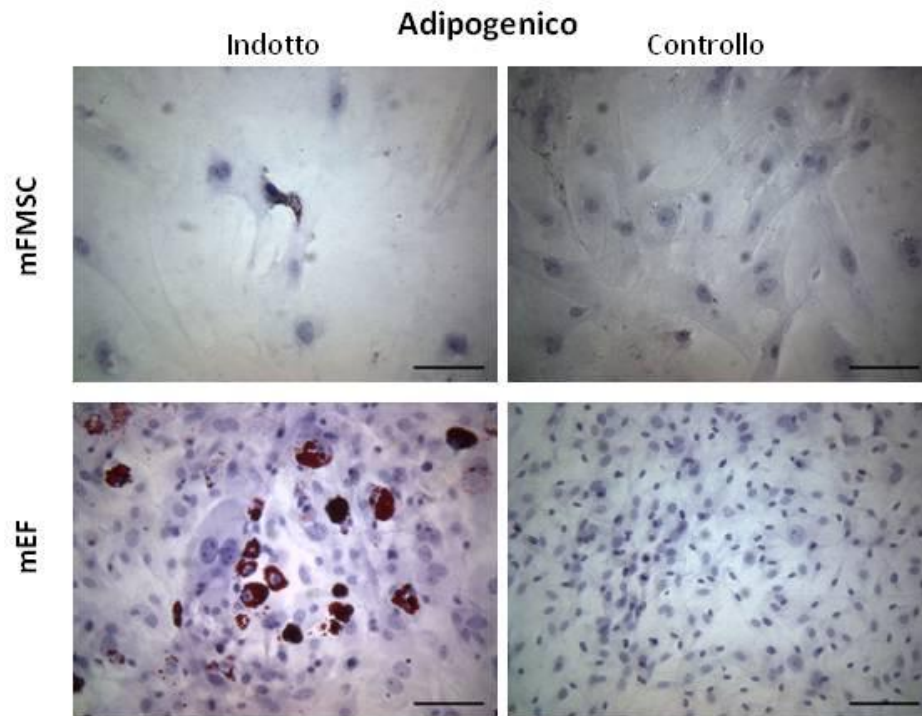
Per caratterizzare a livello funzionale le due popolazioni cellulari è stata innanzitutto valutata la capacità proliferativa. I mEF proliferano molto rapidamente *in vitro* ( $p < 0.001$  per day 0 vs day 8), mentre non è stato possibile espandere le mFMSC. Le cellule stromali da membrane fetali sono state mantenute in coltura per non più di 2-3 settimane, dopodiché le cellule sono andate incontro a morte cellulare staccandosi dalla superficie di coltura ( $p = 0.004$  per day 0 vs day 8). Il grafico (Figura 27) mostra la curva di crescita relativa per mEF e mFMSC a confronto ed evidenzia chiaramente il basso potenziale proliferativo delle cellule stromali isolate da membrane fetali di topo.



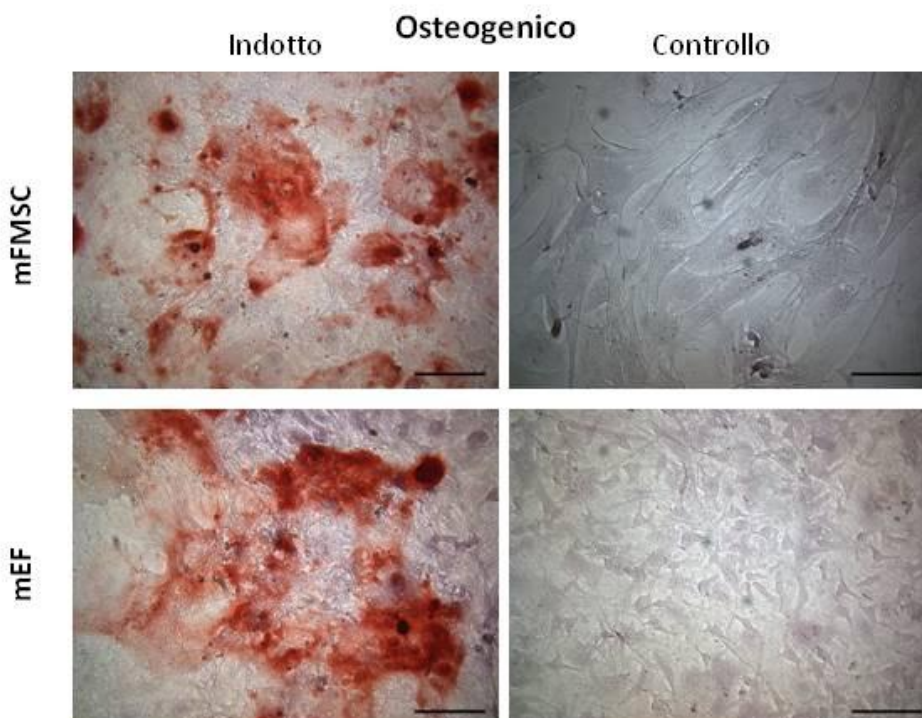
**Fig. 27.** Curva di crescita per mEF e mFMSC a confronto. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

Successivamente siamo passati a valutare il potenziale differenziativo *in vitro* di entrambe le popolazioni. mEF e mFMSC sono state indotte utilizzando specifici terreni commerciali per induzione adipogenica, osteogenica e condrogenica. Il pannello di immagini in Figura 28 e 29 mostra un potenziale differenziativo ridotto per le mFMSC, limitato al solo commissionamento osteogenico, se confrontato con i mEF, i quali rispondono positivamente al differenziamento adipogenico e osteogenico. Infine sia i fibroblasti embrionali che le cellule stromali isolate da membrane fetali non rispondono agli stimoli differenziativi in senso condrogenico.





**Fig. 28.** Differenziamento adipogenico. La colorazione con Oil Red O mostra la comparsa goccioline lipidiche neo formate per i mEF , ma non per mFMSC indotte. Le colture non stimolate non mostrano segni di differenziamento spontaneo.



**Fig. 29.** Differenziamento osteogenico. La colorazione con Alizarin Red mostra la comparsa depositi di calcio neo formati sia nelle colture di mEF che di mFMSC, anche se in misura minore. Le colture non stimolate non mostrano segni di differenziamento spontaneo.

### 2.3 Analisi dell'effetto immunomodulatorio di mFMSC e mEF *in vitro*

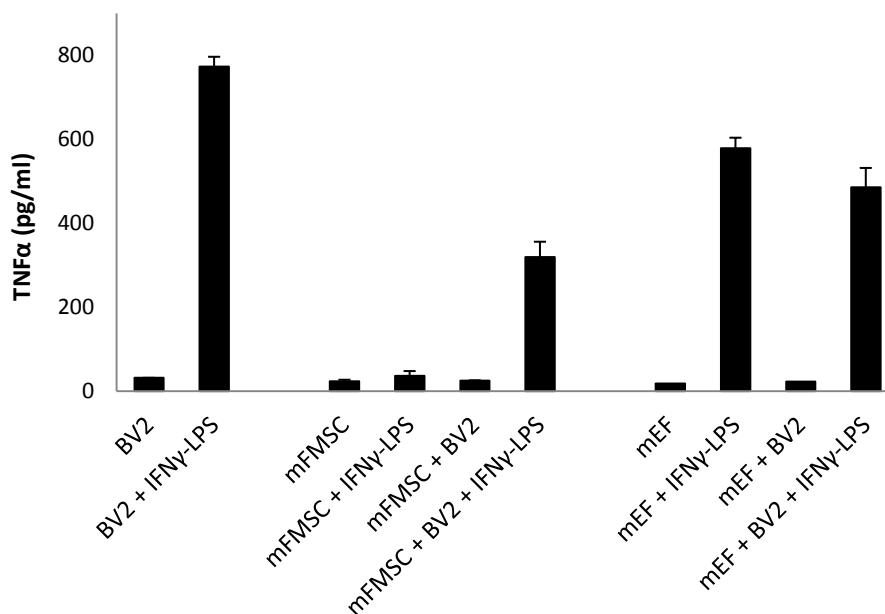
Le capacità immunomodulatorie dei fibroblasti embrionali di topo e delle cellule stromali derivate da membrane fetali sono state indagate valutandone l'effetto su una linea cellulare microgliale di topo (linea immortalizzata BV2 ricavata di microglia di topi C57BL/6). Sia le mFMSC che i mEF sono stati co-coltivati con cellule BV2 attivate e il sovrano è stato analizzato dopo 24h per quantificare, tramite test ELISA, la produzione di TNF $\alpha$ . Lo schema dell'esperimento è descritto nella tabella in figura 30.

Day 1 Cell plating	Day 2 Cell plating	Day 3 Stimulation	Day 4 Analysis
	+ BV2	+/- LPS/IFN $\gamma$	ELISA
mFMSC	+/- BV2	+/- LPS/IFN $\gamma$	ELISA
mEF	+/- BV2	+/- LPS/IFN $\gamma$	ELISA

**Fig. 30.** La tabella descrive lo schema sperimentale secondo cui è stato allestito il saggio di co-coltura tra mFMSC o mEF e cellule di microglia attivate (BV2). Al giorno 1 sono state seminate mFMSC e mEF, il giorno successivo sono state allestite le co-culture con aggiunta di cellule BV2 e il terzo giorno è stato aggiunto lo stimolo dato da LPS/IFN $\gamma$ . A 24h dall'aggiunta di LPS/IFN $\gamma$  i sovrinatanti sono stati raccolti e analizzati per la produzione di TNF $\alpha$ .

Come mostrato dal grafico in figura 31 le cellule microgliali attivate con LPS/IFN $\gamma$  producono alti livelli di TNF $\alpha$  ( $p < 0.0001$  per BV2 vs. BV2+LPS/IFN $\gamma$ ). Le cellule stromali da membrane fetali invece non producono quantità significative di TNF $\alpha$ , né sotto azione di LPS/IFN $\gamma$  e nemmeno dopo co-coltura con cellule BV2 non attivate. Quando però le mFMSC sono mantenute in co-coltura con cellule BV2 in presenza di LPS/IFN $\gamma$  si osserva una riduzione nei livelli di TNF $\alpha$  prodotta dalle cellule microgliali attivate ( $p < 0.0001$  per mFMSC+BV2+LPS/IFN $\gamma$  vs. BV2+LPS/IFN $\gamma$ ). Infine i mEF in coltura soli o in co-coltura con cellule BV2 non producono quantità significative di TNF $\alpha$ , mentre la presenza dello stimolo dato da LPS/IFN $\gamma$  porta alla produzione di quantità significativa di TNF $\alpha$  ( $p < 0.0001$  per mEF vs. mEF+LPS/IFN $\gamma$ ). Infine anche se i mEF sotto l'azione di LPS/IFN $\gamma$  producono quantità rilevanti di TNF $\alpha$ , quando vengono posti in co-coltura con cellule BV2 in presenza di LPS/IFN $\gamma$  si osserva una riduzione generale nei livelli di TNF $\alpha$  prodotto dalle cellule microgliali attivate ( $p < 0.0001$  per mEF+BV2+LPS/IFN $\gamma$  vs. BV2+LPS/IFN $\gamma$ ). Questa osservazione supporta l'ipotesi che le popolazioni di cellule a confronto presentino analogie funzionali dal punto di vista immunomodulatorio e che sia i fibroblasti

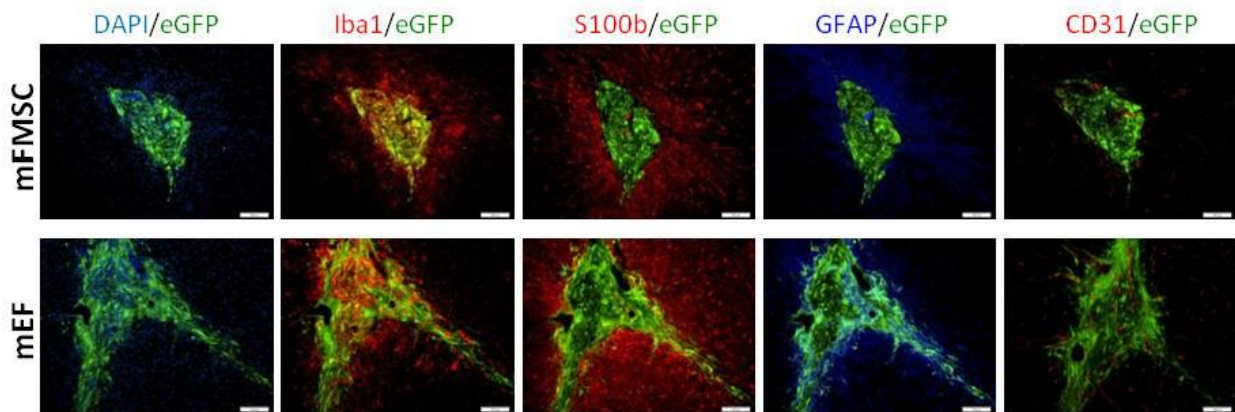
embrionali murini che le cellule stromali isolate da membrane fetali murine siano in grado di modulare, riducendola, l'attivazione di cellule di microglia BV2 *in vitro*.



**Fig. 31.** Livelli di produzione di TNF $\alpha$  per BV2 non attivate (BV2) e attivate con LPS/IFN $\gamma$  (BV2+IFN $\gamma$ -LPS), per mFMSC sole (mFMSC), in presenza di LPS/IFN $\gamma$  (mFMSC+IFN $\gamma$ -LPS) o in co-coltura con BV2 senza (mFMSC+BV2) e con aggiunta di LPS/IFN $\gamma$  (mFMSC+BV2+ BV2+IFN $\gamma$ -LPS) ed infine per mEF sole (mEF), in presenza di LPS/IFN $\gamma$  (mEF+IFN $\gamma$ -LPS) o in co-coltura con BV2 senza (mEF+BV2) e con aggiunta di LPS/IFN $\gamma$  (mEF+BV2+ BV2+IFN $\gamma$ -LPS). La quantificazione è stata realizzata con kit ELISA specifico per TNF $\alpha$ . I dati nel grafico sono espressi come valore medio  $\pm$  deviazione standard.

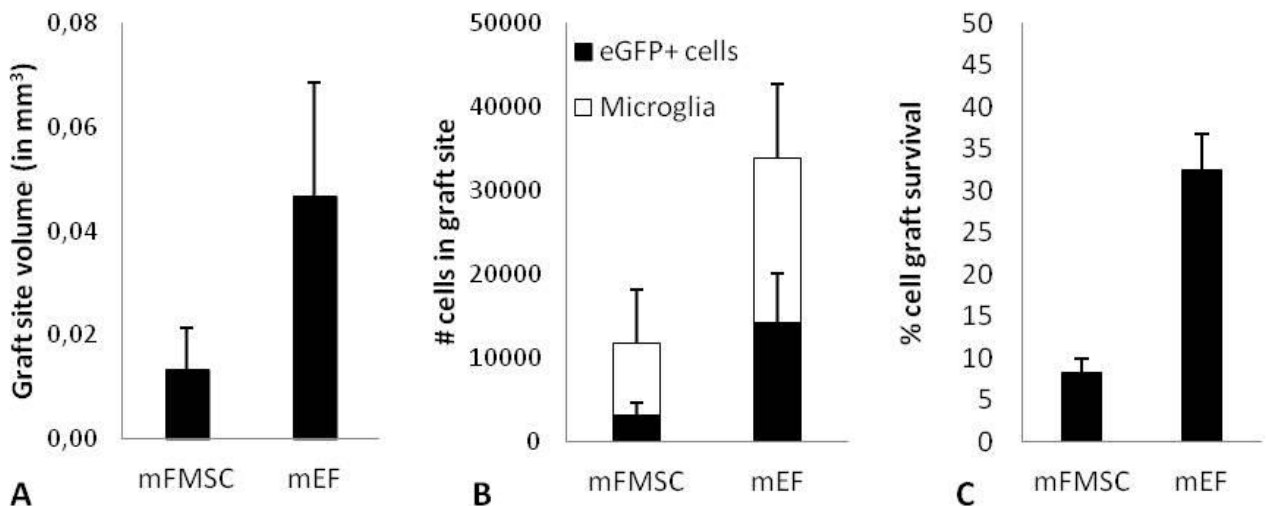
#### 2.4 Analisi quantitativa di sopravvivenza cellulare dopo trapianto a livello del sistema nervoso centrale (CNS).

In seguito alla caratterizzazione biologica e funzionale *in vitro* è stato analizzato il comportamento di mFMSC e mEF *in vivo* dopo trapianto a livello del CNS di topi immunocompetenti. A questo scopo  $5 \times 10^4$  mFMSC-eGFP o  $5 \times 10^4$  mEF-eGFP sono state trapiantate nel CNS di topi C57BL/6 wild type singenici (5 animali per ogni gruppo) e l'analisi istologica del tessuto nervoso dei topi trapiantati è stata realizzata a 14 giorni dal trapianto. Sono state preparate criosezioni di cervello in modo da sezionare l'intero sito di trapianto cellulare e tutte le sezioni sono state analizzate per verificare la presenza di cellule impiantate e positive per l'espressione di eGFP. Dalle immagini rappresentative mostrate in figura 32 risulta chiaro che le cellule trapiantate possono essere ritrovate a 2 settimane dal trapianto; in particolare è stato possibile ritrovare le cellule trapiantate per 4 su 5 topi trapiantati con mFMSC-eGFP e per tutti e 5 gli animali nel caso di trapianti di mEF-eGFP.



**Fig 32.** Il pannello mostra immagini rappresentative delle analisi di immunofluorescenza condotte sulle sezioni di trapianti cellulari per mFMSC e mEF.

Ad una prima osservazione, confermata anche dall'analisi istologica quantitativa (Figura 33 A e B), risulta evidente che il volume dei trapianti e il numero totale di cellule nel sito di trapianto sono significativamente inferiori per i trapianti realizzati con mFMSC rispetto a quelli realizzati con mEF (rispettivamente  $p=0.024$  e  $p=0.031$ ). Il volume di ciascun trapianto è stato calcolato in base all'area contenente cellule eGFP-positive in ogni sezione del trapianto e per numero totale di cellule al sito di trapianto si intende l'insieme delle cellule trapiantate e positive per eGFP più le cellule di microglia residenti e richiamate al sito di trapianto.



**Fig. 33.** A. Grafico del volume dei trapianti espresso in mm<sup>3</sup> e calcolato sulla base dell'analisi di tutte le sezioni realizzate in sequenza sul sito di trapianto. B. Numero di cellule calcolato al sito di ciascun trapianto; vengono messe in luce le differenze nel numero di cellule trapiantate e positive per eGFP e il numero di cellule di microglia. C. Percentuale di sopravvivenza cellulare a livello dei trapianti realizzati con cellule stromali di membrane fetali murine o con fibroblasti embrionali murini. I dati sono espressi come valore medio  $\pm$  deviazione standard.

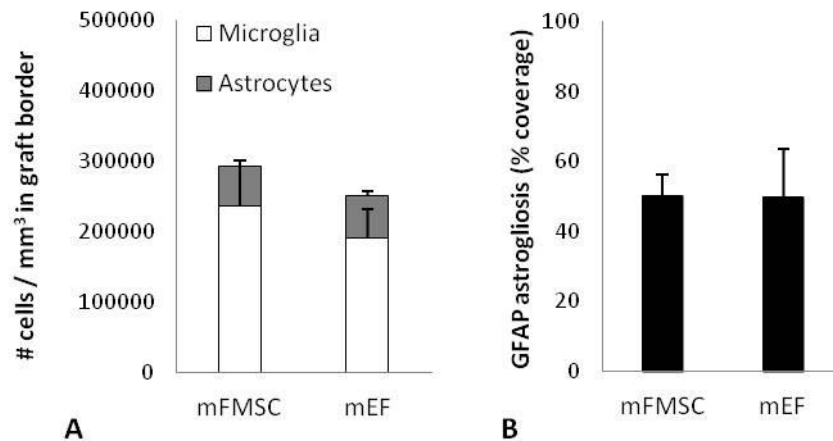
Successivamente è stato osservato che il numero delle sole cellule positive per l'espressione di eGFP nei trapianti di mFMSC era significativamente inferiore rispetto al numero di cellule eGFP-positivo nei trapianti di mEF (Figura 33B,  $p=0.009$ ). Paragonando questi dati al numero iniziale di cellule trapiantate, ne deriva una notevole e significativa differenza nel livello di sopravvivenza cellulare calcolato per i trapianti di mFMSC ( $8\% \pm 4\%$ ) se confrontato con i dati calcolati per i trapianti di mEF ( $28\% \pm 12\%$ ) (Figura 33C;  $p=0.016$ ).

## **2.5 Analisi quantitativa della risposta delle cellule gliali al trapianto di mFMSC e mEF**

Precedenti studi basati sul trapianto di mBMMSC e mEF nel CNS di topi immunocompetenti (Praet et al, 2012) hanno evidenziato che sia i trapianti di mBMMSC che quelli realizzati con mEF non solo subiscono l'infiltrazione massiccia da parte di cellule di microglia (a due settimane post trapianto fino al 50-80% delle cellule presenti nel trapianto sono microglia), ma vengono anche circondati da microglia e astrociti.

Dalle immagini rappresentative dell'analisi in immunofluorescenza per Iba1/eGFP, S100b/eGFP e GFAP/eGFP (Figura 32) si nota chiaramente che anche i trapianti realizzati con cellule derivate da membrane fetali vengono infiltrati da microglia (evidenziata dall'espressione del *marker* di microglia Iba1) e circondati da microglia e astrociti (caratterizzati dall'espressione di S100 $\beta$  e GFAP, marcatori rispettivamente di astrociti maturi e attivati). I grafici mostrati in figura 33B mostrano che i livelli di microglia sono compresi tra  $75\pm 6\%$  e  $58\pm 3\%$ , rispetto al numero totale di cellule al sito di trapianto, rispettivamente per le mFMSC e i mEF. Anche il rapporto tra microglia e cellule eGFP-positivo è significativamente più alto per i trapianti di mFMSC confrontati con i trapianti di mEF (rispettivamente  $2.7\pm 0.8$  e  $1.4\pm 0.2$ ,  $p=0.01$ ). Quest'ultima osservazione potrebbe essere spiegata alla luce dei livelli di sopravvivenza cellulare, che sono più bassi per i trapianti di mFMSC rispetto a quelli realizzati con mEF (Figura 33C).

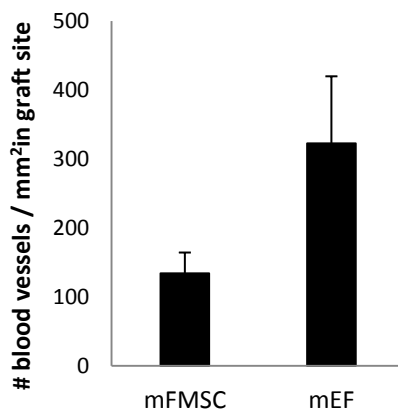
Per quanto concerne la regione che circonda i trapianti invece non si osservano differenze nella densità di cellule di microglia positive all'immunofluorescenza per l'espressione di Iba1 ( $p=0.24$ ) e di astrociti positivi per S100 $\beta$  ( $p=0.25$ ) nel confronto tra i trapianti realizzati per le due sorgenti cellulari (Figura 34A). Inoltre non vi sono differenze nemmeno nei livelli di astrogliosi positiva per GFAP tra i trapianti di mFMSC e mEF (Figura 34B,  $p=1$ ). Da queste osservazioni si può dedurre che, nonostante il livello di sopravvivenza cellulare inferiore per i trapianti di mFMSC rispetto a quelli di mEF, non compaiono differenze nei livelli e nell'organizzazione della risposta gliale endogena ai trapianti realizzati con mFMSC o mEF.



**Fig. 34.** A. Rapporto tra la densità di microglia e astrociti presenti nella zona circostante il trapianto cellulare. B. Livelli di astrogliosi sempre nella zona che circonda i trapianti sia di mFMSC che di mEF. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

## 2.6 Analisi quantitativa dei livelli di neo-angiogenesi nei trapianti di mFMSC e mEF

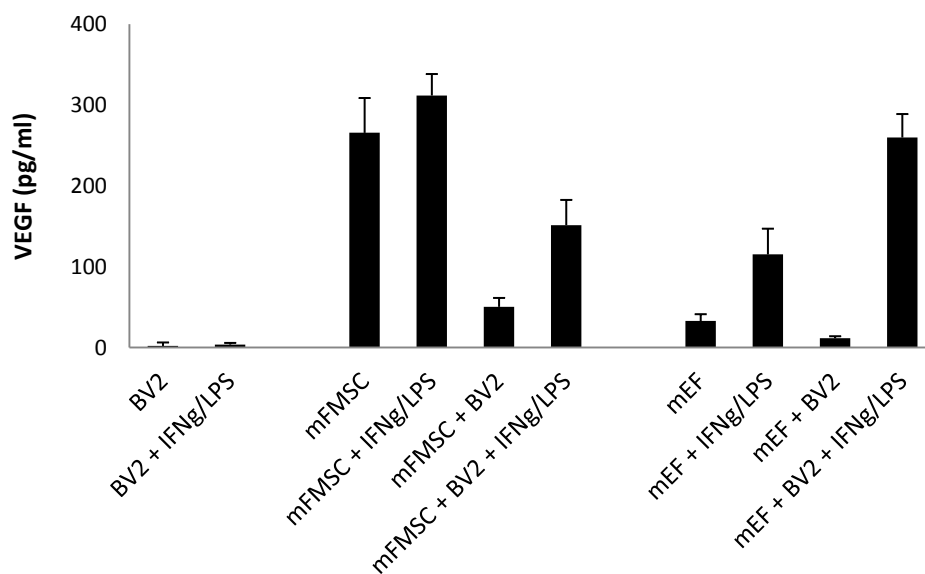
La sopravvivenza a lungo termine delle cellule trapiantate *in vivo* si basa anche sul supporto fornito da fenomeni di neo-angiogenesi localizzata, che possono essere imputati al tipo di cellule utilizzate per il trapianto. Anche se il meccanismo d'azione non è ancora stato chiarito, è noto che i fibroblasti giocano un ruolo importante nell'angiogenesi fisiologica e patologica. Abbiamo quindi cercato di analizzare i fenomeni di neo-angiogenesi nei trapianti realizzati con mFMSC e mEF. Le immagini rappresentative delle prove di immunofluorescenza per CD31/eGFP in figura 32 e il grafico in figura 35, evidenziano una densità di vasi capillari inferiore osservata all'interno dei trapianti di mFMSC se confrontati con i trapianti di mEF ( $p = 0,008$ ). Sono indubbiamente necessarie ulteriori analisi per approfondire le conoscenze su questo aspetto, ma una ridotta capacità di indurre neo-angiogenesi potrebbe spiegare i bassi livelli di sopravvivenza cellulare per i trapianti di mFMSC, specialmente a confronto con i trapianti di mEF.



**Fig. 35.** Il grafico mostra il numero di vasi sanguigni identificati per ciascun tipo di trapianto e mette in evidenza una differenza significativa tra quanto osservato nei trapianti di mFMSC e di mEF. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

## 2.7 Analisi dell'effetto pro-angiogenico *in vitro*

Infine, abbiamo cercato di capire se le differenze nella densità di vasi sanguigni osservate per i trapianti di mFMSC e mEF possa essere collegata ad una diversa capacità delle cellule di produrre e secernere VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Per questo motivo i sovrinatanti precedentemente utilizzati per valutare l'attivazione delle cellule di microglia (il disegno sperimentale è descritto in figura 30) sono stati testati anche per valutare la produzione di VEGF. Questa valutazione è stata effettuata per verificare se l'interazione tra mFMSC o mEF e cellule di microglia attivate può determinare un aumento o una riduzione nella secrezione di VEGF da parte di mFMSC e mEF. Come mostrato in figura 36, le cellule della linea BV2 non producono livelli significativi di VEGF, anche sotto lo stimolo di LPS/IFN $\gamma$ , mentre le mFMSC, sole e sotto lo stimolo di LPS/IFN $\gamma$ , producono alti quantitativi di VEGF. Tuttavia quando si trovano in co-coltura con cellule BV2, con o senza stimolo dato da LPS/IFN $\gamma$ , si osserva un calo significativo nella produzione di VEGF da parte di mFMSC. Al contrario, i fibroblasti embrionali murini soli o in co-coltura con cellule BV2 non producono quantità significative di VEGF, mentre in seguito allo stimolo fornito da LPS/IFN $\gamma$ , su mEF e in particolare sulle co-culture di mEF e BV2, si nota un aumento significativo dei livelli di VEGF. Questa osservazione mette in luce un'ulteriore differenza tra le mFMSC e i mEF che riguarda la produzione di VEGF, in presenza e in assenza di stimoli, ed indica un diverso potenziale angiogenico tra queste due popolazioni cellulari in presenza di microglia attivata. Questo potrebbe quindi aiutare a spiegare anche le differenze nella densità di vasi e nella sopravvivenza delle cellule infuse osservate per i trapianti di mFMSC e mEF.



**Fig. 36.** Secrezione di VEGF da parte di mFMSC e mEF valutati tramite test ELISA. Il grafico mette in evidenza la pressoché nulla produzione di VEGF da parte delle cellule BV2 non attivate (BV2) e attivate (BV2+IFNg/LPS), una notevole secrezione di VEGF da parte di mFMSC sole (mFMSC) o stimolate (mFMSC+IFNg/LPS) e una limitata produzione di VEGF da parte di mEF sole (mEF) o in presenza di LPS/IFN $\gamma$  (mEF+IFNg/LPS). Per le mFMSC in co-coltura con cellule BV2 attivate (mFMSC+BV2+IFNg/LPS) o non attivate (mFMSC+BV2) con LPS/IFN $\gamma$  si nota un significativo calo nella produzione di VEGF. Per i mEF in co-coltura con BV2 in assenza di ulteriori stimoli (mEF+BV2) la produzione di VEGF resta decisamente limitata, mentre aumenta notevolmente se alla co-coltura viene aggiunto lo stimolo dato da LPS/IFN $\gamma$  (mEF+BV2+ IFNg/LPS). I dati sono stati graficati come media  $\pm$  deviazione standard.



### 3. Discussione

La terapia cellulare si basa su un approccio terapeutico in cui le cellule assumono un ruolo centrale, poiché vengono considerate alla stregua di un farmaco che ha come bersaglio la ricostruzione di un tessuto danneggiato. Questo obiettivo può essere perseguito o sfruttando le capacità differenziali delle cellule staminali, oppure sfruttandone la produzione di fattori di crescita e molecole in grado di modulare la risposta immunitaria e di sostenere e aiutare le cellule dell'ospite a riparare il danno stesso, ottenendo quindi una sorta di riparazione tissutale endogena spinta dall'azione paracrina di cellule esogene. Non bisogna dimenticare però che parliamo di approcci terapeutici estremamente complessi e che devono tener conto di una serie di variabili e problematiche che necessitano ulteriori approfondimenti.

Tra le prime variabili da considerare ricordiamo la scelta del tipo di cellule da utilizzare, poiché esse devono offrire le migliori caratteristiche per giungere all'obiettivo di rigenerazione tissutale e modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. In quest'ottica particolare interesse è stato posto verso le cellule staminali mesenchimali (MSCs) che, per il loro potere rigenerativo e immunomodulatorio, sono considerate candidate attraenti per approcci di terapia cellulare, anche del sistema nervoso centrale (CNS) da sempre considerato tessuto immunoprivilegiato.

Il secondo punto critico riguarda la scelta del tipo di approccio terapeutico: autologo o allogenico. La scelta di un trapianto autologo resta la prima sotto il profilo immunitario in quanto riduce al minimo il rischio di rigetto, ma non sempre risulta applicabile. Molto spesso il trapianto di cellule deve essere fatto velocemente poco tempo dopo il danno tissutale primario e usando un numero di cellule molto alto, che non è sempre possibile ottenere da un solo isolamento senza una fase di espansione cellulare *in vitro*. La necessità di un intervento urgente e con un numero di cellule elevato spinge a prendere in attenta considerazione approcci terapeutici allogenici, utilizzando cellule di donatori. La scelta di cellule allogeniche, non *self*, permette quindi di realizzare interventi in tempi rapidi subito dopo l'evento traumatico principale, usando un numero di cellule adeguate e consentendo anche di selezionarle in base alle loro capacità differenziali e immunomodulatorie. Certo il trapianto allogenico porta con sé un alto rischio di rigetto, dovuto all'attivazione del sistema immunitario dell'ospite, ma le spiccate caratteristiche immunomodulatorie di alcune tipologie cellulari, tra cui le MSC, sembrano poter aggirare o comunque limitare il problema del rigetto.

Vari studi hanno riportato le caratteristiche immunomodulatorie *in vitro* per le MSC da midollo osseo, ma *in vivo* il panorama diventa più complesso (Keyser et al, 2007; Coyne et al, 2006). Studi diversi hanno infatti mostrato la necessità di terapia immunosoppressiva per evitare il rigetto di trapianti allogenici e xenogenici a livello del sistema nervoso centrale (Swanger et al, 2005;

Ponsaerts et al, 2004; Tambuyzer et al, 2009; Bergwerf et al, 2009). Studi basati sul trapianto xenogenico di cellule derivate da placenta umana in ratti, maiali e scimmie hanno mostrato invece la sopravvivenza del trapianto cellulare senza attivazione del sistema immunitario nell'ospite e in assenza di immunosoppressione (Bailo et al, 2004; Sankar and Muthusamy, 2003). Queste ultime osservazioni portano però ad un punto interrogativo sul comportamento delle cellule staminali mesenchimali in caso di allo e xenotrapianto. In questo quadro le capacità immunoregolatore *in vitro* delle cellule staminali derivate da membrane fetali sembrano offrire uno strumento potenzialmente efficace e potrebbe essere interessante arrivare ad utilizzare queste cellule in *trials* clinici per trapianti allogenici nell'uomo. Un limite però viene dal fatto che la maggior parte dei dati derivano da studi *in vivo* realizzati con cellule isolate da placenta di derivazione umana per trapianti xenogenici in diversi modelli animali, ma troppo poco si sa circa la sopravvivenza di queste cellule in trapianti allogenici, come ad esempio nel caso dell'uso di cellule derivate da membrane fetali murine per trapianti allogenici in modelli di topo.

In questo studio abbiamo quindi centrato la nostra attenzione su cellule isolate da membrane fetali di topo (mFMSC), una popolazione mesenchimale di origine extra embrionale. Le caratteristiche immunomodulatorie delle mFMSC sono state confrontate *in vivo* con i fibroblasti embrionali murini (mEF) che, in seguito a trapianto nel CNS vengono infiltrati e circondati da microglia attivata e circondati da astrociti (Praet et al, 2012). Dall'analisi quantitativa effettuata sulle prove di immunofluorescenza per marcatori tipici di microglia e astrociti non si osservano differenze significative tra mFMSC e mEF. I trapianti vengono invasi da microglia, come mostrano le percentuali di cellule positive per Iba1, e circondati da microglia e astrociti, come indicano le prove di immunofluorescenza per S100 $\beta$  e GFAP, in maniera del tutto analoga per i trapianti realizzati sia con mFMSC che con mEF. L'analisi della risposta immunitaria *in vivo* non mostra quindi differenze per le due popolazioni cellulari ed altre analogie sono emerse circa l'analisi fenotipica. A livello immunofenotipico infatti entrambe le popolazioni cellulari presentano livelli di espressione sovrapponibili per il pannello di marcatori di superficie analizzati.

Sempre nel confronto tra le due popolazioni cellulari sono emerse invece anche alcune importanti differenze per le caratteristiche biologiche e funzionali *in vitro*. Per prima cosa, in contrasto con quanto accade per i fibroblasti embrionali murini e per le cellule derivate da membrane fetali umane, la controparte isolata dalle membrane fetali murine mostra un limitato potenziale proliferativo *in vitro*. Non è stato possibile espandere le mFMSC, le colture *in vitro* resistono per 2-3 settimane prima di staccarsi dalla superficie di crescita, anche se non vi è una spiegazione concreta a giustificazione di questo comportamento. Inoltre le cellule stromali isolate da membrane fetali murine non mostrano il potenziale differenziativo verso i *lineages* mesenchimali classici, in

sensu adipogenico, osteogenico e condrogenico, mentre i fibroblasti embrionali rispondono positivamente agli stimoli in senso adipogenico ed osteogenico. Queste differenze osservate per il potenziale proliferativo e differenziativo tra mFMSC e mEF potrebbero essere una conseguenza diretta dello sviluppo embriologico, che assegna un ruolo biologico e un destino radicalmente diverso ai tessuti da cui le due popolazioni cellulari vengono isolate. Ovviamente questo è un aspetto che andrebbe ulteriormente approfondito ed analizzato.

Lo studio del potenziale immunomodulatorio *in vitro* ha mostrato una certa reattività dei fibroblasti embrionali di topo allo stimolo dato da LPS/IFN- $\gamma$ , mentre le cellule stromali da membrane fetali non rispondono all'azione di LPS/IFN- $\gamma$ . Passando però a valutare la capacità intrinseca nel sopprimere o ridurre la produzione di TNF $\alpha$  da parte della microglia attivata, non si osservano differenze significative tra le popolazioni di mFMSC e mEF. La capacità di modulare l'attivazione del sistema immunitario sembra una caratteristica che unisce molte popolazioni cellulari di origine mesenchimale, e in questo caso anche le mFMSC e i mEF. Questo comportamento, per quanto riguarda i mFMSC, potrebbe però essere visto anche come un retaggio delle capacità immunomodulatorie intrinseche delle membrane fetali, che durante tutta la gravidanza devono proteggere l'embrione da eventuali segnali infiammatori derivati dalla madre. Tuttavia ulteriori indagini saranno necessarie per chiarire i dettagli della reattività delle cellule stromali da membrane fetali e dei fibroblasti embrionali agli stimoli forniti dal sistema immunitario.

Sebbene l'analisi della risposta immunitaria scatenata *in vivo* dai trapianti di mFMSC o mEF non abbia mostrato significative differenze, la valutazione della sopravvivenza delle cellule trapiantate ha evidenziato un livello di sopravvivenza più basso per le cellule isolate da membrane fetali rispetto ai fibroblasti embrionali. I dati relativi alla sopravvivenza cellulare inoltre sono stati seguiti dall'analisi del numero di vasi sanguigni presenti a livello del sito di trapianto, indice di neo-angiogenesi localizzata. A queste osservazioni ha fatto seguito la valutazione della capacità, da parte di mFMSC e mEF, di produrre VEGF, che ha portato all'attenzione un'ulteriore differenza tra le due popolazioni cellulari. La secrezione di VEGF e la capacità di fornire supporto a fenomeni di neo-angiogenesi è un importante pre-requisito per la sopravvivenza dei trapianti cellulari, anche perchè in molti casi i trapianti vengono realizzati senza l'aggiunta di un supporto strutturale o funzionale per le cellule impiantate. Inizialmente abbiamo notato che le mFMSC producono basalmente alti livelli di VEGF, mentre non è così per i mEF. In seguito a co-coltura con microglia attivata però la secrezione di VEGF da parte delle mFMSC cala drasticamente, mentre i mEF vengono stimolati ad aumentarne la secrezione. Questi dati spingono a pensare che lo stato di attivazione della microglia che infila i trapianti possa scatenare una risposta angiogenica in diversi tipi di cellule di origine mesenchimale, spiegando in questo modo anche i bassi livelli di neo-

angiogenesi per i trapianti di mFMSC rispetto a quelli realizzati con mEF. Certamente queste osservazioni sono interessanti e stimolanti, ma richiedono ulteriori approfondimenti e analisi cellulari e molecolari che possano chiarire i meccanismi di segnalazione che si instaurano tra i trapianti di cellule di origine mesenchimale, microglia e astrociti attivati, e progenitori endoteliali.

## Bibliografia

- Alviano et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 2007; 7:11.
- Amos TA and Gordon MY. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation—a review. *Cell Transplant* 1995; 4, 547–569.
- Anderson DJ, et al. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med.* 2001; 7:393-395.
- Bailo M et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004. 78:1439–1448.
- Bainbridge DR et al. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 2000;48:17-26.
- Bauman MU et al. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 2002 Oct;19(1):13-22.
- Bennett JP et al. Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. *Lancet* 1980; 1:1153-1156.
- Bergwerf I et al. Reporter gene-expressing bone marrow-derived stromal cells are immune-tolerated following implantation in the central nervous system of syngeneic immunocompetent mice. *BMC Biotechnol* 2009 Jan 7; 9:1.
- Bilic G et al. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant* 2008;17: 955e68.
- Blau HM et al. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell* 2001; 105:829-841.
- Brafman DA et al. Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions. *Cell Death and Differentiation* 2012; 1-13.
- Burman S et al. 2004. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. *Cell Tissue Bank* 2004;5:161e75.
- Cargnoni A et al. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. *Cell Transplantation* 2009; 18(10):1147-59.
- Cariappa R et al. Isoforms of amino acid transporters in placental syncytiotrophoblast: plasma membrane localization and potential role in maternal/fetal transport. *Placenta* 2003 Aug;24(7):713-26.

- Coyne TM et al. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells* 2006; 24: 2483-2492.
- Davis J. Skin transplantation with a review of 550 cases at The Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 1910; 15:307.
- De Vocht N et al. Quantitative and phenotypic analysis of mesenchymal stromal cell graft survival and recognition by microglia and astrocytes in mouse brain. *Immunobiology* 2012 Aug 9. [Epub ahead of print]
- Debnath et al. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003 Jul;30(3):256-68.
- Diaz-Prado S et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine *Differentiation* 2011 Mar;81(3):162-71.
- Diaz-Prado S et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem* 2010 Nov 1;111(4):846-57.
- Dominguez-Bendala J et al. 2011 Stem cell-derived islet cells for transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011 Feb;16(1):76-82.
- Eliopoulos N et al. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005;106:4057-4065.
- Elwan MA and Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997; 8:3435-3438.
- Elwan MA and Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997; 8:3435-3438.
- English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013 Jan;91(1):19-26.
- Evangelista M e al. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* 2008 Sep;58(1):33-42.
- Faulk WP et al. Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet* 1980; 1:1156-1158.
- Fiorina P et al. Immunological applications of stem cells in type 1 diabetes. *Endocrin Rev* 2011 Dec; 32(6):725-54.

Fournel S et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 2000;164:6100-6104.

Fukuchi Y et al.. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22, 649–658.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287:1433-1438.

Gomes JA et al. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*2005;16:233–240.

Gruss JS and Jirsch DW. Human amniotic membrane: a versatile wound dressing. *Can Med Assoc J* 1978;118:1237–1246.

Gude N.M. et al. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):397-407.

Haggarty P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth-a review. *Placenta* 2002 Apr;23 Suppl A:S28-38.

Harris SG et al. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23: 144–150.

Hausmann ON. 2003 Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2003;41:369-378.

Haynesworth SE, et al. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992; 13:69-80.

He S et al. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009; 25:377– 406

Ilancheran S et al. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009 Jan;30(1):2-10.

Ilancheran S et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multi-lineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007; 77:577–588.

In't Anker PS et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004; 22: 1338–45.

Insausti CL et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen*2010 Jul-Aug;18(4):368-77.

Kakishita K et al. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000; 165:27–34.

- Kakishita K et al. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 2003; 980:48–56.
- Kamiya K et al. Topical application of culture supernatant from human amniotic epithelial cells suppresses inflammatory reactions in cornea. *Exp Eye Res* 2005 May;80(5):671-9.
- Keyser KA et al. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant*, 2007; 16:555-562.
- Kim J et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells* 2007;9:581–94.
- Kim JC and Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14:473-484.
- Kim JS et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000;70:329-337.
- Kong XY et al. Transplantation of human amniotic cells exerts neuroprotection in MPTP-induced Parkinson disease mice. *Brain Res* 2008; 1205:108–115.
- Koyano S et al. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth Differ* 2002; 44:103–112.
- Kubo M et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:1539–1546
- Kubo M et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1539-1546.
- Langer R and Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993 May 14;260(5110):920-6.
- Le Blanc K, et al. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Bio Blood Marrow Transplant* 2005; 11(5):321-34.
- Le Blanc K, Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*. 2006;8(6):559-61.
- Li H et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:900–907.
- Li MO et al. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006 Sep;25(3):455-71.



- Lin HY et al. Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells through activating Akt and Erk.. *J Biomed Sci* 2010 Jul 12;17:56.
- Liu T et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Shock* 2008; 29, 603–611.
- Liu YH et al. Amniotic epithelial cells from the human placenta potently suppress a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 2012; 7:e35758.
- Magatti M et al. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant* 2009;18: 899e914.
- Magatti M et al. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells* 2008;26:182e92.
- Manuelpillai U et al. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta* 2011 Oct;32 Suppl 4:S320-5.
- Manuelpillai U et al. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl(4)-Treated mice. *Cell Transplant* 2010;19:1157e 68.
- Marin JJG et al. The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 2003 May;24(5):431-8.
- 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.
- Matikainen T and Laine J. Placenta-an alternative source of stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207:544-9.
- McDonald C et al. The emergence of amnion epithelial stem cells for the treatment of Multiple Sclerosis. *Inflamm.Regen* 2011;. 31, 256–271.
- McKarns SC and Kaminski NE. TGF-beta 1 differentially regulates IL-2 expression and [3H]-thymidine incorporation in CD3 epsilon mAb- and CD28 mAb-activated splenocytes and thymocytes. *Immunopharmacology* 2000 Jul 20;48(2):101-15.
- Miki T and Strom S. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006; 2, 133–141.
- Miki T et al. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol.* 2007 Oct;75(2):91-6.
- Miki T et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23, 1549–1559.

- Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther*, 2011 May 19;2(3):25.
- Moffett A and Loke YW. The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. *Placenta* 2004 Jan;25(1):1-8.
- Moodley Y et al. Human amnion epithelial stem cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:643e51.
- Moore KL and Persaud TVN. *The developing human: clinically oriented embryology.* Sanders 1998.
- Munn DH et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191-1193.
- Munn DH et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999;189:1363-1372.
- Overturf K et al. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol.* 1997; 151:1273-1280.
- Park WC and Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2906-2914.
- Parolini O et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008 Feb;26(2):300-11. Epub 2007 Nov 1.
- Parolini O et al. Human amniotic epithelial cells and amniotic mesenchymal cells express the embryonic stem cell marker Oct-4 in vitro and promote behavioral and histological benefits when transplanted in ischemic stroke rats. *Stroke* 2008; 39:657.
- Parolini O et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev* 2010;19:143e54.
- Parolini O et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev* 2010;19:143e54.
- Phadnis SM et al. Human umbilical cord blood serum promotes growth, proliferation, as well as differentiation of human bone marrow-derived progenitor cells. *In Vivo Cell. Dev. Biol* 2006; 42: 283-286.
- Picinich SC et al. *The therapeutic potential of mesenchymal stem cells.* 2007

- Ponsaerts P et al. Current challenges in human embryonic stem cell research: directed differentiation and transplantation tolerance. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18:347-351.
- Portmann-Lanz CB et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for preand perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:664–673
- Praet J et al. Cell type-associated differences in migration, survival, and immunogenicity following grafting in CNS tissue. *Cell Transplant* 2012;21(9):1867-81.
- Prigozhina TB et al. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol* 2008 Oct;36(10):1370-6.
- Qureshi KM et al. Human amniotic epithelial cells induce localized cell mediated immune privilege in vitro: implications for pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant* 2011; 20(4):523-34.
- Reekmans K et al. (2012). Spatiotemporal evolution of early innate immune responses triggered by neural stem cell grafting. *Stem Cell Res Ther.* 2012 Dec 14;3(6):56. [Epub ahead of print] *Regenerative Medicine. Curr Probl Surg* 2011.
- Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: A Versatile Pair of Master Regulators that Orchestrate the Self-renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells by Functioning as Molecular Rheostats. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009; 1(2): 228-236.
- Rizzo R, et al. A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* 2008;10(4):364-75.
- Robin AM et al. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26:125-134.
- Roche E et al. Insulin-secreting cells derived from stem cells: clinical perspectives, hopes and hopes. *Transpl Immunol* 2005; 15 (2):113-29.
- Sadler T.W. *Embriologia medica di Langman*, Elsevier, V edizione 2013.
- Sakuragawa N et al. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett* 1997; 232:53–56.
- Sakuragawa N et al. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett* 1997; 232:53-56

- Sakuragawa N et al. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 1996; 209:9–12.
- Sakuragawa N et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res* 2004; 78:208–214.
- Sakuragawa N et al. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet* 2000; 45:171–176.
- Sakuragawa N et al. Non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. *Jpn J Pharmacol* 2001; 85:20-23.e 2001;
- Sangwan VS et al. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Indian J Ophthalmol* 2007;55:251e 60.
- Sankar V and Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003;118(1):11-7.
- Sankaranarayanan K et al. Humanized substitutes for animal sera in human mesenchymal stem cell culture and differentiation. *Cell Biology International* 2011 Apr 15. [Epub ahead of print].
- Soncini M et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1:296–305.
- Sorsby A et al. Further Experience with Amniotic Membrane Grafts in Caustic Burns of the Eye. *Br J Ophthalmol* 1947;31:409-418.
- Svendsen CN et al. Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Path.* 1999; 9:499-513.
- Swanger SA et al. Analysis of allogeneic and syngeneic bone marrow stromal cell graft survival in the spinal cord. *Cell Transplant* 2005;14: 775-786.
- Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 Aug 25;126(4):663-76.
- Takashima S et al. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct* 2004; 29:73–84.
- Tamagawa T et al. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Hum Cell* 2007;20:77e84.

- Tamagawa T et al. Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers *in vitro*. *Hum.Cell.* 2004; 17, 125–130.
- Tambuyzer BR et al. Allogeneic stromal cell implantation in brain tissue leads to robust microglial activation. *Immunol Cell Biol* 2009;87:267-273.
- Task K et al. Population Based Model of Human Embryonic Stem Cell (hESC) Differentiation during Endoderm Induction. *PLoS One* 2012; 7(3):e32975.
- Terada S et al. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplant* 2000 Sep-Oct;9(5):701-4.
- Thellin O et al. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* 2000;12:731-737.
- Thomson JA et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145-1147.
- Togel F et al Adult bone marrow derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn* 2007.
- Tonti GA and Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev boil* 2008;52(8):1023-32.
- Trelford JD and Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 134:833–845
- Uchida N et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:14720-14725.
- Uchida S et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res* 2000; 62:585-590.
- Van der Valk J et al. Optimization of chimica defined cell culture media- Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro* 2010; 24:1053-1063.
- Ventura C et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem.* 2007; 282(19):14243-52.
- Wagers AJ and Weissman IL. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* 2004; 116: 639-648.

- Wei JP et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transpl* 2003;12:545–552.
- Wolbank S et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007; 13:1173–1183.
- Yang X et al. An experimental study on intracerebroventricular transplantation of human amniotic epithelial cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurol Res.* 2010 Dec; 32(10):1054-9.
- Yeager AM et al. A therapeutic trial of amniotic epithelial cell implantation in patients with lysosomal storage diseases. *Am J Med Genet* 1985; 22: 347–355.
- Yen BL et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 2005; 23: 3–9.