

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze biomediche: progetto n. 3 "Fisiologia applicata e fisiopatologia"

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore Scientifico disciplinare: MED 09

Studio di fase I sulla reinfusione intraepatica di cellule staminali CD 133+ altamente purificate nei pazienti con malattia epatica terminale

Presentata da Lucia Brodosi

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Mauro Bernardi

Dott.ssa Annagiulia Gramenzi

INDICE

CAPITOLO I:

1. End-Stage Liver Disease (ESLD)	5
1.1 La cirrosi epatica	5
1.2 Complicanze della cirrosi epatica	6
1.3 Storia naturale della cirrosi epatica e ESLD	10
1.4 Il trapianto di fegato	13
2. Impiego delle cellule staminali in epatologia	16
2.1 Definizione di cellule staminali	17
2.2 La rigenerazione epatica	19
2.3 Cellule staminali CD133 ⁺	24
2.4 Esperienze cliniche sull'uso terapeutico di cellule staminali in pazienti affetti da cirrosi epatica	26

CAPITOLO II:

1. Introduzione e scopi	32
2. Pazienti e metodi	34
2.1 Metodi	35
2.2 Analisi statistica	38
3. Risultati	39
4. Discussione e conclusioni	43
Bibliografia	47

Capitolo I

1. End-Stage Liver Disease (ESLD)

Con il termine di insufficienza epatica si indica l'insieme di tutte quelle situazioni patologiche che hanno come comune denominatore una grave compromissione delle funzioni del fegato.

L'insufficienza epatica si distingue in acuta, quando insorge in pazienti senza precedenti di epatopatia (acute liver failure, ALF), acuta su patologia cronica quando si osserva uno scompenso acuto in corso di epatopatia cronica (acute on chronic) e cronica terminale (end stage liver disease, ESLD).

La causa di gran lunga più frequente di ESLD è la cirrosi epatica in stadio avanzato che comporta una grave alterazione delle fisiologiche attività del fegato.

1.1 La cirrosi epatica

Il termine “*cirrosi*” è stato per la prima volta proposto da Lannec nel 1826, per descrivere il fegato di un paziente che all'autopsia mostrava superficie bozzoluta e raggrinzita, ed un colorito giallo-grigiastro (1).

Secondo la classica definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità la cirrosi epatica viene oggi definita come “un processo diffuso (del fegato) caratterizzato da fibrosi e dalla trasformazione della normale architettura epatica in noduli strutturalmente anomali” (2). La cirrosi viene dunque definita su base anatomo-patologica e identificata in base alla presenza contemporanea di due elementi:

- 1) fibrosi;
- 2) rigenerazione nodulare.

La cirrosi epatica rappresenta l'esito finale comune di numerose malattie, fra loro molto eterogenee, ma che hanno in comune la capacità di indurre un danno epatico cronico e di innescare il processo della fibrosi.

Consumo inadeguato di alcol, infezione cronica da virus dell'epatite B (HBV) e dell'epatite C (HCV), autoimmunità e sindrome metabolica rappresentano le cause più frequenti di cirrosi epatica (3). In particolare, in Italia, alcol e virus sono responsabili di circa il 90% dei casi di cirrosi epatica (3).

Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, in Europa la cirrosi epatica è responsabile dell'1.8% di tutte le morti (170.000 morti all'anno) con percentuali più alte nel sud-est e nel nord-est Europa (4-7). Negli ultimi anni, nei paesi del bacino del Mediterraneo (Francia, Italia, Spagna, Portogallo e Grecia) che storicamente si caratterizzavano per elevata morbilità e mortalità per cirrosi epatica, è stato documentato un sensibile declino di incidenza e mortalità. Alla base di questo favorevole andamento sembra vi siano l'introduzione della vaccinazione per HBV nei nuovi nati e la riduzione della trasmissione dell'HCV. Per quanto i dati epidemiologici disponibili non siano né recenti né precisi si calcola che in Italia si verifichino ogni anno almeno 15.000 decessi per cirrosi, mentre la prevalenza della malattia sarebbe di circa 500.000 casi (3).

1.2 Complicanze della cirrosi epatica

La cirrosi rappresenta lo stadio finale ed irreversibile delle epatopatie croniche ed ha una storia naturale e delle complicanze che sono largamente indipendenti dal processo patologico che ha causato la cirrosi stessa. L'andamento e le conseguenze della cirrosi dipendono da una parte dal completo sovvertimento della normale architettura epatica con formazione di shunts intraepatici e ostruzione al flusso nel sistema portale, dall'altra alla progressiva riduzione della massa

epatica funzionante, fenomeni peraltro strettamente legati fra loro. Perdita progressiva delle principali funzioni del fegato e ipertensione portale sono dunque alla base delle principali manifestazioni cliniche e delle complicanze della malattia. (8).

L'evoluzione della malattia cirrotica è dunque contrassegnata dalla comparsa di una o più complicanze. A ciò bisogna aggiungere che sia la cirrosi in quanto tale che molti fra i vari fattori eziologici che la determinano sono in grado di stimolare la carcinogenesi epatica.

Vengono di seguito indicate le principali complicanze della cirrosi epatica.

Encefalopatia epatica (9): l'encefalopatia epatica o porto-sistemica una sindrome neuropsichiatrica che si osserva in pazienti con gravi alterazioni della funzionalità epatica. Lo spettro clinico è estremamente variabile e spazia da sottili alterazioni individuabili solo con specifici test, a profonde alterazioni dello stato di coscienza fino al coma. I meccanismi patogenetici non sono completamente noti, ma è presumibile che molteplici fattori contribuiscono all'istaurarsi di questo disordine. L'ipotesi più antica è quella dell'azione neurotossica dell'ammoniaca, ipotesi patogenetiche alternative indicano un possibile ruolo dell'alterato equilibrio tra neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale. Altre teorie suggeriscono la possibilità che alterazioni della concentrazione degli acidi grassi a catena corta o un'alterata permeabilità della barriera emato-encefalica possano contribuire alla patogenesi dell'encefalopatia epatica. Clinicamente si distinguono una encefalopatia episodica o ricorrente, caratterizzata da episodi più o meno ravvicinati nel tempo generalmente legati al sopraggiungere di eventi scatenanti ed una permanente.

Ascite (10): cioè l'accumulo di liquido nella cavità peritoneale, rappresenta la complicanza più frequente della cirrosi giacché si presenta in circa il 60% dei pazienti entro 10 anni dalla diagnosi della malattia. L'insorgenza dell'ascite ha un significato prognostico

negativo: infatti solo il 50% dei cirrotici è ancora vivo a distanza di due anni dal primo episodio di ascite. La sua comparsa indica infatti l'esistenza di profonde alterazioni dell'emodinamica sistemica e splancnica e della funzione renale, che si verificano in conseguenza dell'ipertensione portale. La presenza di ascite inoltre può favorire l'insorgenza di ulteriori complicanze quali squilibri idroelettrolitici, insufficienza renale (la cosiddetta "sindrome epato-renale") e la peritonite batterica spontanea (11).

Emorragie digestive (12): l'emorragia dal tratto gastrointestinale superiore è un evento frequente nei pazienti cirrotici e ne costituisce la causa di morte nel 25-30% dei casi. Nel paziente affetto da cirrosi epatica che ha sviluppato le varici a livello dell'esofago e/o dello stomaco, il rischio di sanguinamento è di circa il 4% all'anno quando le varici esofagee sono piccole, ma il rischio raddoppia (circa il 9% per anno) se le varici hanno un maggior calibro. Nei pazienti che hanno sanguinato una prima volta, il rischio di un nuovo episodio emorragico è significativamente maggiore: circa il 75% entro i primi due anni e tale rischio sarà tanto più grande quanto più recente è stato il sanguinamento. La maggior parte delle recidive infatti avviene entro i primi sei mesi, in particolare nel corso del primo mese successivo all'evento emorragico. Le emorragie digestive in corso di cirrosi possono tuttavia essere anche croniche causate cioè da uno stilloidio ematico da per erosioni o ulcerazioni della mucosa come conseguenza della gastro- o duodenopatia congestizia. Infine vi possono essere anche emorragie non ipertensive, cioè non direttamente correlate all'ipertensione portale ma causate da patologie concomitanti (malattia peptica, ernia jatale, sindrome di Mallory-Weiss, gastrite erosivo-emorragica, neoplasia) che nel cirrotico possono essere più frequenti e assumere particolare gravità. In effetti, qualunque siano le cause, l'emorragia digestiva ha, nei difetti della coagulazione tipici della cirrosi, un fattore aggravante di notevole importanza.

Sindrome epatorenale (13): si tratta di una insufficienza renale acuta che si sviluppa nei pazienti con cirrosi epatica avanzata e ascite in assenza di elementi clinici, di laboratorio, strumentali o morfologici che indirizzino verso cause note di insufficienza renale. Secondo la definizione data nel corso della Consensus Conference del Club Internazionale dell'Ascite nel 1995 *“la sindrome epato-renale è una condizione clinica che si verifica in pazienti con epatopatia cronica, insufficienza epatica avanzata ed ipertensione portale, ed è caratterizzata dalla presenza di una compromissione della funzione renale, spiccate alterazioni dell'emodinamica sistemica ed iperattività dei principali sistemi vasoattivi endogeni. A livello renale è presente una marcata vasocostrizione, che determina una riduzione del filtrato glomerulare. A livello sistemico predomina invece una riduzione delle resistenze arteriolari, che determina un quadro di ipotensione arteriosa”*. L'incidenza della sindrome epato-renale nei pazienti cirrotici ricoverati per il trattamento dell'ascite oscilla tra il 7 e il 15%, ma la sua incidenza aumenta all'aumentare della severità della malattia epatica, raggiungendo il 50% circa fra coloro che muoiono durante la degenza.

Clinicamente si distinguono due varianti della sindrome epato-renale:

- il tipo I, corrispondente alla forma classica, rapidamente progressiva;
- il tipo II a decorso subacuto.

Essendo una complicanza terminale della cirrosi epatica, la sindrome epato-renale è un indicatore prognostico infausto.

Peritonite batterica spontanea (11): la peritonite batterica spontanea è l'infezione batterica del liquido ascitico che si verifica in assenza di affezioni addominali di pertinenza chirurgica, quale ad esempio una perforazione intestinale. Può complicare l'ascite qualunque ne sia

l'eziologia, ma è particolarmente frequente nei pazienti cirrotici nei quali ha un'incidenza che va dall'8 al 27% dei casi, mentre è piuttosto rara nell'ascite cardiogena. Nei pazienti non trattati la prognosi è inesorabilmente infausta. Tuttavia negli ultimi anni, grazie ai progressi terapeutici, anche intensivi, ma soprattutto alla precocità della diagnosi, la mortalità ospedaliera è calata dal 100% al 20-40%. Tra i fattori predittivi di mortalità ospedaliera il più importante è l'insorgenza di una sindrome epato-renale. In effetti circa il 50% dei pazienti con peritonite batterica spontanea che sviluppa insufficienza renale muore durante il ricovero contro il 6% dei pazienti con funzione renale nella norma. In ogni caso la prognosi a lungo termine di chi sopravvive ad un episodio di peritonite batterica spontanea è pessima, dell'ordine del 70 e 80% a uno e due anni rispettivamente. Le principali cause di morte sono la ESLD e la recidiva della peritonite batterica (40-70% dei casi ad un anno).

1.3 Storia naturale della cirrosi epatica e della ESLD

La storia naturale della cirrosi dipende dalla sua eziologia, da aspetti epidemiologici e dalle possibilità di trattamento. In generale la cirrosi è una patologia a prognosi infausta che evolve più o meno rapidamente, ma inesorabilmente verso la ESLD e/o il carcinoma epatocellulare. L'attesa di vita alla diagnosi è notevolmente migliorata rispetto a 50 anni fa quando meno del 20% dei pazienti era ancora vivo a 5 anni dalla diagnosi. L'incremento della sopravvivenza è in parte reale, cioè legato al miglioramento della terapia della malattia di base e delle sue complicanze e soprattutto dall'introduzione del trapianto di fegato che rappresenta l'unico approccio terapeutico in grado di modificare sostanzialmente la storia clinica e il destino dei pazienti, ma è altresì la conseguenza di una diagnosi più precoce. Nel XXI secolo circa la metà dei casi di cirrosi viene diagnosticato in fase pre-ascitica cioè in assenza di segni clinici di ipertensione portale.

Naturalmente la prognosi dipende da molti fattori: età, sesso, eziologia (e quindi possibilità di eliminare la causa ad esempio astenendosi dal consumo di alcolici) e soprattutto presenza e tipo di manifestazioni cliniche. In particolare, la comparsa dell'ascite rappresenta un punto cruciale nella storia naturale della cirrosi ed assume un preciso significato prognostico negativo: la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con cirrosi pre-ascitica varia dal 45 all'80%, mentre precipita al 15-40% in coloro che hanno sviluppato ascite.

Nei pazienti cirrotici, e segnatamente in quelli con malattia scompensata, la prognosi può essere stabilita con buona approssimazione tramite la classificazione di Child-Turcotte-Pugh (CTP) (Tabella n.1) in base alla quale si distinguono 3 classi (A, B, C) di gravità progressivamente crescente sulla base del punteggio che si ricava dalla valutazione semiquantitativa di alcuni parametri clinici e bioumorali che stimano il grado di insufficienza epatica e la presenza di complicanze maggiori (Tabella n.2). In linea generale viene riportata una sopravvivenza a 1 anno del 90% con un'aspettativa di vita di 15-20 anni per i pazienti in classe A, del 50-80% a 1 anno con un'aspettativa di vita che dipende sostanzialmente dalla possibilità di essere sottoposto a trapianto nei soggetti di classe B, inferiore al 20% ad un anno, con un'aspettativa di vita di 1-3 anni per i pazienti in classe C (14).

La classificazione di CTP, benché rappresenti il sistema prognostico più antico e più utilizzato, presenta alcuni limiti rappresentati in particolare dalla presenza nella stessa classe di rischio di malati anche molto diversi fra loro, dalla scarsa oggettività di alcuni parametri e dalla scarsa applicabilità in determinate situazioni cliniche, ad esempio nella cirrosi biliare primitiva dove l'iperbilirubinemia assume un significato differente rispetto ad altre epatopatie croniche. Allo scopo di superare tali limitazioni sono stati studiati e introdotti nuovi sistemi prognostici in alternativa, o più spesso in affiancamento alla classica classificazione di CTP.

Fra questi è oggi entrato in uso corrente il Model for End-stage Liver Disease (MELD) che ha il grande vantaggio di stratificare i pazienti secondo una scala continua progressiva di severità utilizzando tre parametri oggettivi quali: bilirubinemia, INR, creatininemia (15).

L'equazione usata per calcolare il MELD è la seguente:

$$[(0.975 * \ln(\text{creatininemia}) + 0.378 * \ln(\text{bilirubinemia totale}) + 1.120 * \ln(\text{INR}) + 0.643) * 10] .$$

Dal 2002 il MELD score, in origine introdotto per la previsione della mortalità precoce (3 mesi) in pazienti epatopatici candidati al posizionamento di shunt intraepatico porto-cava transgiugulare (TIPS), è usato nella maggior parte dei Centri Trapianti come strumento di allocazione degli organi e ha comportato una riduzione della mortalità in lista d'attesa (16).

Tabella 1 Classificazione di Child-Turcotte-Pugh

Score	1	2	3
Ascite	assente	lieve o controllata dai diuretici	modesta nonostante i diuretici
Encefalopatia	assente	grado I-II	grado III-IV
Bilirubina,mg/dL	<2	2-3	>3
Albumina, g/dL	>3,5	3,5-2,8	<2,8
INR	<1,7	1,7-2,3	>2,3

Tabella 2 Classi di sopravvivenza previste dal CTP

Classe	A	B	C
Score totale	5-6	7-9	10-15
Sopravvivenza a 5 anni	75%	40%	20%

1.4 Il trapianto di fegato

Il trapianto di fegato (in inglese Orthotopic Liver Transplantation, OLT) cioè la sostituzione del fegato nativo, malato, con un fegato sano o con parte di esso da donatore cadavere o vivente, rappresenta la terapia di scelta per pazienti affetti da epatopatie acute o croniche in fase avanzata che non abbiano opzioni medico-chirurgiche alternative. L'indicazione si pone quando il paziente è in condizioni cliniche tali da rendere poco verosimile una sopravvivenza prolungata senza sostituzione d'organo, ma è ancora in grado di tollerare la procedura chirurgica.

In Italia si contano 23 Centri Trapianto distribuiti su tutto il territorio nazionale nei quali il numero dei trapianti di fegato è progressivamente e costantemente cresciuto dal 1982 (anno del primo trapianto di fegato) ad oggi tanto da superare in modo stabile i 1000 per anno con risultati eccellenti in termini di sopravvivenza del paziente e dell'organo (17). Secondo i dati ufficiali del Centro Nazionale Trapianti (CNT nel periodo 2000-2005, durante il quale sono stati eseguiti 4892 trapianti di fegato, la sopravvivenza a un anno è stata rispettivamente dell'82.4% per l'organo ed dell'87.2% per il paziente, con un trend in crescita (dal 75.2% ed 81.8% nel 2000 rispettivamente all'81.8% ed 87.1% nel 2005). Malgrado l'aumento del numero di trapianti di fegato, la numerosità dei pazienti in lista d'attesa è cresciuta parallelamente, raggiungendo i 1035 pazienti al 30/11/2012. Nonostante il notevole impegno clinico e organizzativo, il numero di donatori disponibili non è sufficiente a poter effettuare il trapianto in tutti i pazienti che ogni anno sono già in lista e a quanti vengono inseriti come nuovi casi. Questo significa che una certa quota di pazienti non riuscirà ad essere trapiantata in tempo in rapporto alla progressione e alla severità della malattia epatica. Nel 2011 in Italia il tempo di attesa medio per un trapianto di fegato è stato di 2.1 anni ed il tasso di mortalità in lista del 7.13% (17). Questi numeri da una parte sottolineano la validità complessiva del sistema trapianti di fegato,

dall'altro chiaramente indicano che c'è bisogno di trovare strategie alternative per poter ridurre ulteriormente la mortalità in lista di attesa per trapianto. Inoltre, non dobbiamo dimenticare che alcuni pazienti arrivano allo stadio terminale dell'epatopatia senza poter fruire del trapianto di fegato per la presenza di controindicazioni.

Le controindicazioni all'OLT si sono progressivamente ridotte negli ultimi anni.

Controindicazioni assolute:

- Neoplasie maligne extraepatiche in atto;
- Neoplasie maligne pregresse con risposta completa al trattamento e con follow-up ≤ 5 anni (salvo valutazione oncologica collegiale indicativa di basso rischio di recidiva neoplastica e/o metastasi);
- Trombosi portale neoplastica;
- Carcinoma epatocellulare primitivo al di fuori dei criteri di Milano o dei protocolli di downstaging;
- Colangiocarcinoma non resecabile al di fuori dei criteri stabiliti all'interno di specifici protocolli sperimentali;
- Insufficienza multiorgano;
- Grave ipertensione polmonare con PAM ≥ 45 mmHg, non correggibile con terapia medica;
- Sindrome epato-polmonare con saturazione $O_2 \leq 50\%$ in aria ambiente;
- Infezione da HIV al di fuori del Programma Nazionale di trapianto di fegato da cadavere in HIV;
- Malattie cardiovascolari e polmonari avanzate;
- Grave osteoporosi con fratture spontanee vertebrali e con impotenza funzionale;
- Livelli di HBV-DNA > 20000 UI/ml al momento del trapianto;
- Infezioni batteriche in atto sostenute da germi non identificati (tranne le infezioni dell'albero biliare in trattamento), per le quali è possibile adottare un'esclusione temporanea dalla lista attiva;

- Dipendenza attiva da stupefacenti o da alcol;
- Malattie psichiatriche gravi (schizofrenia, psicosi maggiori, severi disturbi della personalità);
- Mancata compliance del paziente;
- Disordine neurologico grave (malattia di Alzheimer, danni neurologici irreversibili, etc).

Controindicazioni relative:

- Condizioni di interesse chirurgico che possono compromettere o rendere più complessa l'esecuzione del trapianto stesso; in questa categoria rientrano complicanze derivanti da pregressi interventi chirurgici estesi su organi addominali oppure la presenza di trombosi portale parziale (non neoplastica): in questo caso gioca un ruolo determinante l'esperienza dei singoli centri;
- Condizioni cliniche generali come l'obesità ($BMI \geq 30$) o lievi coronaropatie non controindicano l'OLT in maniera assoluta. Analogamente nefropatie e pneumopatie lievi vanno discusse nel contesto del rapporto rischio/beneficio, prima di poter consentire l'inserimento in lista del paziente;
- Età: pazienti ben selezionati di età superiore a 60 anni hanno mostrato una sopravvivenza post-trapianto analoga a quella di pazienti di età più giovane. Tuttavia, in relazione alla ridotta disponibilità di organi da trapiantare la maggior parte dei Centri Trapianto italiani considera 65 anni come il limite massimo di età per l'inserimento in lista d'attesa. Negli ultimi 10-15 anni la migliore selezione dei pazienti e l'introduzione del MELD, la standardizzazione della tecnica chirurgica e della conservazione dell'organo prelevato da cadavere, l'utilizzo di una terapia immunosoppressiva sempre più efficace e sicura e lo sviluppo di un approccio interdisciplinare nella gestione dei pazienti candidati o sottoposti a trapianto, ha portato alla diffusione dell'OLT su scala sempre più ampia. Il progressivo successo ha

condotto inevitabilmente all'affollamento delle liste d'attesa, e di conseguenza alla discrepanza tra richiesta e disponibilità di fegati da trapiantare da parte di donatori cadavere e all'aumento della mortalità in lista d'attesa. Nel tentativo di aumentare il pool di fegati trapiantabili si è assistito all'utilizzo di fegati in precedenza non presi in considerazione perché provenienti da donatori subottimali o marginali, quali fegati steatosici o prelevati da donatori anziani (> 75 anni) o affetti da epatite HCV- o HBV-relata o dopo morte cardiaca. Sono state inoltre messe a punto tecniche chirurgiche che permettono il trapianto da donatore vivente e la possibilità di dividere il fegato da donatore cadavere in due parti funzionalmente autonome e trapiantabili (split liver) consentendo il trapianto di due riceventi con un unico donatore.

Pertanto il problema oggi più rilevante nella pratica del trapianto di fegato rimane l'accessibilità al trapianto.

2. Impiego delle cellule staminali in epatologia

La capacità del fegato di rigenerarsi è nota da tempo immemorabile. Il fegato dei mammiferi si caratterizza infatti per la sua peculiare capacità di mantenere costanti le sue dimensioni, anche in seguito a grave perdita della massa epatica quale si verifica dopo resezione chirurgica o in seguito a danno tossico, ischemico o virale (18). Tale capacità è stata per la prima volta dimostrata nel 1931 da Higgins e Anderson nel 1931 in un modello sperimentale murino di epatectomia parziale (19) nel quale alla asportazione chirurgica di 2/3 della massa epatica seguiva una rapida crescita del fegato residuo con rigenerazione dell'organo in circa una settimana.

La rigenerazione epatica è regolata da meccanismi molecolari ancora non del tutto conosciuti, ma può essere definita un fenomeno di tipo compensatorio dato che la massa finale del fegato rigenerato è in

funzione delle necessità dell'organismo e che comunque la rigenerazione cessa una volta ripristinata la massa epatica originaria (20).

2.1 Definizione di cellule staminali

A tutt'oggi non esiste ancora una definizione onnicomprensiva e puntuale delle cellule staminali. Con una buona dose di approssimazione si può definire una staminale come *“una cellula che si divide (di solito raramente) dando origine a due cellule diverse tra loro: una cellula figlia è uguale alla cellula madre (staminale) mentre l'altra cellula figlia è diversa (progenitore) e, anche se può dividersi numerose volte, non può più farlo indefinitamente (perdita della staminalità) e prima o poi tutta la sua progenie differenzierà in un solo tipo (cellula staminale unipotente) o in diversi tipi (cellula staminale multipotente) di cellule differenziate”*

Questa definizione è solo teorica poiché non sono disponibili marcatori molecolari che permettano di distinguere tra loro le due cellule figlie di una cellula staminale. E' dunque possibile derivare questa definizione solo da saggi funzionali retrospettivi.

L'unica cellula totipotente in grado cioè di dare origine a tutti i tessuti embrionali ed extraembrionali è lo zigote, originato dalla fusione del gamete maschile con il gamete femminile. Dopo diversi cicli di divisioni cellulari, le cellule che derivano dallo zigote, all'inizio tutte uguali, differenziano nel trofoblasto, da cui origineranno placenta e tessuti extraembrionali, e nella massa cellulare interna, che formerà l'embrione. Le cellule della massa cellulare interna sono definite come pluripotenti, cioè in grado di differenziare in cellule appartenenti a tutti i tessuti dell'organismo, quindi di derivazione mesodermica, endodermica e ectodermica, fatta eccezione per i tessuti extraembrionali. Vengono invece definite multipotenti perché capaci di dare origine ad un numero limitato di cellule differenziate, le cellule

staminali presenti negli organi, quindi in tessuti adulti, che garantiscono all'organo un elevato potenziale rigenerativo anche in seguito ad un danno. In alcuni tessuti adulti sottoposti a continuo rinnovamento, quali ad esempio gli epiteli, sono presenti anche cellule staminali definite unipotenti, che possiedono cioè capacità di dare origine ad un solo tipo cellulare appartenente al tessuto di residenza.

Le cellule staminali possono anche essere suddivise a seconda del tipo di tessuto di derivazione in due categorie: le cellule staminali embrionali che vengono isolate dalla massa cellulare interna della blastocisti prima dell'impianto in utero e le cellule staminali adulte ottenute da qualsiasi tessuto di un organismo dopo la nascita. Le cellule staminali adulte sono presenti in molti e forse in tutti gli organi dei mammiferi, anche se il loro numero si riduce probabilmente con l'età. Le cellule staminali adulte (Adult Stem Cell, ASC) a differenza delle staminali embrionali, sono poche, solitamente raggruppate e localizzate in "nicchie" e difficili da isolare in gran numero. Vengono tradizionalmente definite staminali multi potenti perché in grado di differenziare in un numero limitato di tipi cellulari adulti. Esse, infatti, danno principalmente origine a nuove cellule proprie del tessuto dove risiedono, mantenendo, così, il normale ricambio cellulare e l'omeostasi dell'organo. In caso di danno possono anche contribuire alla rigenerazione tissutale con cellule di nuova formazione. Ciascun tessuto pertanto sembra possedere una popolazione staminale residente che contribuisce al mantenimento del tessuto. Questo tipo cellulare è l'unico ad essere fino ad ora usato a scopo terapeutico.

Fino al 1998 si ritenevano totipotenti (cioè capaci di dare origine a tutte le cellule dell'organismo) le cellule staminali embrionali e unipotenti le cellule staminali adulte, a seconda che dessero origine ad un solo o a più tipi cellulari, comunque propri del tessuto di residenza. In quell'anno fu pubblicato il primo di una serie di articoli che nel giro di due anni hanno modificato profondamente il concetto di potenzialità della cellule staminali adulte ed introdotto il concetto di plasticità. Cellule staminali del midollo osseo, che normalmente danno

origine alle cellule mature del sangue, possono, in opportune condizioni e con bassa frequenza, dare origine a cellule muscolari scheletriche, cardiache o lisce, neuroni, epatociti e cellule epiteliali. Per di più cellule staminali neurali possono dare origine a cellule del sangue, cellule muscolari scheletriche e a molti altri tipi cellulari quando trapiantate in un embrione di pollo. Questo fenomeno, definito plasticità ed esteso anche ad altri tipi di cellule staminali (mesenchimali, o isolate dal derma o dalla sinovia) ha importanti implicazioni applicative ma anche politiche ed etiche. In molte malattie genetiche o acquisite in età matura, le cellule staminali residenti nel tessuto colpito potrebbero essere state distrutte dal processo patologico o aver esaurito la loro capacità proliferativa e non essere quindi più disponibili per contribuire alla rigenerazione tissutale. In questi casi sarebbe utile poter isolare le cellule staminali da un altro tessuto, non colpito dalla malattia e utilizzarle per riparare il tessuto lesa, dopo averle indotte a differenziare nel tipo cellulare necessario.

2.2 La rigenerazione epatica

Sebbene universalmente accettata l'ipotesi che il fegato possa rigenerare, rimane ancora oggetto di controversie quale sia il meccanismo della rigenerazione epatica e quali siano le cellule deputate a tale funzione. Si ritiene che esistano tre tipi di cellule in grado di ripristinare la massa epatocitaria: gli epatociti stessi, alcune cellule staminali intraepatiche e cellule staminali circolanti.

Gli epatociti maturi, pur essendo cellule che fisiologicamente presentano un basso turn over cellulare e che si dividono raramente, sono però in grado di rigenerare il tessuto epatico in seguito ad una lesione. In topi transgenici nei quali gli epatociti residenti vanno incontro a continua distruzione epatociti trapiantati sono in grado di replicare anche più di 70 volte con conseguente ripopolamento

dell'organo. Anche gli epatociti maturi umani hanno dimostrato una robusta capacità rigenerativa, ripopolando dopo il trapianto fino al 90% del fegato di topi uPA-SCID. Nell'uomo però numerose condizioni patologiche sono tali da compromettere le capacità rigenerative degli epatociti maturi i quali peraltro hanno un potenziale proliferativo limitato che probabilmente non è sufficiente per ripopolare il fegato. Pertanto, l'attenzione si è focalizzata sulle cellule staminali le quali per la loro peculiare multipotenzialità differenziativa e maturativa contribuirebbero all'espansione clonale di una popolazione di progenitori epatici. E' questa la cosiddetta "streaming liver hypothesis" (21).

Marcando epatociti maturi con una proteina fluorescente Willenbrind e colleghi (22) hanno dimostrato che tali cellule sono responsabili sia del rinnovamento cellulare durante la normale omeostasi epatica che della rigenerazione dell'organo dopo epatectomia parziale. Quando però il fegato è compromesso o danneggiato entrerebbero in gioco cellule staminali e progenitori epatici (23-24).

Pertanto oggi si ritiene che nel fegato sano la rigenerazione sia dovuta agli epatociti maturi, mentre in caso di perdita cellulare severa venga indotta l'attivazione di cellule progenitrici localizzate nelle più piccole diramazioni biliari intraepatiche, chiamate cellule ovali (in inglese "oval cells"), capaci di dare origine sia agli epatociti che a biliociti. Esse costituiscono un compartimento cellulare silente, sono piccole e ovoidali, hanno citoplasma scarso e basofilo e nucleo blu pallido ed esprimono alcuni antigeni come il CD34 e il c-Kit che sono fortemente associati al fenotipo delle cellule staminali ematopoietiche (25-26).

Negli ultimi anni infine molti lavori hanno suggerito che ci sia un coinvolgimento nella rigenerazione epatica anche da parte di cellule staminali extraepatiche.

Studi recenti hanno dimostrato in particolare che le cellule staminali emopoietiche presenti nel midollo osseo possiedano un elevato grado di plasticità funzionale. Petersen et al. (27) sono stati i primi a

domandarsi se cellule ovali piuttosto che altre cellule epatiche potessero derivare dal midollo osseo. Per rispondere hanno utilizzato due modelli sperimentali paralleli, entrambi nel ratto; il trapianto di midollo osseo e il trapianto di fegato. Nel primo caso cellule midollari maschili sono state trapiantate in riceventi femmine letalmente irradiate: cellule ovali positive per il cromosoma Y sono state rilevate già dopo 9 giorni e hanno iniziato a differenziarsi in epatociti dopo 13 giorni. Nel secondo esperimento ratti Lewis, che avevano subito un trapianto di fegato da ratti Brown Norway, presentavano a livello dei dotti biliari dell'organo trapiantato cellule di entrambi i ceppi, ad indicare che l'epitelio biliare si rinnovava in parte grazie a cellule autoctone dell'organo trapiantato e in parte grazie a cellule di provenienza dal ricevente stesso, probabilmente cellule midollari circolanti.

Studi successivi hanno confermato la possibile origine midollare degli epatociti anche nell'uomo. L'uso di tecniche di ibridizzazione *in situ* per il cromosoma Y ha consentito di analizzare il fegato di donne che erano state sottoposte a trapianto di midollo osseo da donatori di sesso maschile portando alla dimostrazione che dal 4% al 43% degli epatociti e dal 4% al 38% dei colangiociti avevano un'origine extraepatica (28-29).

Le ricerche più recenti hanno evidenziato che sia le cellule staminali emopoietiche che le cellule staminali mesenchimali possono differenziare in epatociti. Nel caso delle cellule emopoietiche sarebbe in particolare la frazione CD34⁺ a possedere capacità epatocitaria, mentre le cellule mesenchimali sarebbero in grado di differenziare in cellule simil epatiche sia in toto che nella frazione multi potente costituita dalle Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs). In molti casi tuttavia più che di un vero e proprio differenziamento sembrerebbe essere avvenuta la fusione tra cellule staminali extraepatiche e epatociti dell'ospite (29-32). La capacità di tali cellule di differenziare in vivo è stata testata per lo più in modelli animali di danno epatico. Numerosi studi sono stati condotti trapiantando cellule

staminali di derivazione midollare in diversi modelli di danno epatico: epatectomia, danno da agente chimico quale alcool allilico o tetracloruro di carbonio o malattie genetiche portando a risultati molto promettenti in termini di rigenerazione della massa epatica funzionante e ripresa della funzionalità (34-36). Sakaida et al. hanno dimostrato che il trapianto di cellule midollari, in topi con danno epatico da tetracloruro di carbonio, favoriva la degradazione delle fibre collagene e la riduzione significativa della fibrosi, con una forte espressione delle metalloproteinasi, soprattutto la 9 (MMP-9) e con una riduzione della mortalità (37).

Tuttavia, il successo dell'utilizzo in vivo delle cellule staminali ematopoietiche e/o mesenchimali è fortemente condizionato dalla loro specifica localizzazione nei tessuti dopo trapianto. La capacità delle cellule di raggiungere e attecchire nei tessuti è definito come "homing". In questo processo, non ancora del tutto chiarito, interverrebbero citochine e chemochine. E' noto che lo "stromal derived factor-1" (SDF-1) favorisce l'homing tanto che la sua inibizione impedisce l'attecchimento di cellule trapiantate (38). In caso di danno epatico ad esempio si osserva un aumento dei livelli circolanti sia di SDF-1 che di "hepatocyte growth factor" (HGF) che avrebbe il significato di contribuire al reclutamento di cellule midollari promuovendone l'attecchimento nel fegato. Le cellule CD34⁺, infine, avrebbero la capacità di migrare in tessuti non ematopoietici anche in risposta a segnali di stress (38).

Sicuramente fattori endocrini e paracrini giocano un ruolo critico per la rigenerazione epatica e la letteratura si sta arricchendo di studi sul microambiente, soprattutto sulle cosiddette cellule "non parenchimali" e sulla matrice extracellulare (39-41). In particolare le cellule endoteliali supporterebbero la normale proliferazione endoteliale e, come intuibile, influenzerebbero la rivascolarizzazione del fegato in rigenerazione (42). Anche le cellule stellate, le cellule di Kupffer e i linfociti intraepatici invierebbero segnali agli epatociti in rigenerazione (23). E' probabile che un fegato con un microambiente

alterato possa interferire con i processi di differenziazione, attecchimento e rigenerazione.

Liu et al. dopo aver isolato epatociti da ratti sani come pure da ratti affetti da cirrosi, sia compensata che scompensata (43) hanno effettuato esperimenti di ripopolamento osservando come sia gli epatociti di ratti normali sia quelli di ratti cirrotici compensati fossero in grado di attecchire e proliferare immediatamente nel normale microambiente del fegato del ricevente, mentre gli epatociti di ratti con cirrosi scompensata iniziavano a “funzionare” solo dopo almeno due mesi di residenza nel fegato del donatore.

Una citochina molto studiata è il “granulocyte-colony stimulating factor” (G-CSF) il fattore di crescita granulocitario in grado di mobilitare le cellule staminali ematopoietiche (44).

In modelli murini di danno epatico acuto e cronico da tetracloruro di carbonio Piscaglia et al. (73) hanno dimostrato che la somministrazione di G-CSF allo scopo di indurre la mobilitazione delle cellule staminali sarebbe in grado di promuovere l’attecchimento di precursori midollari nel fegato, migliorare il danno istologico e accelerare il processo di rigenerazione, con notevole miglioramento della funzione epatica e allungamento della sopravvivenza dei topi trattati rispetto ai non trattati. Gli Autori in realtà concludevano che tali benefici effetti erano legati soprattutto al fatto che il G-CSF fosse soprattutto in grado di promuovere meccanismi di riparazione endogeni. Esperimenti successivi hanno dimostrato che il G-CFS è in grado anche di stimolare la proliferazione delle cellule ovali (46).

Alcuni studi condotti su piccole casistiche hanno dimostrato che la terapia con G-CSF è in grado di mobilitare cellule staminali ematopoietiche in numero significativo anche in pazienti affetti da cirrosi epatica (47-49).

2.3 Cellule staminali CD133⁺

Il CD 133 (prominina -1) è stato il primo dei membri della famiglia delle prominine ad essere identificato. Le prominine sono delle proteine pentameriche di membrana. Le specifiche funzioni e il ligando del CD133 non sono ancora stati identificati, è noto comunque che il CD133 è topograficamente espresso nelle protrusioni della membrana plasmatica, come i microvilli epiteliali e le stereocilia dell'epitelio dei dotti epididimali.

Nel 1997 Yin et al. hanno messo a punto un anticorpo monoclonale specifico per la l'antigene AC133 (un epitopo del CD133 che viene glicosilato) che ha consentito di dimostrarne l'espressione da parte di cellule progenitrici CD34⁺, derivanti dal sangue di individui adulti, midollo osseo e fegato fetale; ciò ha suggerito la sua funzione come marcatore di cellule progenitrici ematopoietiche (50). CD133 pertanto è oggi considerato un marcatore di cellule progenitrici ematopoietiche più primitivo del CD34 non essendo espresso né da cellule endoteliali e né da fibroblasti (50). Le cellule CD 133⁺ inoltre sono capaci di ripopolare il midollo osseo di animali trapiantati (50).

Lo studio del DNA e la distribuzione tissutale dell'AC133 hanno dimostrato che si tratta di un polipeptide a singola catena di 865 aa, con un peso molecolare di 120 kD (51). Il DNA codifica per una proteina transmembrana con porzione N-terminale extracellulare e C-terminale intracitoplasmatica, e due anse extracellulari con 8 siti di glicosilazione.

Nel 2005 Florek et al. hanno creato un anticorpo monoclonale capace di riconoscere il CD133, indipendentemente dalla glicosilazione che ne ha permesso l'identificazione non solo nelle protrusioni di membrana, ma anche in organi quali rene, mammella, trachea, ghiandole salivari, placenta, pancreas, tratto digestivo e testicoli (52). Si ritiene pertanto che l'espressione dell'AC133 sia limitata a cellule non differenziate, mentre quella del CD133 non glicosilato venga mantenuta al momento della differenziazione cellulare.

La presenza del CD133 sui progenitori ematopoietici del midollo osseo ha fatto nascere l'ipotesi che il CD133 possa essere un marcatore di cellule staminali adulte (53,54). Il CD 133 è espresso dall'80% delle cellule CD34⁺ e le cellule CD133⁺/CD34⁺ hanno un'elevata capacità clonogenica e un più alto tasso di attecchimento rispetto alle CD133⁻/CD34⁺ (55-56). Le cellule CD133⁺, inoltre, possono essere coltivate in vitro esattamente come le cellule CD34⁺ o le c-kit⁺ (57-58), suggerendo, in questo modo che condividano gli stessi fattori di crescita.

Lang et al. hanno per primi dimostrato il beneficio del trapianto allogenico di cellule CD133⁺: l'iniezione di cellule CD133⁺ e CD34⁺ da donatori in 10 pazienti ematologici, permetteva la ricostituzione completa dell'emopoiesi, con una minore deplezione delle cellule T in caso di trapianto di cellule CD133⁺ (59).

Studi successivi hanno portato ad ipotizzare che le cellule staminali CD133/AC133, se trapiantate, possano attecchire e differenziare anche in cellule non ematopoietiche adulte, offrendo potenzialità terapeutiche. Insieme al potenziale ematopoietico, infatti, le cellule CD133⁺ circolanti danno origine anche alla linea endoteliale e possono contribuire alla neoangiogenesi dopo ischemia tissutale e alla rigenerazione parenchimale in modelli animali (60-62).

Il CD 133 è espresso anche da cellule staminali embrionali (63), cellule staminali neurali fetali umane, con potenziale di riparare il tessuto neurale danneggiato (64), cellule non ematopoietiche (65) e progenitori epatici che possono differenziare *in vitro* e *in vivo* in cellule staminali simili a quelle embrionali, con caratteristiche del mesoderma viscerale, neuroectoderma e endoderma (66).

Recentemente è stato trovato che cellule CD133⁺ possono differenziare in miociti, cardiomiociti, epitelio renale, epitelio neurale, cheratinociti, cellule acidari prostatiche, isole pancreatiche (67).

Il potenziale differenziativo delle CD133⁺ è stato rinforzato dalla scoperta che cellule CD133⁺/CD14⁺, mobilizzate nel sangue periferico

di donatori sani, sono capaci di differenziare *in vitro*, in epatociti anche in risposta ad un danno tissutale (68-69).

Le potenzialità differenziative in senso epatocitario delle cellule CD133⁺ sono state valutate anche in vivo su piccole casistiche di pazienti epatopatici. In particolare cellule staminali del midollo osseo CD133⁺ sono state selezionate e reinfuse attraverso la vena porta a pazienti in lista per resezione epatica al fine di accelerare la rigenerazione epatica (70-71). L'infusione di cellule CD133⁺ è stata ben tollerata senza effetti collaterali e la volumetria epatica eseguita con tecnica di TC-scan ha rivelato un incremento del tasso di proliferazione medio 2.5 volte superiore rispetto a quello di un gruppo di controllo.

2.4 Esperienze cliniche sull'uso terapeutico di cellule staminali in pazienti affetti da cirrosi epatica

I 14 studi (72-85) presenti in letteratura nei quali sono state valutate la sicurezza di impiego e l'efficacia del trapianto di cellule staminali nella terapia della cirrosi epatica si basano tutti sull'uso di cellule autologhe di derivazione midollare (Tabelle n.3 e n.4).

Si tratta tuttavia di esperienze cliniche limitate e molto eterogenee per disegno, obiettivi, criteri di inclusione, caratteristiche dei pazienti e grado di compromissione della funzione epatica, eziologia e follow-up. Inoltre le casistiche sono molto esigue tanto che solo in 4 studi il numero di pazienti arruolato era superiore a 10 (79,81,82,85) e solo in un caso era previsto un gruppo di controllo randomizzato (79,81).

I risultati sono pertanto difficilmente confrontabili e inconsistenti e non è possibile al momento tirare delle conclusioni.

Nel 2006 Terai et al. (72), hanno sottoposto 9 pazienti epatopatici ad aspirato midollare e successiva reinfusione di cellule mononucleate per via venosa periferica in assenza di effetti collaterali. A 24 settimane dalla reinfusione venivano riportati un aumento della sintesi

di albumina e un miglioramento del CPT score. Inoltre alla biopsia epatica eseguita a 4 settimane dalla reinfusione si osservava un significativo incremento della alfafetoproteina, indicativo di rigenerazione epatocitaria.

Nello stesso anno Levicar et al. (73), hanno trattato 5 pazienti con G-CSF e quindi reinfuso nella vena porta o nell'arteria epatica le cellule staminali CD34⁺ raccolte mediante leucoaferesi. Nonostante la sostanziale assenza di effetti collaterali, a 18 mesi (74) non si osservava nessun miglioramento, né clinico né laboratoristico. Stessi risultati negativi in termini di efficacia sono stati ottenuti nel 2007 da Mohamadnejjar et al. (75) in uno studio simile condotto su 4 pazienti. Venivano per contro riportati due eventi avversi gravi quali una nefropatia da contrasto e una sindrome epato-renale.

Nel 2008 Pai et al. (76), hanno reinfuso in arteria epatiche cellule CD34⁺ prelevate da 9 pazienti affetti da epatopatia alcolica dopo terapia mobilizzante e a successiva leucoaferesi. A 3 mesi di distanza, in assenza di effetti collaterali degni di nota, si registrava un miglioramento statisticamente significativo della bilirubina, ma soprattutto dello score CTP.

L'anno successivo Kharaziha et al. (77), sono tornati alla raccolta di cellule mononucleate mediante aspirazione midollare e successiva reinfusione di cellule mononucleate nella vena porta. Anche in questo piccolo studio gli 8 pazienti trattati non hanno presentato effetti collaterali severi e, a 24 settimane, presentavano un miglioramento dei valori di creatinina e di INR e quindi dello score di MELD.

Lyra et al. (78-79) hanno pubblicato due studi il primo nel 2007 su 10 pazienti, il secondo nel 2010 su 30 pazienti, randomizzato in 15 trattati e 15 controlli. Lo schema di trattamento era identico: aspirazione midollare, con successiva reinfusione di cellule mononucleate in arteria epatica. In entrambi gli studi non sono stati riportati eventi avversi maggiori (descritto un unico caso di ematoma nel sito della puntura arteriosa). Circa l'efficacia in termini di funzione epatica, nel primo non si sono verificate modifiche

sostanziali, mentre nel secondo a 3 mesi di follow-up nel gruppo trattato CTP score e livelli di albumina mostravano un miglioramento significativo. Lo score di MELD, stabile nel gruppo trattato, aumentava nel gruppo non trattato anche se differenza non raggiungeva la significatività statistica.

Nel 2010 Kim et al. (80) hanno sottoposto ad aspirazione midollare e successiva reinfusione di cellule mononucleate attraverso una vena periferica 10 pazienti affetti da cirrosi epatica HBV-relata in stadio avanzato (classe B o C di CTP). Clinicamente questi pazienti hanno mostrato un miglioramento sostenuto per 6-12 mesi di albumina, colesterolo e tempo di protrombina con una riduzione dello score CTP a partire dal sesto mese. Il dato interessante di questo studio riguarda la valutazione dell'istologia epatica al primo, terzo e sesto mese dalla procedura rispetto al dato basale. In tutti i pazienti è stato documentato un significativo aumento dei progenitori epatici che raggiungeva il picco a 3 mesi, per diminuire al sesto, mentre la proliferazione epatocitaria seppure incrementata non raggiungeva la significatività statistica.

Nello studio numericamente più rappresentativo, Salama et al. (81) hanno randomizzato 140 pazienti in 2 gruppi di trattamento (90 trattati vs 50 placebo). Il trattamento prevedeva la somministrazione di G-CSF, ma le cellule CD34⁺ o CD133⁺ venivano raccolte attraverso aspirazione midollare e quindi reinfuse nella vena porta. Anche in questo caso non sono stati descritti effetti collaterali degni di nota. Dopo 6 mesi nel gruppo di trattamento rispetto al gruppo di controllo è stato rilevato un miglioramento significativo di bilirubina, albumina, transaminasi, protrombina, riduzione del versamento ascitico valutato ecograficamente, CPT score, performance status score. Inoltre sempre dopo 6 mesi nel gruppo di trattamento si registravano 9 decessi rispetto ai 26 del gruppo di controllo. Qualche anno prima questi stessi Autori (82) avevano condotto uno studio retrospettivo che pur documentando un miglioramento dei parametri di funzionalità epatica a distanza anche di 12 mesi dalla procedura, riportava tre eventi

avversi gravi: due emorragie digestive, una delle quali letale, e un emoperitoneo.

Il crescente interesse nei confronti delle potenziali applicazioni della terapia cellulare nell'insufficienza epatica è dimostrato dall'aumento dei lavori clinici a riguardo registrato negli ultimi due-tre anni. Nel 2011 infatti sono stati pubblicati tre studi. Nikeghbalian et al. (83) hanno trattato 6 pazienti con cellule mononucleate o CD133⁺ prelevate tramite aspirazione midollare e reinfuse attraverso la vena porta. Il trattamento in 24 mesi di follow-up non ha determinato effetti collaterali né prodotto effetti clinici.

Couto et al. (84) hanno valutato non solo la sicurezza di impiego e l'efficacia, ma anche la cinetica, mediante scintigrafia, di cellule mononucleate marcate con 99mTc e reinfuse nell'arteria epatica di 8 pazienti. A 3 e 24 ore dalla reinfusione, il 41% e il 32% rispettivamente delle cellule reinfuse si trovava nel fegato. A un mese di follow-up bilirubina e albumina risultavano significativamente migliorati mentre INR, MELD e CTP presentavano un trend positivo anche se non significativo. A un anno di FU inoltre, non si registrava alcun aumento del MELD. Circa la sicurezza di impiego da segnalare un caso di dissecazione dell'arteria epatica e un caso di sindrome di Tako-Tsubo.

Infine Peng et al. (85), hanno trattato 53 pazienti con un numero non specificato cellule mononucleate, prelevate attraverso aspirato midollare e reinfuse attraverso l'arteria epatica in assenza di effetti collaterali, ma anche di benefici di sorta.

Tabella 3 Esperienze cliniche di terapia cellulare in pazienti cirrotici

Auore ed anno	Tipo di studio	Eziologia	N pz	G-CSF	Tipo di raccolta e tipo di cellule	Via di reinfusione e numero di cellule	Follow-Up
Peng 2011 (85)	Prospettico controllato non randomizzato	HBV	53	No	Aspirato midollare	Arteria epatica Numero infuso non specificato, numero isolato $3.4 \pm 3.8 \times 10^8$	192 settimane
					MSCs		
Couto 2011 (84)	Prospettico	Mista	8	No	Aspirato midollare	Arteria epatica $2.0-15.0 \times 10^8$	12 mesi
					MNCs		
Nikeghbalian 2011 (83)	Prospettico	Mista	6	No	Aspirato midollare	Vena porta MNCs $1,31 \pm 0,14 \times 10^9$ CD133+ $6.4 \pm 3.2 \times 10^6$	24 mesi
					MNCs CD133+		
Salama 2010 (81)	Prospettico controllato randomizzato	HCV	90	Si	Aspirato midollare	Vena porta $0,5 \times 10^8$	12 mesi
					CD34+ CD133+		
Salama 2010 (82)	Retrospektivo	HCV Autoimmune	48	Si	Leucoferesi	Vena porta o arteria epatica 10^8	6 mesi
					CD34+		
Kim 2010 (80)	Prospettico	HBV	10	No	Aspirato midollare	Vena periferica 0.995×10^8	12 mesi
					MNCs		
Lyra 2007 (78) and 2010 (79)	Prospettico controllato randomizzato	Mista	15	No	Aspirato midollare	Arteria epatica Da 0.88×10^8 a 11.2×10^8	12 mesi
					MNCs		
Kharaziha 2009 (77)	Prospettico	Mista	8	No	Aspirato midollare	Vena porta $0.3 - 0,5 \times 10^8$	24 settimane
					MSCs		
Pai 2008 (76)	Prospettico	Alcol	9	Si	Leucoferesi	Arteria epatica $2,3 \times 10^8$	3 mesi
					CD34+		
Gordon 2006 (73), Levicar 2008 (74)	Prospettico	Mista	5	Si	Leucoferesi	Vena porta o arteria epatica $1 \times 10^6 - 2 \times 10^8$	12-18 mesi
					CD34+		
Mohamadnejad 2007 (75)	Prospettico	Mista	4	No	Aspirato midollare	Arteria epatica $3 - 10 \times 10^6$	6 settimane
					CD34+		
					MNCs		
Terai 2006 (72)	Prospettico	Mista	9	No	Aspirato midollare	Vena periferica $5.20 \pm 0.63 \times 10^9$	24 settimane
					MNCs		

MSCs: Mesenchimal Stem Cells; MNCs: Mononuclear Cells

Tabella 4 Efficacia ed effetti collaterali di studi clinici pubblicati

Autore	Tipo di cellule reinfuse	Miglioramento degli esami bioumorali osservato e relativa tempistica	Miglioramento dati clinici osservato e relativa tempistica	Effetti collaterali	
Peng (85)	MSC	Bilirubina 3 mesi *	MELD 9 mesi	Assenza di effetti collaterali gravi	
Couto (84)	MNC	Bilirubina 1 mese # Albumina 1 mese #	MELD, CTP 1 mese	1 dissezione dell'arteria epatica, 1 sindrome di Tako Tsubo	
Nikeghbalian (83)	MNC/ HSC	Nessuna modifica significativa	Nessuna modifica significativa	Assenza di effetti collaterali gravi	
Salama (81)	HSC	Bilirubina 6 mesi * Albumina 6 mesi* ALT AST 6 mesi* PC 6 mesi *	CTP, grado di ascite (US), coma epatico, ematemesi * 6 mesi	Assenza di effetti collaterali gravi	
Salama (82)	HSC	Gruppo HCV #	Gruppo AIH	Ascite 6 mesi#	1 ematemesi 1 emoperitoneo 1 emorragia gastrointestinale
		Bilirubina 3 mesi ALT 12 mesi INR 9 mesi Albumina 12 mesi	Bilirubina 12 mesi ALT 12 mesi INR 12 mesi Albumina 12 mesi		
Kim (80)	MNC	Albumina 6 mesi# Emoglobina 12 mesi# Colesterolo 12 mesi# PT 6 mesi#	CTP 6 mesi#	Assenza di effetti collaterali importanti	
Lyra (79)	MNC	Albumina 3 mesi *	CTP 3 mesi*	Assenza di effetti collaterali importanti	
Kharaziha (77)	MSC	INR 24 settimane # Creatinina 24 settimane #	MELD 24 settimane #	Assenza di effetti collaterali importanti	
Pai (76)	HSC	Bilirubina a 12 settimane# ALT AST 1 settimana #	CTP e ascite	Assenza di effetti collaterali importanti	
Levicar (74)	HSC	Nessuna modifica significativa	-	Trombocitopenia dopo leucoaferesi	
Mohamadnejad (75)	HSC	Nessuna modifica significativa	-	1 nefropatia radiologica e sindrome epato-renale	
Lyra (78)	MNC	Nessuna modifica significativa	-	Assenza di effetti collaterali importanti	
Terai (72)	MNC	Albumina sierica 24 settimane #	CPT 24 settimane #	Assenza di effetti collaterali importanti	
Gordon (73)	HSC	Nessuna modifica significativa	-	Trombocitopenia dopo leucoaferesi	

MSC: Mesenchymal Stem Cells; MNC: Mononuclear Cells; HSC: Hematopoietic Stem Cells

PC Concentrazione di protrombina

statisticamente significativo rispetto al basale

* statisticamente significativo rispetto al gruppo di controllo

CPT: Child-Turcotte-Pugh; MELD: Model for End-Stage Liver Disease; ALT: Alanino-aminotransferasi; AST: Aspartico-aminotransferasi; INR: International Normalized Ratio

Capitolo II: Studio di fase I sulla reinfusione intraepatica di cellule staminali CD 133+ altamente purificate nei pazienti con malattia epatica terminale.

1. Introduzione e scopi

Il trapianto di fegato rappresenta oggi l'unica terapia possibile per le patologie epatiche terminali. Tuttavia, solo una parte dei pazienti rientra nei criteri per essere sottoposto a trapianto di fegato e, tra i possibili candidati, un numero ancora molto rilevante e inaccettabile muore in lista d'attesa a causa della gravità della malattia e soprattutto della scarsità di organi disponibili. In questo scenario è di imprescindibile necessità la ricerca di strategie terapeutiche alternative al trapianto. Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente entusiasmo nei confronti delle cellule staminali per la potenziale possibilità di rigenerare il tessuto epatico danneggiato "dall'interno" ricorrendo ad una procedura solo minimamente invasiva. Le evidenze sperimentali maturate a riguardo suggeriscono che cellule staminali extra-epatiche, in particolare quelle di derivazione midollare emopoietica siano coinvolte nei processi di rigenerazione epatica. Gli studi in vivo a tutt'oggi sono pochi e i risultati del tutto preliminari, ma sembrerebbero indicare che l'infusione, locale o sistemica, di cellule staminali di derivazione midollare in pazienti affetti da epatopatie in stadio avanzato sia una procedura sicura, ben tollerata e in grado di migliorare alcuni parametri di funzione epatica.

In una precedente esperienza, il nostro gruppo di ricerca (48) ha dimostrato che la somministrazione di G-CSF a pazienti affetti da cirrosi epatica è in grado di mobilitare cellule staminali CD133⁺ nel sangue periferico al pari di quanto si osserva nel soggetto sano. Benché le dosi necessarie alla mobilitazione siano superiori il trattamento è comunque privo di effetti collaterali e, rispetto al

prelievo di midollo osseo, rappresenta un modo più semplice e meno traumatico, per ottenere cellule staminali autologhe. Le cellule staminali midollari CD133⁺ oltre a dare origine a cellule della serie emopoietica hanno anche un potenziale differenziativo in senso endoteliale, in questo senso sono in grado di contribuire alla neoangiogenesi nell'ischemia tissutale e di aumentare la rigenerazione tissutale in modelli animali di danno d'organo (86-87).

Essendo espresso anche su linee di cellule embrionali, cellule neurali fetali e progenitori adulti multipotenti, l'antigene CD133 identifica verosimilmente una popolazione di cellule midollari multipotenti circolanti con maggiori capacità differenziative e di plasticità rispetto alle più conosciute, ma verosimilmente meno plastiche, cellule staminali emopoietiche CD34⁺. Partendo dalla precedente esperienza (48), nella quale avevamo utilizzato la leucoaferesi per ottenere cellule CD133⁺ dal sangue periferico di pazienti affetti da cirrosi epatica pretrattati con G-CSF a dosi mobilizzanti, si è deciso di continuare con questa linea di ricerca per valutare gli effetti sulla funzione epatica residua della reinfusione intraepatica di cellule autologhe CD133⁺.

L'obiettivo principale di questo studio consiste nel valutare la sicurezza di impiego della reinfusione intraepatica di un numero crescente di cellule staminali CD133⁺ autologhe, altamente purificate, ottenute, previa mobilizzazione con G-CSF, dal sangue periferico di pazienti affetti da cirrosi epatica con insufficienza epatica di grado severo. Come obiettivi secondari ci si propone di:

- verificare la fattibilità della separazione delle cellule CD133⁺ mediante selezione immunomagnetica del prodotto leucoferetico a partire dal sangue periferico dei pazienti pretrattati con G-CSF;
- valutare gli effetti della reinfusione intraepatica di cellule staminali CD133⁺ sulla funzione epatica residua attraverso il monitoraggio dell'andamento degli indici di funzionalità epatica e del Model for End-Stage Liver Disease (MELD).

Lo studio è stato condotto presso il reparto, gli ambulatori e il servizio di Day Service/Day Hospital dell'Unità Operativa di Semeiotica Medica, Azienda Ospedaliero Universitaria (AOU) Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna con la collaborazione dei seguenti centri:

- Unità Operativa di Ematologia "L.&A. Seràgnoli", AOU Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna;
- Unità Operativa di Medicina Trasfusionale, AOU Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna;
- Unità Operativa di Radiologia, AOU Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna;
- Cell Factory Calori, Fondazione IRCSS Ca Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

2. Pazienti e metodi

In questo studio monocentrico di fase I è previsto l'arruolamento di 12 pazienti affetti da cirrosi epatica in fase avanzata da sottoporre a somministrazione di G-CSF e successiva raccolta, purificazione e reinfusione intraepatica di cellule staminali CD133⁺ autologhe, altamente purificate.

Criteri di inclusione:

- Età >18 anni
- Cirrosi epatica clinicamente e/o istologicamente diagnosticata con MELD score compreso tra 17 e 25
- PT >30% o INR <2.5
- PLT >30x10⁹/L
- Creatinina <2 mg/dl
- SatO2 in AA > 95%

Criteri di esclusione:

- infezione da HIV e/o infezioni intercorrenti (ad eccezione delle infezioni da HBV o HCV)
- gravidanza e allattamento
- epatocarcinoma o altre neoplasie documentate in atto
- trombosi portale completa
- sindrome di Budd-Chiari
- splenomegalia di grado severo (diametro longitudinale valutato ecograficamente > 20 cm)

Essere in lista per Trapianto di Fegato non rappresenta un criterio di esclusione. D'altro canto l'arruolamento in questo studio non prevede né la rimozione né la sospensione dalla lista d'attesa.

Al momento dell'arruolamento ciascun paziente è sottoposto a valutazione clinica, ad ecografia dell'addome con Doppler dell'asse spleno-mesenterico-portale e alle seguenti indagini laboratoristiche: emocromo con formula, transaminasi (AST e ALT), latticodeidrogenasi (LDH), fosfatasi alcalina (FA), gamma-glutamiltanspeptidasi (GGT), bilirubina totale e frazionata, INR, creatinina, azotemia, calcio, sodio, potassio, glicemia, proteine totali ed elettroforesi,

2.1 Metodi

Lo studio si articola in due fasi di seguito descritte.

Fase di mobilitazione e raccolta delle cellule staminali:

Ciascun paziente arruolato è trattato con G-CSF (Lenograstim, Sanofi-aventis S.p.A. – Viale L. Bodio, 37/B - Milano) per via sottocutanea, alla dose di 15 µg/Kg/die, divisa in due somministrazioni giornaliere, fino ad ottenere un'adeguata mobilitazione di cellule CD133⁺ nel sangue periferico, tale da consentirne la raccolta mediante leucoaferesi

(almeno 8 cellule CD133⁺/μl). La conta del numero di cellule CD133⁺ circolanti viene eseguita con cadenza giornaliera a partire dal quarto giorno di terapia mobilizzante fino al momento della leucoaferesi.

Per la separazione delle cellule CD133⁺ dall'intero prodotto leucoferetico si utilizza la tecnica della separazione magnetica con microbiglie (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) (88).

Tale tecnica prevede l'incubazione del prodotto della leucoaferesi con anticorpi monoclonali murini contro il CD133 umano, coniugati con microsfele del diametro di 50 nm, di materiale superparamagnetico. Grazie alle piccole dimensioni, queste sfere non attivano la cellula e non saturano i recettori di superficie. Le microbiglie inoltre, non hanno bisogno di essere rimosse mediante lavaggio perché non sono tossiche e sono facilmente degradabili dalla cellula (secondo norme International Standard - ISO 10993 – e le linee guida USP per la biocompatibilità).

Il prodotto dell'incubazione viene poi posto a contatto con colonne contenenti una matrice composta di sfere ferromagnetiche ricoperte. Quando poste in un campo magnetico, le sfere amplificano il campo di 10.000 volte, in modo da creare un forte gradiente magnetico all'interno della colonna stessa. Ciò è fondamentale perché le cellule da selezionare sono legate soltanto a poche microbiglie.

Le cellule CD133⁺ isolate e purificate vengono congelate in una unità biologica di congelamento predisposta (CRYO 10-16, Planer, USA) alla velocità di 1°C/min fino a -40°C e successivamente alla velocità di 5°C/min fino a -100°C e conservate in azoto liquido. La criopreservazione ai fini della conservazione in azoto liquido viene realizzata utilizzando plasma autologo del paziente addizionato del 10% di metilsolfossido.

Fase di reinfusione delle cellule staminali:

Quattro settimane dopo la leucoaferesi (tempo necessario per le procedure di separazione), 30 mL di sospensione di cellule CD133⁺ sono reinfuse attraverso l'arteria epatica mediante arteriografia

transfemorale, in condizioni di asepsi. L'arteria femorale viene punta in anestesia locale con lidocaina subito al di sotto del legamento inguinale e successivamente incannulata consentendo di inserire un catetere nell'arteria epatica attraverso il quale reinfondere le cellule staminali a velocità di 5-6 ml/min, per evitare la formazioni di trombi. Per escludere complicanze vascolari è prevista un'ecografia con Doppler dell'asse spleno-mesenterico-portale a distanza di 24 ore dalla reinfusione.

Per dimostrare la sicurezza della reinfusione i pazienti vengono trattati con dosi incrementali di cellule staminali. In particolare si prevedono 4 gruppi costituiti da tre pazienti ciascuno da sottoporre rispettivamente a reinfusione di 50, 150, 400 e 1000 ($\times 10^3$) cell/Kg.

Per consentire l'espansione e l'attecchimento delle cellule staminali reinfuse, a partire dal giorno della reinfusione i pazienti vengono trattati con G-CSF per tre giorni consecutivi alla dose di 5 μ g/Kg.

I pazienti arruolati vengono sottoposti al seguente monitoraggio clinico laboratoristico e strumentale.

1) Valutazioni basali (tempo 0) eseguite sia prima della mobilizzazione con G-CSF che nelle 24 ore precedenti la procedura di reinfusione:

- esame obiettivo eseguito da un epatologo esperto in grado di valutare i segni clinici dell'insufficienza epatica (i.e edemi periferici, ascite, encefalopatia epatica, ittero...)

- esami di laboratorio: conta bianchi, parametri di funzione epatica e renale necessari per calcolare lo score MELD e lo score di CTP (i.e bilirubina sierica, INR, creatinina, e albumina), esami biochimici correlati alla citonecrosi/indici di proliferazione (transaminasi, alfa-fetoproteina), enzimi di colestasi (fosfatasi alcalina, GGT,)

- ecografia addome completo con valutazione Doppler dell'asse spleno-mesenterico-portale per definire la presenza di segni ultrasonografici di cirrosi epatica (i.e margini epatici, ecostruttura, ipertrofia del lobo sinistro/caudato), di ipertensione portale (diametro della vena porta e flusso portale, ascite, circoli collaterali porto-

sistemici), valutazione del flusso attraverso l'arteria epatica e degli indici di resistenza.

Qualora l'ecografia addome al tempo 0 documenti la presenza di lesioni focali epatiche, la diagnosi di epatocarcinoma dovrà essere esclusa mediante tecniche di imaging pesante (TC, RMN) ed eventualmente ricorrendo anche ad accertamenti biotici.

2) Entro 12 ore dalla procedura di re-infusione, viene eseguita un eco-Doppler dell'asse spleno-mesenterico-portale con valutazione degli indici di resistenza dell'arteria epatica per escludere complicanze vascolari legate alla procedura.

3) Follow-up:

- L'esame obiettivo, gli esami di laboratorio, l'ecografia addome con Doppler vengono ripetuti a 24, 48, 72 ore dalla reinfusione e successivamente una volta la settimana per il primo mese. Il follow-up a lungo termine prevede che gli stessi controlli vengano ripetuti a 1, 2 e 3 mesi e quindi a 6, 9 e 12 mesi dalla manovra.

Dati clinici, strumentali e laboratoristi nonché l'accurata registrazione di eventuali eventi avversi sono registrati nella cartella clinica cartacea del protocollo.

Gli eventi avversi sono stati classificati secondo i criteri di Good Clinical Practice (GCP) (89).

Lo studio ha ricevuto l'approvazione da parte del Comitato Etico dell'AOU Sant'Orsola-Malpighi e dell'Istituto Superiore di Sanità.

2.2 Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard o come mediana (range). Per l'analisi dei dati relativi ai differenti tempi (dal basale fino al termine del follow-up) è stato usato il test di Friedman. Tutte le elaborazioni sono state fatte con SPSS per Windows versione 3.0. E' stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$.

3. Risultati

Lo studio è tuttora in corso di svolgimento, vengono pertanto descritti i risultati preliminari.

A partire da Marzo 2010 fino a Febbraio 2013, è stata valutata l'idoneità all'arruolamento di 136 pazienti, dei quali solo 17 (13%) soddisfacevano i criteri di inclusione/esclusione e hanno firmato il Consenso Informato per l'arruolamento. Le caratteristiche di tali pazienti sono riportate nelle Tabelle seguenti.

Si tratta di 14 maschi (82%) e 3 femmine con un'età media di 53 anni (range 30-70) affetti per la maggior parte da cirrosi epatica HCV relata (53%) con o senza abuso alcolico. MELD mediano 18.

Tabella n.5 Caratteristiche cliniche pazienti allo screening

Pz	Età	Eziologia	MELD	Bilirubina mg/dl	Creatinina mg/dl	INR
01	54	HCV	18	4.08	0.72	1.78
02	53	ASH	17	2.9	1.05	1.65
03	54	HCV	19	4.7	1.2	1.9
04	47	HCV	18	5	0.93	1.68
05	57	NASH	19	5	1.17	1.52
06	46	NASH+ASH	21	5.74	0.58	2.05
07	56	ASH	22	7.91	1.1	1.84
08	48	HCV	22	7.97	0.6	2.06
09	70	HCV+NASH	19	2.21	0.87	2.27
10	40	HCV+ASH	17	4.41	0.94	1.5
11	70	HCV	17	5.47	1.07	1.32
12	30	HCV	18	5.08	0.77	1.62
13	58	ASH	18	5.17	1.00	1.61
14	48	HCV+ASH	17	4.86	1.3	1.45
15	53	NASH+ASH	17	4.3	1.2	1.3
16	59	ASH	20	3.68	1.13	1.62
17	59	ASH	17	5.2	0.82	1.55

ASH: Alcoholic steatohepatitis; NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

Tabella n.6 Andamento e risultati nei singoli pazienti

Pz	Età	Eziologia	Aferesi	Reinfusione	Cellule reinfuse (x10 ³)/Kg	Follow-up post- reinfusione
01	54	HCV	Si	Si	50	OLT a 3 mesi
02	53	ASH	Si	Si	50	Vivo
03	54	HCV	Si	Si	50	Vivo
04	47	HCV	No	-	-	-
05	57	NASH	Si	No (deceduto)	-	-
06	46	NASH+ASH	Si	Si	150	OLT a 2 mesi
07	56	ASH	Si	Si	150	Deceduto a 3 mesi
08	48	HCV	Si	No (OLT)	-	-
09	70	HCV+NASH	Si	Si	400	Vivo
10	40	HCV+ASH	Si	Si	150	Deceduto a 2 mesi
11	70	HCV	Si	Si	400	Vivo
12	30	HCV	Si	Si	400	OLT a 1 mese
13	58	ASH	Si	Si	1000	OLT a 9 mesi
14	48	HCV+ASH	No	-	-	-
15	53	NASH+ASH	Si	Si	1000	Vivo a un mese
16	59	ASH	No	-	-	-
17	59	ASH	In corso	-	-	-

ASH: Alcoholic steatohepatitis; NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

Dei 17 pazienti arruolati, uno (paziente n.17) è in procinto di iniziare la terapia mobilizzante, mentre uno (paziente n. 16) ha ritirato il consenso prima di iniziare il G-CSF a causa di un peggioramento delle condizioni cliniche. Pertanto ad oggi 15 (88%) sono stati sottoposti a terapia mobilizzante con G-CSF, di questi però ne sono stati sottoposti a leucoafèresi 13 (87%) sono stati sottoposti a leucoafèresi, mentre 2 (pazienti n.4 e n.14) non hanno avuto una sufficiente mobilizzazione delle cellule staminali e sono stati considerati drop-out.

Dei 13 pazienti sottoposti a leucoafèresi, 11 (85%) sono stati successivamente sottoposti a reinfusione intraepatica, mentre: un paziente (n.5) è deceduto e uno (n.8) è stato sottoposto a trapianto di fegato entrambi prima di poter essere sottoposti a terapia cellulare.

In definitiva, come si evince dalla tabella, degli 11 pazienti sottoposti a reinfusione:

- 4 (36%) hanno completato lo studio, cioè il previsto follow-up di 12 mesi dalla reinfusione;
- 1 (9%) è in follow-up attivo (un mese dalla reinfusione)
- 4 (36.3%) sono stati trapiantati, rispettivamente a 1, 2, 3 e 9 mesi dalla reinfusione
- 2 (18.2%) sono deceduti, rispettivamente a 2 e 3 mesi dalla reinfusione

Gli 11 pazienti sottoposti alla reinfusione avevano un'età media di 57 ± 9 anni e un MELD mediano di 18 (range 17-22).

In seguito alla somministrazione di G-CSF, 12 su 15 (80%) hanno lamentato febbre (max 37,2 °C) e dolori osteomuscolari di grado lieve. Non sono stati rilevati effetti collaterali riferibili alla procedura di leucoaferesi.

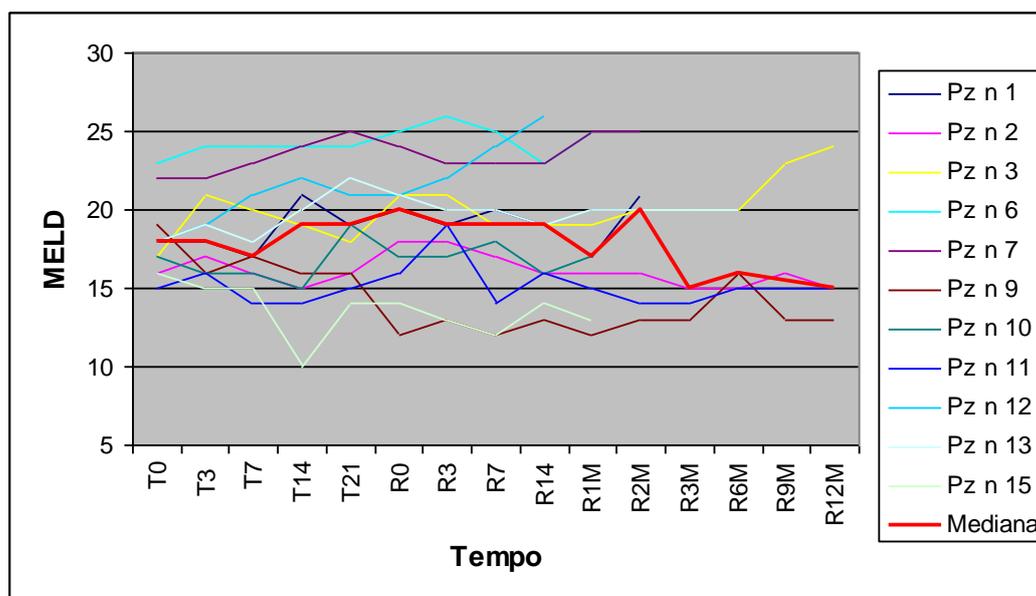
Dopo la reinfusione sono stati registrati i seguenti Eventi Avversi Gravi:

- 1 paziente ha sviluppato un ematoma nella zona inguinale destra, il giorno dopo la reinfusione, dovuto alla puntura angiografica, risoltosi completamente in 20 giorni, senza sequele cliniche di rilievo;
- 2 pazienti, entrambi ad un mese dalla reinfusione, hanno presentato un episodio di encefalopatia epatica che ha richiesto l'ospedalizzazione;
- 2 pazienti sono morti per insufficienza epatica terminale rispettivamente a 2 e 3 mesi dalla reinfusione di cellule staminali. In entrambi i casi si trattava di pazienti che presentavano controindicazioni al trapianto di fegato.

Per quanto riguarda la valutazione dell'efficacia, i parametri di funzionalità epatica non hanno mostrato alcuna variazione statisticamente significativa tra i valori basali e quelli osservati nel corso del follow-up.

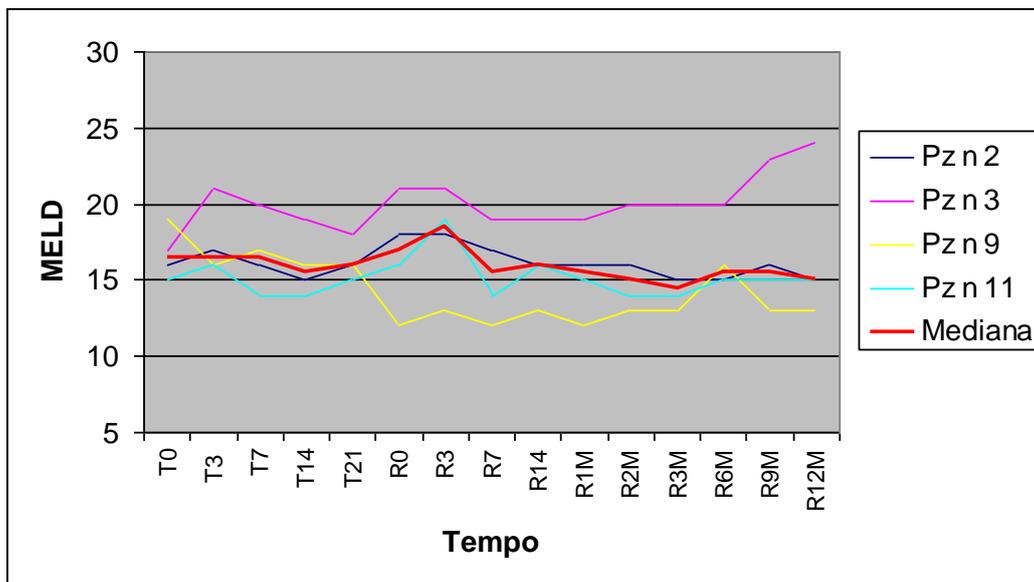
Nei grafici è riportato l'andamento del MELD rispettivamente nei 15 pazienti che sono stati sottoposti a trattamento mobilizzante con G-CSF (Figura 1) e nei 4 pazienti che hanno concluso lo studio (Figura 2). Come si vede dall'andamento delle curve, non è stato documentato alcun miglioramento e il MELD mediano (linea rossa in entrambe le figure) si è sostanzialmente mantenuto stabile.

Figura 1. Valori del MELD dei singoli pazienti e Mediana:



T0: inizio G-CSF; T3: 3 giorni da inizio G-CSF; T7: 7 giorni da inizio G-CSF; T21: 21 giorni da inizio G-CSF; R0: reinfusione; R3: 3 giorni dalla reinfusione; R14: 14 giorni dalla reinfusione; R1M: 1 mese dalla reinfusione; R2M: 2 mesi dalla reinfusione; R3M: 3 mesi dalla reinfusione; R6M: 6 mesi dalla reinfusione; R9M: 9 mesi dalla reinfusione; R12M: 12 mesi dalla reinfusione.

Figura 2. Valori del MELD dei 4 pazienti che hanno completato il follow-up e Mediana



T0: inizio G-CSF; T3: 3 giorni da inizio G-CSF; T7: 7 giorni da inizio G-CSF; T21: 21 giorni da inizio G-CSF; R0: reinfusione; R3: 3 giorni dalla reinfusione; R14: 14 giorni dalla reinfusione; R1M: 1 mese dalla reinfusione; R2M: 2 mesi dalla reinfusione; R3M: 3 mesi dalla reinfusione; R6M: 6 mesi dalla reinfusione; R9M: 9 mesi dalla reinfusione; R12M: 12 mesi dalla reinfusione.

4. Discussione e conclusioni

Data la diffusione delle patologie epatiche nel mondo e le scarse possibilità terapeutiche al di fuori del trapianto di fegato, gli ultimi dieci anni hanno fatto registrare un interesse crescente nei confronti delle terapie cellulari per il trattamento dell'insufficienza epatica terminale. In linea teorica le terapie cellulari in questo contesto avrebbero numerosi vantaggi quali (90):

- 1) espansione in vitro e criopreservazione superando così il limite della scarsità di organi e consentendo la possibilità di usi futuri;
- 2) assenza di rigetto e/o immunosoppressione dal momento che le cellule si ottengono dal paziente stesso;
- 3) infusione senza ricorrere ad interventi chirurgici;
- 4) possibilità di manipolazioni genetiche per correggere gli errori congeniti del metabolismo.

Potenzialmente si potrebbero utilizzare cellule staminali di vario tipo per promuovere la rigenerazione epatica (91). Tuttavia, per ragioni sia etiche che scientifiche, al momento la fonte più promettente di cellule staminali da impiegare in campo epatologico è il midollo osseo e la terapia più promettente è quella di reinfondere per via portale o intraepatica cellule staminali di derivazione midollare prelevate tramite aspirato midollare o, ancora meglio, isolate dal sangue periferico dopo mobilizzazione mediante somministrazione di fattori di crescita (G-CSF). I dati della letteratura indicano infatti che le cellule staminali di derivazione midollare sono fisiologicamente coinvolte nei processi di riparazione del fegato.

Sulla base di queste evidenze è in corso questo studio clinico di fase I che si propone di valutare la sicurezza di impiego della reinfusione intraepatica di cellule staminali CD133⁺ altamente purificate in pazienti con cirrosi epatica di stadio avanzato definita da un MELD score compreso tra 17 e 25. La scelta di arruolare pazienti con uno score di MELD così alto è legata a considerazioni scientifiche ed etiche. Si tratta infatti di pazienti la cui sola possibilità terapeutica è il trapianto di fegato e sono spesso già in lista d'attesa. Pertanto non potendo prevedere la sicurezza d'impiego della terapia cellulare, abbiamo preferito trattare pazienti nei quali eventualmente ricorrere al trapianto qualora si fossero verificati eventi avversi gravi quali in particolare un peggioramento della funzione epatica. D'altro canto trattare pazienti meno gravi, avrebbe comportato un inaccettabile rischio di eventuali complicanze. Viceversa, per l'estrema gravità delle condizioni cliniche non aveva senso trattare pazienti con MELD più alto che peraltro sono spesso ospedalizzati.

Tuttavia la scelta di arruolare pazienti con malattia epatica così avanzata, data la ridotta aspettativa di vita, non ci ha consentito di avere per tutti il follow-up auspicato di 12 mesi dalla reinfusione, dato che alcuni sono stati trapiantati. Inoltre, sempre per motivi etici non è stato possibile eseguire biopsie epatiche che avrebbero fornito utili

informazioni sull'attecchimento delle staminali e la rigenerazione epatica.

Circa la scelta delle cellule utilizzate in questo studio, dal momento che i pazienti arruolati sono affetti da cirrosi epatica e che l'obiettivo è quello non solo di ridurre la fibrosi ma anche di stimolare la rigenerazione sia da parte degli stessi epatociti che delle cellule ovali, alcune evidenze scientifiche supportano l'uso di cellule staminali midollari ematopoietiche mobilizzate mediante stimolazione con G-CSF (44,45,92). Bisogna comunque sottolineare che al momento non vi è consenso sul tipo cellulare più efficace in tale contesto clinico e comunque c'è accordo in letteratura sul fatto che la scelta del tipo cellulare da reinfondere dipenda dal contesto clinico e dal risultato atteso.

La reinfusione in arteria epatica piuttosto che nella vena porta deriva prevalentemente da considerazioni fisiopatologiche piuttosto che da evidenze scientifiche. Nonostante le esperienze cliniche in tal senso sono limitate, in una recente revisione della letteratura (91) si giungeva alla conclusione di prediligere la via venosa, non tanto per maggiore efficacia, dato che non vi sono dati in tal senso, quanto per minore incidenza di effetti collaterali dal momento che non sono stati mai segnalate complicanze trombotiche, ma alcuni casi di dissecazione dell'arteria epatica (81,84). Eppure è stata preferita l'arteria epatica per evitare sia il massivo sequestro splenico delle cellule che la dispersione delle cellule stesse attraverso gli shunts porto-sistemici tipici della cirrosi e dell'ipertensione portale.

Il numero di cellule reinfuse è il risultato di una nostra precedente esperienza (48). A tal proposito i dati della letteratura indicano che fino a dose di un milione di cell/Kg, che è quella somministrata per ricostituire, sebbene molto lentamente, la funzione emopoietica dopo chemioterapia ablativa, è considerata sicura (71).

I risultati ottenuti, benché ancora non definitivi, indicano che la mobilizzazione e la reinfusione di cellule staminali CD133⁺ in pazienti affetti da malattia epatica avanzata è sicuramente fattibile. Circa la

sicurezza di impiego, trattandosi di una casistica di malati con aspettativa di vita estremamente ridotta, è difficile attribuire i decessi osservati alla terapia cellulare. Stessa considerazione si applica ai pazienti trapiantati. In altre parole non sembra, ad un'osservazione per il momento solo clinica, che la terapia cellulare possa aver contribuito ad un aggravamento dell'epatopatia. D'altro canto però anche i dati sull'efficacia, nonostante questo studio non sia stato disegnato a questo scopo, non sembrano dimostrare alcuna variazione significativa della funzione epatica né in miglioramento ma neanche in peggioramento. Sicuramente invece l'ematoma inguinale è stato un evento avverso legato alla manovra di reinfusione essendo una possibile complicanza della puntura arteriosa. In ogni caso nel nostro paziente, malgrado i deficit emocoagulativi tipici della malattia cirrotica, l'ematoma si è risolto spontaneamente in 20 giorni senza sequele.

In conclusione riteniamo che la terapia con cellule staminali potrebbe davvero rappresentare il futuro per i pazienti con insufficienza epatica terminale. Le potenzialità ci sono tutte, sia come terapia "ponte" per consentire al paziente una più lunga sopravvivenza in lista d'attesa fino al trapianto (90) che come alternativa al trapianto stesso. Al momento la strada tuttavia sembra piuttosto lunga. Sicuramente sarà interessante mettere in atto nuovi studi al fine di valutare ad esempio la somministrazione ripetuta di cellule staminali che nel modello murino si è dimostrata più efficace della singola somministrazione (92). Una volta concluso questo studio di fase I, il nostro gruppo ha in programma uno studio di fase II randomizzato e controllato disegnato allo scopo di valutare l'efficacia della reinfusione delle cellule staminali in termini di sopravvivenza e incidenza delle complicanze.

- (1) Cirrosi epatica. Cap 19
- (2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=liver+cirrhosis>
- (3) Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M et al. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013;58:593-608.
- (4) Zatonski W, Prabhat J. The health transformation in Eastern Europe after 1990: a second look. Cancer Center and Institute of oncology: Warsaw; 2000, <http://www.andc.hem.waw.pl/?idm=58>.
- (5) Zatonski WA, Sulkowska U, Manczuk M et al. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. *Eur Addict Res* 2010;16:193-201.
- (6) Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003;27:209-219.
- (7) Rehm J, Taylor B, Mohapatra S et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev* 2010;29:437-445.
- (8) Bari K, Garcia-Tsao G. Treatment of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2012; 18:1166–1175.
- (9) Rahimi R, Rockey D. End-stage liver disease complications. *Curr Opin Gastroenterol* 2013, Epub ahead of print.
- (10) Reshamwala PA. Management of ascites. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2010 Sep;22(3):309-14.
- (11) Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.* 2013 Jan;33(1):31-9.
- (12) Xue H, Zhang M, Pang JX, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt vs endoscopic therapy in preventing variceal rebleeding. *World J Gastroenterol.* 2012 Dec 28;18(48):7341-7.
- (13) Mancini E. Hepatorenal syndrome. *G Ital Nefrol.* 2012 Sep-Oct;29(5):563-78.
- (14) D'Amico G, Garcia-Tsao G, Magliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis. *J Hepatol.* 2006;44:217-31.
- (15) Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, et al. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology.* 2003;31:864-71.
- (16) Kamath PS, Kim WR. The Model for End-stage Liver Disease (MELD). *Hepatology.* 2007;45:797-805.
- (17) www.trapianti.salute.gov.it/cnt
- (18) Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;10:836-47.

-
- (19) Higgins, GM and Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186–202.
- (20) Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, et al. Liver regeneration. *J Am Coll Surg*. 2003;4:634-59.
- (21) Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas, and intestine. *Nat Genet* 2011;43:34–41.
- (22) Malato Y, Naqvi S, Schurmann N, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 2011;121:4850-60.
- (23) Greenbaum L, Wells G. The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:222-9.
- (24) Alison MR, Poulson R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001;21:367-73.
- (25) Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium *Gastroenterology* 2001;120:534-44.
- (26) Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 30-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956;16:142–8.
- (27) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-70.
- (28) Alison MR, Poulson R, Jaffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257.
- (29) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-6.
- (30) Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, et al. Lack of fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*. 2004; 305: 90-3.
- (31) Jang YY, Collector MI, Baylin SB, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*. 2004; 6: 532-9.
- (32) Willenbring H, Bailey AS, Foster M, et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med*. 2004;10: 744-748.
- (33) Camargo FD, Finegold M, Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest*. 2004; 9: 1266-1270.
- (34) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6:1229-34.

-
- (35)Wang X, Ge S, McManara G, et al. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;101:4201-8.
- (36)Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-302.
- (37)Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1304-11.
- (38)Kollet O, Shivtiel S, Chen Y-Q, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003;112:160-9.
- (39)Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45–S53.
- (40)Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Pathol* 2010;176:2–13.
- (41)Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. In: Beck F, Christ B, Kriz W, Kummer W, et al., editors. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, vol. 161. Springer; 2001
- (42)Ding B, Nolan DJ, Butler JM et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 2010;468:310-5.
- (43)Liu L, Yannam GR, Nishikawa T, et al. The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2012;55(5):1529-39.
- (44)Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005;32:108-119.
- (45)Piscaglia AC, Shupe TD, Ho SH, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterol* 2007;133:619-31.
- (46)Oishi K, Hayamizu K, Aihaiti X, et al. G-CSF-induced evacuation of sinusoidal NK cells and the facilitation of liver regeneration in a partial hepatectomy. *Cytokine* 2006;34:66-75.

-
- (47)Di Campi C, Zocco MA, Saulnier N, et al. Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure. *Dig Liver Dis* 2007;39:1071–6.
- (48)Lorenzini S, Isidori A, Catani L, et al. Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:932–9.
- (49)Spahr L, Lambert JF, Rubbia-Brandt L, et al. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatology* 2008;48:221–9.
- (50)Yin Ah, Miraglia S, Zanjani ED. AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1997;90:5002.
- (51)Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization and molecular cloning. *Blood*, 1997;90:5013.
- (52)Florek M, Haase M, Marzesco AM, et al. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 2005;319:15–26.
- (53)Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90:5013–21.
- (54)Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002–12.
- (55)de Wynter EA, Buck D, Hart C, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998;16:387–396.
- (56)Gordon PR, Leimig T, Mueller I, et al. Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:17–22.
- (57)Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N et al. In Vitro proliferation potential of AC 133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells*, 2000;18:196-203.
- (58)Filip S, Vavrova J, Vokurova D et al. Myeloid differentiation and maturation of SCF + IL-3+IL-11 expanded AC133+/CD34+ cells selected from high-risk breast cancer. *Neoplasm*, 2000;47:73-80.
- (59)Lang P, Bader P, Schumm M, et al. Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 2004;124:72–9.

-
- (60) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430-6.
- (61) Gill M, Dias S, Hattori K et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursors cells. *Circ Res.* 2001;88:167-74.
- (62) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95: 952-8.
- (63) Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RC, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *PNAS* 2001;98:10716-21.
- (64) Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *PNAS* 2004;101:11839-44.
- (65) Kuci S, Wessels JT, Buhring H-J, et al. Identification of a novel class of human adherent CD34⁻ stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 2003;101: 869-876.
- (66) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49.
- (67) Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008;214(1):3-9.
- (68) Gehling UM, Willems M, Dandri M, et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of hematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol* 2005; 43: 845-853.
- (69) Rountree CB, Barsky L, Ge S, Zhu J, Senadheera S, Crooks GM. A CD133 expressing murine liver oval cell population with bi-lineage potential. *Stem Cells* 2007; 25: 2419-29.
- (70) am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD 133⁺ bone marrow cells to the liver – a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005; 23: 463-470.
- (71) Furst G, am Esch JS, Poll LW, et al. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration. *Radiology* 2007; 243: 171-79.

- (72) Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-8.
- (73) Gordon MY, Levicar N, Pai M, et al. Characterization and clinical application of human CD34⁺ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*. 2006;7:1822-30.
- (74) Levicar N, Pai M, Habib NA, et al. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34⁺ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Prolif*. 2008;41:115-25.
- (75) Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, et al. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2007;24:3359-63.
- (76) Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34⁺ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2008 Aug;103(8):1952-8.
- (77) Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;10:1199-205.
- (78) Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007;7:1067-73.
- (79) Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;1:33-42.
- (80) Kim JK, Park YN, Kim JS, et al. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant*. 2010;19(10):1237-46.
- (81) Salama H, Zekri AR, Bahnassy AA, et al. Autologous CD34⁺ and CD133⁺ stem cells transplantation in patients with end stage liver disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:5297-305.
- (82) Salama H, Zekri AR, Zern M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. *Cell Transplant*. 2010;19(11):1475-86.
- (83) Nikeghbalian S, Pournasr B, Aghdami N, et al. Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear and CD-133⁺ cells in patients with decompensated cirrhosis. *Arch Iran Med*. 2011;14(1):12-7.

- (84) Couto BG, Goldenberg RC, de Fonseca LM, et al. Bone marrow mononuclear cell therapy for patients with cirrhosis: a Phase 1 study. *Liver Int* 2011;31:391-400.
- (85) Peng L, Xie DY, Lin BL, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*. 2011;54(3):820-8.
- (86) Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004;114:182-95.
- (87) Corallo M, Rutella S, Pessina G, et al. Human cord blood CD133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial- and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* 2007;47:280-9.
- (88) MACS Technology brochure
- (89) www.ich.org
- (90) Russo FP, Parola M. Stem cells in liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):35-45.
- (91) Forbes SJ, Newsome PN. New horizons for stem cell therapy in liver disease. *J Hepatol* 2012;56:496-9.
- (92) Kallis YN, Robson AJ, Fallowfield JA, et al. remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut* 2011;60:525-33.
- (93) Miryounesi M, Piryaei A, Pournasr B, et al. Repeated versus single transplantation of mesenchymal stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Cell Biol Int*. 2013 10.1002/cbin.10048