

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE,
TOSSICOLOGICHE, DELLO SVILUPPO E MOVIMENTO UMANO**

XXVI CICLO

Settore Concorsuale di afferenza: 05/F1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/13

**RICERCA DI NUOVE STRATEGIE DIFFERENZIALI:
ANALISI DEGLI EFFETTI DI STIMOLI FISICI E
MOLECOLARI SU CELLULE MESENCHIMALI UMANE
ISOLATE DA TESSUTO ADIPOSO**

Tesi di Dottorato presentata da:

Dott.ssa Eva Bianconi

Coordinatore del Dottorato:

Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli Forti

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Canaider

Correlatore:

Dott.ssa Federica Facchin

RIASSUNTO

Introduzione. Le cellule mesenchimali derivate dal tessuto adiposo (hASC) rappresentano un importante strumento per la terapia cellulare, in quanto derivano da un tessuto adulto abbondante e facilmente reperibile. Con il dispositivo medico Lipogems l'isolamento di tali cellule è eseguito esclusivamente mediante sollecitazioni meccaniche. Il prodotto ottenuto è quindi minimamente manipolato e subito utilizzabile. Ad oggi, il condizionamento pro-differenziativo delle staminali è per lo più attuato mediante molecole di sintesi. Tuttavia, altri fattori possono modulare la fisiologia cellulare, come gli stimoli fisici e molecole naturali. Onde elettromagnetiche hanno indotto in modelli cellulari staminali l'espressione di alcuni marcatori di differenziamento e, in cellule adulte, una riprogrammazione, mentre estratti embrionali di Zebrafish sono risultati antiproliferativi sia *in vitro* che *in vivo*.

Metodi. La ricerca di nuove strategie differenziative sia di natura fisica che molecolare, nel particolare onde acustiche ed estratti embrionali di Zebrafish, è stata condotta utilizzando come modello cellulare le hASC isolate con Lipogems. Onde acustiche sono state somministrate mediante l'utilizzo di due apparati di trasduzione, un generatore di onde meccaniche e il Cell Exciter . I trattamenti con gli estratti embrionali sono stati effettuati utilizzando diverse concentrazioni e diversi tempi sperimentali. Gli effetti sull'espressione dei marcatori di staminalità e differenziamento relativi ai trattamenti sono stati saggiati in RT-PCR quantitativa relativa e/o in qPCR. Per i trattamenti di tipo molecolare è stata valutata anche la proliferazione.

Risultati e conclusioni. La meta-analisi dei dati delle colture di controllo mostra la stabilità d'espressione genica del modello. I trattamenti con i suoni inducono variazioni dell'espressione genica, suggerendo un ruolo regolatorio di tali stimoli, in particolare del processo di commitment cardiovascolare. Due degli estratti embrionali di Zebrafish testati inibiscono la proliferazione alle 72 ore dalla somministrazione. L'analisi d'espressione associata ai trattamenti antiproliferativi suggerisce che tale effetto abbia basi molecolari simili ai processi di differenziamento.

Parole chiave: terapia cellulare, differenziamento, cellule staminali adulte, cellule mesenchimali, tessuto adiposo, onde acustiche, generatore di onde meccaniche, Cell Exciter, fattori differenziativi, embrioni di Zebrafish.

ABSTRACT

Background. Adipose derived mesenchymal stem cells (hASC) represent an interesting tool for cell therapy, due to their tissue derivation that is abundant and easily available. Using Lipogems, a medical device, stem cells isolation is performed only with mild mechanical forces, giving a minimally manipulated and ready to use fat product. To date, the differentiation processes *in vitro* are mostly obtained using chemical compounds. Anyway, other factors are shown to be modulators in cell physiology, as physical stimuli and some natural molecules. For instance, electromagnetic waves induced the expression of differentiation markers in stem cell models and adult cells were reprogrammed after treatment, while Zebrafish embryo derived extracts were shown to be antiproliferative both *in vitro* and *in vivo*.

Methods. The search for new differentiation strategies was focused both on physical waves and Zebrafish extracts, using hASC isolated with Lipogems as cell model. Acoustic waves were given using two types of transducer, the mechanical wave generator and the Cell Exciter. Zebrafish extracts treatments were performed using different doses and experimental times. Gene expression analysis of stemness and differentiation genes was conducted in both the experimental approaches using quantitative relative RT-PCR and/or qPCR. Proliferation assay was also performed for treatments with natural compounds.

Results and conclusions. Control cell culture data meta-analysis revealed that hASC has a stable gene expression in basal conditions. Acoustic waves induced gene expression changes in hASC, in particular in cardiovascular commitment genes, suggesting a regulatory role in differentiation processes. Two of the Zebrafish extracts are shown to inhibit hASC proliferation, with statistical significance after 72 hours from the treatment. Gene expression analysis suggested that this effect could share the same molecular mechanism with differentiation events.

Key words: cell therapy, differentiation, adult stem cells, mesenchymal cells, adipose tissue, acoustic waves, mechanical wave generator, Cell Exciter, differentiation factors, Zebrafish embryos.

INDICE

PREMESSA ALLA TESI	1
1 - INTRODUZIONE	3
1.1 - La nascita ed evoluzione del concetto di staminalità	4
1.2 - Le cellule staminali embrionali	5
1.3 - Le cellule staminali adulte	6
1.4 - Le cellule multipotenti mesenchimali stromali	7
1.4.1 - Origine e caratterizzazione <i>in vitro</i> delle MSC	
1.4.2 - Le capacità immunomodulatorie delle MSC	
1.4.3 - Le MSC come modello cellulare	
1.5 - Le cellule mesenchimali derivate da tessuto adiposo	11
1.6 - Lo sviluppo e il differenziamento	12
1.6.1 - Lo sviluppo embrionale dei mammiferi	
1.6.2 - Le basi molecolari dello sviluppo e differenziamento	
1.6.3 - Dedifferenziamento, transdifferenziamento e riprogrammazione nucleare	
1.7 - Le strategie differenziative	18
1.7.1 - L'induzione al differenziamento mediante l'utilizzo di molecole	
1.7.2 - Il ruolo regolatorio delle forze fisiche sulla fisiologia cellulare: le onde	
1.8 - Potenzialità delle cellule mesenchimali adulte	22
SCOPO DELLA RICERCA	24
2 - MATERIALI E METODI	26
2.1 - Isolamento delle hASC mediante tecnologia Lipogems	27
2.2 - Allestimento e mantenimento delle colture di hASC	28
Allestimento delle colture	
Mantenimento delle colture	
Espansione delle colture	
Semina di hASC per gli esperimenti	
Crioconservazione	
2.3 - Caratterizzazione delle hASC isolate con il Lipogems	29
2.3.1 - Determinazione del profilo immunofenotipico delle hASC	
2.3.2 - L'esplicazione del potenziale differenziativo delle hASC	

Induzione adipogenica	
Induzione osteogenica	
Induzione condrogenica	
2.4 - La somministrazione degli stimoli	31
2.4.1 - Gli stimoli fisici: le onde acustiche	
La somministrazione di onde semplici: il generatore di oscillazioni meccaniche	
I trattamenti con le onde semplici somministrate con il generatore di vibrazioni meccaniche	
La somministrazione di onde complesse	
Caratterizzazione del suono	
Il Cell Exciter	
I trattamenti con le onde complesse con il Cell Exciter	
2.4.2 - Gli stimoli molecolari: gli estratti embrionali di pesce zebra	
Gli estratti	
La quantificazione mediante BCA assay	
Elettroforesi su gel di acrilammide	
I trattamenti con gli estratti di Zebrafish	
2.5 - Saggio di vitalità	38
2.6 - Saggio di proliferazione, MTT	39
2.7 - Analisi dell'espressione genica	39
2.7.1 - Estrazione dell'RNA	
2.7.2 - RT-PCR	
2.7.3 - Progettazione dei primers e clonaggio in RT-PCR	
Analisi bioinformatica	
Clonaggio in RT-PCR	
Sequenziamento	
2.7.4 - PCR quantitativa relativa	
Le PCR per i geni di interesse	
L'elettroforesi su gel d'agarosio	
La quantificazione degli ampliconi	
2.7.5 - Real time qPCR	
2.8 - Analisi dell'espressione proteica	45
2.8.1 - Estrazione delle proteine	
2.8.2 - Western Blot	
2.9 - Analisi statistica	47

3 - RISULTATI	48
3.1 - Progettazione dei primers, clonaggio in RT-PCR e sequenziamento	49
3.2 - Caratterizzazione delle cellule mesenchimali isolate dal tessuto adiposo con Lipogems	50
3.2.1 - L'immunofenotipo delle hASC	
3.2.2 - Il potere differenziativo delle hASC	
Il differenziamento adipogenico	
Il differenziamento osteogenico	
Il differenziamento condrogenico	
3.2.3 - Il profilo d'espressione genica delle hASC in condizioni basali	
3.3 - Trattamenti con stimoli fisici	52
3.3.1 - Effetti delle onde semplici sull'espressione genica delle hASC	
3.3.2 - Effetti delle onde complesse sul numero di cellule e vitalità delle hASC	
3.3.3 - Effetti delle onde complesse sull'espressione genica delle hASC	
Effetti dell'onda complessa normalizzata somministrata con il generatore di vibrazioni meccaniche	
Effetti dell'onda complessa somministrata con il Cell Exciter	
3.4 - Trattamenti con estratti embrionali di Zebrafish	59
3.4.1 - Caratterizzazione degli estratti embrionali di Zebrafish	
3.4.2 - Effetti dei trattamenti con gli estratti ZF sulla proliferazione delle hASC	
3.4.3 - Effetti dei trattamenti con gli estratti ZF sulla vitalità delle hASC	
3.4.4 - Effetti dei trattamenti con gli estratti ZF sull'espressione genica delle hASC	
3.5 - L'ottimizzazione del protocollo di Western Blot per le proteine d'interesse	64
4 - DISCUSSIONE	66
5 - CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	77
6 - BIBLIOGRAFIA	80
7 - FIGURE E TABELLE	92

PREMESSA ALLA TESI

L'utilizzo dei Prodotti per Terapia Cellulare (PTC, farmaci in cui gli agenti biologici sono cellule manipolate in modo da modificarne le caratteristiche e utilizzate in maniera non omologa) rappresenta un importante strumento per la medicina rigenerativa, sia per il trattamento di malattie genetiche che degenerative.

Tra le cellule utilizzate per produrre PTC, negli ultimi decenni la ricerca si è concentrata sulle cellule mesenchimali (MSC) in quanto, oltre ad essere cellule staminali residenti in tutti gli organi adulti [Orbay et al., 2012], hanno la capacità di migrare nel sito di una lesione contribuendo alla rigenerazione [Poulsom et al., 2002], mostrano effetti immunosoppressori, presentano bassa immunogenicità e in opportune condizioni possono fungere da bioreattori di sostanze trofiche [Hoogduijn et al., 2010; De Miguel et al., 2012]. Per queste ragioni, se opportunamente trattate possono essere utilizzate per produrre terapie mirate e selettive.

Dato il rischio intrinseco all'utilizzo di cellule come terapia, tra cui l'oncogenicità, e alla manipolazione di queste, la ricerca si sta concentrando da un lato sull'ottimizzazione del processo di recupero delle MSC, dall'altro sui fattori che ne possano modificare le caratteristiche fisiologiche o genetiche.

Per quanto riguarda l'isolamento di cellule staminali adulte, diverse sono le fonti potenzialmente utilizzate, dato che è oramai accettata l'evidenza che tutti gli organi adulti presentano un gruppo di cellule multipotenti residenti. Seppur presenti in ogni organo, a livello quantitativo non tutti gli organi sono analoghi in termini di MSC così come la modalità di prelievo ed isolamento. Il tessuto adiposo, al momento, rappresenta un'interessante fonte di cellule multipotenti in quanto, oltre ad essere materiale di scarto dopo interventi chirurgici, è composto per il 2% da cellule mesenchimali, contro lo 0.002% del midollo osseo [Bianchi et al., 2013].

Per quanto riguarda, invece, i fattori che possono influenzare la fisiologia della cellula, numerose sono le strategie per differenziare o de-differenziare cellule staminali, dai vettori virali a molecole naturali, come numerosi sono studi su composti naturali e di sintesi per indurre il differenziamento delle MSC. Oltre all'approccio classico, nuove sperimentazioni indicano gli stimoli di natura fisica come possibili modulatori della fisiologia cellulare e in particolare del percorso differenziativo.

Questa tesi si inserisce in tale contesto, in cui si ricercano strategie differenziative per ottenere prodotti per terapie cellulari mirate e che soddisfino le linee guida della buona norma manifatturiera (cGMP, current Good Manufacturing Practice) per cui è necessaria la minor manipolazione possibile nella preparazione di PTC.

Particolare rilievo nella nostra ricerca ha avuto tutto ciò che riguarda la fase di preparazione del PTC, dall'isolamento della cellula mesenchimale ai fattori che ne modificano il fenotipo che, nel nostro caso sono fattori che possono indurre il differenziamento.

Abbiamo scelto come modello cellulare cellule mesenchimali derivate da tessuto (hASC) isolate senza l'utilizzo di digestioni enzimatiche con un dispositivo medico innovativo, il Lipogems, e come fattori modulatori e/o differenziativi abbiamo scelto di testare stimoli fisici di natura ondulatoria ed estratti proteici embrionali di Zebrafish ottenuti turboemulsionando gli embrioni.

A tal fine è iniziato un progetto multidisciplinare che ha coinvolto biologi e biotecnologi, medici, ingegneri e fisici del suono, i cui obiettivi erano e sono tutt'ora:

- messa a punto di un nuovo modello cellulare, le hASC isolate con il Lipogems;
- messa a punto ed ottimizzazione di nuovi stimoli differenziativi, di natura fisica (onde) e molecolare (estratti proteici embrionali di Zebrafish);
- messa a punto ed ottimizzazione di strumenti per la somministrazione di stimoli meccanici sul modello cellulare in uso;
- analisi degli effetti prodotti da tali stimoli sul percorso differenziativo delle hASC utilizzate.

Questa tesi rappresenta il risultato della prima parte di uno studio ancora in corso, obiettivo del quale è la ricerca di nuove strategie differenziative in modo da fornire un ulteriore strumento a contributo della medicina rigenerativa.

INTRODUZIONE

1.1 - La nascita ed evoluzione del concetto di staminalità

Il termine “stem” (i.e. fusto, tronco), ha trovato diffusione con la teoria dell’evoluzione della specie, in particolare con Haeckel il quale indicava con “stammzelle” o cellula staminale sia l’organismo unicellulare progenitore di tutte le specie, sia la cellula uovo fecondata [Haeckel, 1877; Ramlho-Santos e Willenbring, 2007]. Nei decenni a seguire, il termine continuò ad essere utilizzato nel contesto degli studi embriologici [Boveri, 1892; Mahele, 2011] così come in ematologia [Pappenheim, 1896 e 1907] ed istologia [Boveri, 1892] conferendo al concetto di cellula staminale una molteplice connotazione, nei contesti di sviluppo, riproduzione e differenziamento. Parallelamente, gli studi di patogenesi dei tumori e di altre malformazioni indicavano come agente eziologico un “rudimento embrionale”, un gruppo di cellule di origine embrionale e con comportamento embrionale che, per errore durante lo sviluppo, rimanevano nei tessuti adulti [Cohnheim, 1877 ; Mahele, 2011]. Fino alla prima metà del XX secolo, quindi, la “stammzelle” mantenne un significato ambiguo di sviluppo normale e allo stesso tempo fattore eziologico di patologie [Mahele, 2011].

Solo dopo gli anni '60 del secolo scorso la cellula staminale iniziò ad assumere una chiara ed univoca connotazione.

A prescindere dal suo grado di differenziamento, per essere definita staminale, o con comportamento staminale, una cellula deve possedere tre requisiti fondamentali. Deve essere mitoticamente attiva, deve essere in grado di autorinnovarsi e, allo stesso tempo, differenziarsi. In altri termini, è definita staminale una cellula che, mediante mitosi, si divide mantenendo contemporaneamente, da un lato, il pool di cellule staminali (autorinnovamento) e generando, dall'altra parte, una popolazione di cellule progenitrici che intraprenderanno il percorso differenziativo.

Cellule con queste caratteristiche sono state isolate da embrioni [Martin, 1981; Thomson et al., 1998], da tessuti fetali ed adulti [Morrison e Weissman, 1994; Ozawa et al., 2000]. Pur essendo tutte staminali, queste cellule differiscono fondamentalmente per il loro potenziale differenziativo. Secondo la teoria classica, l’ontogenesi è un processo irreversibile in cui, mediante bilanciati processi di proliferazione e differenziamento, la toti- e multipotenza delle prime cellule post-zigotiche porta alla multipotenza delle cellule dei tre foglietti germinativi fino all’oligo- e unipotenza delle cellule dell’adulto. Grazie ai numerosi studi degli ultimi decenni sui diversi tipi di cellule staminali è stato possibile evidenziare il dinamismo del percorso differenziativo, rendendo meno lineare e univoca la relazione inversa tra stadio di

sviluppo e potenzialità differenziative, e quindi il concetto di staminalità sia da applicare alla funzione piuttosto che ad una cellula in sé in modo da sottolineare il dinamismo dei processi fisiologici [Blau et al., 2001].

1.2 - Le cellule staminali embrionali

Le capacità di autorinnovamento e differenziamento sono massime nelle cellule staminali di tipo embrionale, come evidenziato già nel 1885 da Driesch che, separando meccanicamente le due cellule post-zigotiche di riccio di mare, vide che queste si sviluppavano separatamente ed indipendentemente, dando vita a due larve complete [Maienschein, 2010].

Questo tipo di staminali deriva dalla blastocisti, precisamente dalla cellule più interne della blastocisti che, in maniera clonale, vanno a formare una popolazione cellulare pluripotente (ICM, inner cell mass). Durante lo sviluppo *in utero*, le staminali della ICM iniziano il percorso differenziativo, dando origine ai tre foglietti germinativi. Le cellule differenziate durante la gastrulazione sono anch'esse staminali ma multipotenti, in quanto, mediante divisioni asimmetriche, formeranno popolazioni di cellule progenitrici di un limitato numero di tipi cellulari [Orbay et al., 2012].

L'isolamento e la messa in coltura di cellule staminali da embrioni umani, avvenuta per la prima volta nel 1998 da Thomson e colleghi [Thomson et al., 1998], ha permesso di indagare sulle proprietà delle cellule staminali embrionali di uomo (hES). *In vitro*, le hES si presentano di forma appiattita in colonie compatte [Odorico et al., 2001] e mostrano un tasso proliferativo, stimato come tempo di population doubling, di circa 36 ore, relativamente alto rispetto alle 12 ore delle ES di topo (mES) [Amit et al., 2000]. Le colture di hES ne hanno consentito anche la caratterizzazione molecolare, portando all'identificazione di un profilo di espressione genica unico. Nelle hES, l'espressione di marcatori dello stato indifferenziato, quali *OCT3/4*, *NANOG*, *hTERT* e *Connexina 43*, è associata all'assenza di marcatori del differenziamento e risultano abbondanti i trascritti per proteine ribosomali, per modulatori del pathway di Wint (WNT) e di geni che promuovono il ciclo cellulare, quali *ciclina C* e *B1* [Bhattacharya et al., 2013].

Il mantenimento della pluripotenza e clonalità *in vitro* delle hES è vincolato dalla presenza di condizioni inibitorie quali la co-coltura con fibroblasti e utilizzo di siero; infatti, le hES, spontaneamente tendono a formare aggregati di cellule differenziate e non, i corpi embrioidi (EB). Associata alla formazione degli EB c'è l'attivazione della trascrizione di geni specifici dei foglietti germinativi e la conseguente modificazione di morfologia cellulare, da embrionale a cellula adulta, come ad esempio neuronale, epiteliale o contrattile [Itskovitz-Eldor et al., 2000], senza però intraprendere il processo organogenetico. *In vivo*, il potenziale differenziativo delle hES si esplica portando alla formazione di teratocarcinomi che a livello istologico presentano l'architettura tissutale tipica del tipo cellulare differenziatosi [Thomson et al., 1998; Andrews et al., 1984; Odorico et al., 2001]. L'evidenza del diverso comportamento delle hES *in vitro* ed *in vivo* sottolinea l'importanza dell'ambiente extracellulare e dei meccanismi epigenetici nel processo di sviluppo, concetto che è stato formalizzato da Yu e colleghi con la seguente affermazione *“siccome lo sviluppo è regolato dagli eventi epigenetici piuttosto che dalla genetica, il differenziamento è, in linea di principio, reversibile”* [Yu et al., 2007].

Se da un lato, l'isolamento, coltura e caratterizzazione delle hES ha permesso di approfondire le conoscenze sui meccanismi dello sviluppo, dall'altro ha aperto un importante dibattito di carattere etico che ha limitato e in qualche caso bloccato l'utilizzo e/o produzione di staminali embrionali umane [Odorico et al., 2001; Maienschein, 2010; L. 40/04, art. 13].

1.3 - Le cellule staminali adulte

E' oramai accettato che in tutti gli organi dell'adulto ci siano popolazioni di cellule che mantengono le caratteristiche di autorinnovamento e plasticità [Orbay et al., 2012] e che risiedono in nicchie specifiche, la localizzazione delle quali può essere più o meno nota [Poulsom et al., 2002]. Il ruolo di queste popolazioni cellulari risiede sia nel mantenimento dell'omeostasi dell'organo sia nel ripristino funzionale dopo un danno tissutale.

Considerando i problemi etici legati alle cellule staminali embrionali, la ricerca si è concentrata sullo studio delle staminali adulte, sia residenti che indotte, in modo da approfondire la comprensione della biologia della staminalità. Sono state mostrate numerose evidenze, più o meno dibattute, sulle capacità rigenerative dei vari organi e

sull'applicazione di queste cellule nel trattamento di numerose patologie, sia genetiche che degenerative. Sono inoltre stati sviluppati protocolli per ottenere cellule staminali da cellule già differenziate, inducendo in queste la ri-espressione dei geni della pluripotenza.

Secondo i principi dell'ontogenesi, durante lo sviluppo le varie popolazioni cellulari perdono la loro plasticità lungo il percorso differenziativo; nell'adulto, alcuni organi presentano un pool di cellule proliferanti che mantengono l'omeostasi e riparano danni *in loco*, mentre altri, come nel caso del cervello o delle cellule beta del pancreas, sono costituiti da un numero definitivo di cellule alla fine dello sviluppo. Le recenti evidenze sperimentali sia in modelli animali che uomo, hanno mostrato come queste cellule staminali, ad azione tessuto-specifica, siano presenti in tutti gli organi e, in casi di danno severo, come queste possano migrare per aumentare il potenziale rigenerativo dell'organo danneggiato. Ad esempio, i cardiomiociti, le cellule del pancreas e del sistema nervoso si sono dimostrate essere mitoticamente attive in condizioni fisiologiche [Bernard-Kargar e Ktorza, 2001; Palmer et al., 1997 e 2001] e/o in caso di lesione [Beltrami et al., 2001] anche se in maniera modesta o, ancora, cellule del midollo osseo contribuiscono alla rigenerazione del tessuto epatico danneggiato, come evidenziato da Alison e colleghi [Alison et al., 2000].

In questa tesi saranno trattate con particolare attenzione le cellule stromali mesenchimali, cellule multipotenti adulte che, date le loro caratteristiche, rappresentano un'importante alternativa alle cellule staminali embrionali.

1.4 - Le cellule multipotenti mesenchimali stromali

Con l'espressione "cellule multipotenti mesenchimali stromali" [Dominici et al., 2006] o MSC si intende indicare una popolazione di cellule con caratteristiche di staminalità che risiedono negli organi adulti e che presentano un potenziale differenziativo multipotente.

Le MSC sono state isolate per la prima volta dalla porzione stromale del midollo osseo come cellule di morfologia simile ai fibroblasti e che, in coltura, aderivano velocemente al supporto plastico. Proprio l'adesività di queste cellule ha permesso il loro isolamento dalle emopoietiche flottanti, la loro espansione in coltura e la conseguente evidenza che ogni singola cellula aderente potesse formare colonie

distinte [Friedenstein et al., 1982 e 1987]. Dal lavoro pioneristico di Fredenstein, le MSC sono state isolate e caratterizzate dallo stroma di molteplici tessuti adulti portando alla ormai accettata visione che queste risiedano in tutti gli organi [Orbay et al., 2012].

Data la loro abbondanza nell'adulto, negli ultimi decenni le MSC sono state ampiamente studiate in quanto, in virtù delle loro caratteristiche, rappresentano un'importante promessa per la medicina rigenerativa.

1.4.1 - Origine e caratterizzazione *in vitro* delle MSC

Dalla prima definizione di cellule fibroblastoidi aderenti, si è cercato di individuare l'origine e delineare i caratteri fenotipici e funzionali delle MSC.

Il comportamento staminale delle MSC, ha indotto ad ipotizzare la loro origine embrionale, individuando come potenziale sede di formazione la regione della blastocisti che corrisponde alla parete dorsale dell'aorta sia in *H. sapiens* sia in topo [Cortes et al., 1999; Marshall et al., 1999; Javazon et al., 2004], mentre la loro permanenza nell'adulto è stata inizialmente imputata al supporto del turnover cellulare del tessuto d'appartenenza. Successivi studi per saggiare la staminalità di queste cellule hanno messo in luce un profilo di espressione genica simile alle cellule embrionali in quanto esprimono marcatori di pluripotenza quali *OCT3/4*, *SOX2* e *NANOG* [Sachs et al., 2012; Stanko et al., 2013]. La staminalità di queste cellule si esplica anche nel loro potenziale differenziativo multipotente; in opportune condizioni sperimentali, infatti, sono in grado di dare origine a tipi cellulari mesodermici quali osteoblasti, condroblasti ed adipociti [Baksh et al., 2004; Dominici et al., 2006]. Tuttavia, la comprensione della plasticità delle cellule mesenchimali è ancora in divenire, in quanto sussistono evidenze, anche se dibattute soprattutto dal punto di vista funzionale, che cellule mesenchimali possano dare origine a fenotipi non mesodermici come quello neuronale [Eglitis e Mezey, 1997; Mezey et al., 2000; Javazon et al., 2004].

Non essendo sufficienti i requisiti morfologici e di adesione come indicatori di multipotenza, è stato indagato il profilo fenotipico delle MSC isolate da diversi tessuti, cercando di identificare quali marcatori di membrana potessero essere utilizzati per identificare cellule considerate mesenchimali. Nonostante non sia stato ancora individuato un marcatore univoco di multipotenza, un criterio comunemente utilizzato

è la positività delle cellule per l'espressione di almeno CD105, CD73 e CD90 (che però sono marcatori non specifici [Quirici et al., 2002; Sachs et al., 2012]) e la selezione negativa per marcatori di membrana emopoietici, cellule immunitarie, di cellule endoteliali e del sangue (quali CD14, CD16, CD31, CD34, CD35, CD104 e CD106) mediante citometria a flusso (FACS) in associazione all'esplicazione del potere differenziativo [Baksh et al., 2004; Kolf et al., 2007; Gazit et al., 2010; Majumdar et al., 2013].

1.4.2 - Le capacità immunomodulatorie delle MSC

L'interesse verso le cellule mesenchimali trova le basi anche sulle capacità immunomodulative delle cellule stromali, evidenziate sia *in vitro* che su modelli animali [Gazit et al., 2010; Nauta e Fibbe, 2007; Yousefi et al., 2013]. Mentre l'elusione del sistema immunitario è stata imputata ai bassissimi livelli d'espressione delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (proteine HMC-classII) [Majumdar et al., 2003; Götherström et al., 2004], non sono ancora completamente elucidati i meccanismi grazie ai quali le MSC riescano ad inibire le risposte immunitarie in condizioni di allogenicità [Ren et al., 2009; Kim et al., 2013]. E' stato comunque evidenziato in molti studi come questa capacità si espliciti mediante interazioni cellula-cellula e/o secrezione di fattori solubili che agiscono principalmente in maniera paracrina; questi meccanismi possono portare alla soppressione della proliferazione delle cellule T [Di Nicola et al., 2002] e delle cellule B [Corcione et al., 2006], al blocco della maturazione delle cellule dendritiche [Beyth et al., 2005; Zhang et al., 2004; wal and Pittenger, 2005] o ancora all'inibizione degli effetti citotossici delle cellule NK (natural killer) [Sotiropoulou et al., 2006]. Queste interazioni, oltre ad inibire le risposte immunitarie, producono anche effetti antinfiammatori [Aggarwal and Pittenger, 2005; Deng et al., 2005; Strioga et al., 2012]. Studi *in vitro* hanno infatti mostrato come in co-culture di MSC e monociti la produzione di TNF gamma e interleuchina IL-(12), citochine proinfiammatorie sia inibita in favore di IL-10 ad azione antinfiammatoria [Aggarwal and Pittenger, 2005; Deng et al., 2005].

1.4.3 - Le MSC come modello cellulare

Le cellule stromali sono state isolate dalla matrice extracellulare di tessuto adiposo [Zuk et al., 2001; 2002], midollo osseo [Fredeinstein et al., 1982; Wexler et

al., 2003], membrane sinoviali [De Bari et al., 2001], polpa dentaria [Huang et al., 2009], tendini [Salingcarnboriboon et al., 2003], trabecole ossee e periosteo [Tuli et al., 2003 ; De Bari et al., 2001], muscolo scheletrico [Asakura et al., 2001], sistema nervoso [Jiang et al., 2002; Orbay et al., 2012], pelle [Toma et al., 2001] e placenta [Parolini et al., 2008]. Queste cellule presentano le caratteristiche morfologiche e funzionali evidenziate da Fredeinstein e colleghi per le mesenchimali da midollo osseo e presentano sostanzialmente l'immunofenotipo accettato per la definizione delle MSC [Orbay et al., 2012 ; Gazit et al., 2010] sebbene con variazioni in funzione del tessuto di origine, metodo di isolamento e condizioni di coltura [Javazon et al., 2004]. Nonostante queste cellule siano state isolate e messe in coltura e le loro caratteristiche saggiate, *in vivo* la loro presenza a livello di singola cellula resta indefinita; non sono stati prodotti, infatti, lavori che ne descrivono le caratteristiche e il comportamento in condizioni non controllate e non manipolate [Robey, 2000; Javazon et al., 2004; Baksh et al., 2004; Kolf et al., 2007].

Le caratteristiche di staminalità, le proprietà immunomodulatorie così come l'ampia distribuzione nell'adulto hanno indicato le MSC come importanti strumenti applicativi in medicina rigenerativa e nella ricerca nel campo delle cellule staminali in generale.

Per questi scopi, molti aspetti sono importanti da considerare, dal prelievo del tessuto da donatore alla metodologia di isolamento della porzione stromale e messa in coltura. Come descritto in letteratura, queste procedure si ripercuotono non solo sulle caratteristiche delle cellule ma anche sulla loro vitalità e sulla sopravvivenza dopo criopreservazione e potrebbero influire sulla ripetibilità dei dati sperimentali [Javazon et al., 2004]. In linea di massima, la tipologia di MSC ideale dovrebbe essere facilmente isolabile a livello di procedura e di quantità di prodotto, dovrebbe mantenere le caratteristiche di staminalità [Tremolada et al., 2010] e, dovrebbe consistere di cellule minimamente manipolate sia durante la fase di isolamento che *in vitro*, nel caso dell'applicazione terapeutica.

Il modello classico di cellula mesenchimale è quello fornito dalla frazione stromale del midollo osseo (hBM-MS) essendo stata la prima caratterizzata, sebbene le hBM-MS presentino diversi fattori limitanti. Il prelievo prevede l'asportazione chirurgica della porzione di matrice che viene successivamente disgregata con sollecitazioni meccaniche e dalla quale, date le sue ridotte dimensioni [Orbay et al., 2012], si

riescono ad isolare dallo 0.001 al 0.01% di cellule mononucleate rispetto alle cellule messe in coltura [Gazit et al., 2010; Bianchi et al., 2013]. Oltre al basso tasso di reperibilità ed alla metodica invasiva, l'utilizzo delle hBM-MSC è stato associato ad infezioni virali che ne alterano le caratteristiche clonogeniche [Wang et al., 2002] mentre si è riscontrata una diminuzione del potenziale differenziativo in relazione all'età del donatore [Bianchi et al., 2013].

Per queste ragioni, nuove fonti di cellule mesenchimali sono state prese in esame in modo da trovare un modello che rispondesse ai requisiti di facile reperibilità e stabilità delle cellule. Tra queste, la frazione stromale del tessuto adiposo è risultata essere un'interessante risorsa di MSC [Bianchi et al., 2013].

1.5 - Le cellule mesenchimali derivate da tessuto adiposo

Le cellule mesenchimali derivate dal tessuto adiposo (hAD-MSC o, più semplicemente, hASC) insieme alle hBM-MSC sono tra le più studiate come modello di multipotenza [Gazit et al., 2010; Bianco et al., 2001].

Le hASC, isolate inizialmente da Zuk e collaboratori nel 2001, mostrano proprietà e caratteristiche equivalenti alle cellule multipotenti isolate dal midollo e altri tessuti [Zuk et al., 2001; Stanko et al., 2013; De Ugarte et al., 2003]. Inoltre, il potere differenziativo di queste cellule stromali è stato dimostrato sia *in vitro* che *in vivo*, includendo la maturazione in adipociti [Zuk et al., 2002; Sen et al., 2001], condrociti [Zuk et al., 2002; Erickson et al., 2002], osteoblasti [Zuk et al., 2002; Halvorsen et al., 2001], epatociti [Seo et al., 2005; Taléns-Visconti et al., 2007], cellule pancreatiche [Timper et al., 2006], muscolari [Mizuno et al., 2002; Lee et al., 2006] e simili ai neuroni [Safford et al., 2002; Krampera et al., 2007].

Oltre alle caratteristiche di staminalità esibite da questa tipologia di cellule, l'aspetto più promettente delle hASC risiede nella loro localizzazione. Il tessuto adiposo è distribuito in ogni regione corporea e rappresenta il 10-30% del peso di una persona sana [Lohman e Going, 1993] e viene stimata una resa di isolamento pari a 5000 cellule ogni grammo di tessuto [Orbay et al., 2012; Katz e Mericli, 2010; Fraser et al., 2006]. Inoltre, nelle procedure chirurgiche di liposuzione si asportano dai 30 ml ai 6 L di lipoaspirato [Tremolada et al., 2010] che viene normalmente scartato dopo l'intervento [Bianchi et al., 2013].

Un fattore limitante nell'utilizzo in medicina rigenerativa delle hASC, e delle cellule di origine non midollare in genere, è la manipolazione cui viene sottoposto il tessuto durante le metodiche di laboratorio. Il lipoaspirato, che contiene oltre alle cellule d'interesse, aggregati di adipociti, fibre collagene, componenti ematiche e vascolari, viene infatti processato enzimaticamente con Collagenasi A di tipo I e sottoposto ad emolisi prima della messa in coltura.

Nell'ottica dell'applicazione terapeutica delle hASC, è stato brevettato un dispositivo medico utilizzato inizialmente in chirurgia estetica per il lipofilling autologo. Con questo strumento, il Lipogems, il lipoaspirato viene tritato meccanicamente e pulito dalla porzione oleosa degli adipociti distrutti e cellule ematiche con soluzione salina; il prodotto ottenuto veniva utilizzato inizialmente in trattamenti di natura estetica e ricostruttiva e solo successive indagini di laboratorio hanno evidenziato come l'efficacia di questo prodotto cellulare fosse data dall'abbondante presenza di elementi stromali, verificatisi essere hASC [Bianchi et al., 2013].

Le hASC isolate con il Lipogems sono state il nostro modello cellulare nella ricerca di nuovi stimoli differenziativi.

1.6 - Lo sviluppo e il differenziamento

Il grande interesse del mondo scientifico nello studio delle cellule staminali risiede nella loro capacità di differenziarsi, massima nelle cellule embrionali e per questo dette pluripotenti. La comprensione dei meccanismi alla base del differenziamento, o perdita di potenzialità, che dallo zigote porteranno alla formazione di oltre 200 tipi cellulari [Alberts et al., 2002] è uno degli obiettivi e, allo stesso tempo, strumenti della medicina rigenerativa.

1.6.1 - Lo sviluppo embrionale nei mammiferi

Le prime modificazioni che porteranno all'instaurarsi dei processi di differenziazione cellulare iniziano già nei primi momenti dello sviluppo, dopo la fusione dei due pronuclei parentali. Il nucleo diploide appena formato andrà incontro alla demetilazione della cromatina; questa riprogrammazione è infatti necessaria per

stabilire la totipotenza, attribuita al solo zigote, e pluripotenza delle prime cellule embrionali.

Durante la segmentazione, stadio caratterizzato da un alto tasso proliferativo, l'embrione va incontro ai primi eventi di differenziazione. Inizialmente, le prime mitosi porteranno alla formazione di cellule che saranno diverse tra loro in termini di corredo citoplasmatico. Questa non equivalenza si ripercuoterà negli stadi di sviluppo successivi in quanto i cosiddetti "determinanti citoplasmatici" (i.e. RNA, proteine o anche organelli), distribuiti alle cellule figlie in maniera non omogenea, rendono diverse cellule fenotipicamente identiche. Il primo evento di vero differenziamento, invece, si avrà allo stadio di morula, in cui il destino delle varie cellule inizia a determinarsi (Fig. 1A). A livello spaziale, i blastomeri non sono equivalenti tra loro in quanto la proliferazione ha portato alla formazione di 64 cellule in cui si possono distinguere due strati cellulari indipendenti, il trofoblasto e i blastomeri della massa interna della blastocisti (ICM) precoce (Fig. 1B). Le cellule della ICM, comunicanti tra loro mediante giunzioni comunicanti, si diversificheranno ulteriormente; nella blastocisti tardiva, infatti, solo le cellule prossimali all'epitelio uterino, della regione dell'epiblasto, andranno a formare tutti i tessuti embrionali mentre le cellule dell'ipoblasto costituiranno le strutture extraembrionali (Fig. 1C). Durante i successivi stadi dello sviluppo, la pluripotenza dei blastomeri viene persa. Con la gastrulazione, i movimenti predeterminati delle cellule dell'epiblasto completeranno la formazione di strati cellulari diversi, i foglietti germinativi (Fig. 1D). Queste regioni cellulari indipendentemente termineranno lo sviluppo con la gastrulazione e l'organogenesi. Le cellule ectodermiche, le prime a livello temporale a distinguersi dalle altre, daranno origine ad epiteli esterni e sistema nervoso, le cellule più interne o endodermiche invece, dopo la migrazione, differenzieranno in cellule progenitrici degli epiteli interni e del mesoderma da cui si origineranno l'apparato cardiocircolatorio e muscolo-scheletrico.

Il percorso che ogni cellula o gruppo di cellule intraprenderà durante lo sviluppo è regolato da fattori trascrizionali e traduzionali e da meccanismi epigenetici che indurranno profili d'espressione differenziali nelle cellule adulte [Gilbert, 1996; De Leo et al., 2009].

1.6.2 - Le basi molecolari dello sviluppo e del differenziamento

Le cellule della massa interna della blastocisti, ovvero le cellule staminali embrionali per antonomasia, sono entità pluripotenti. Ogni cellula, infatti, è in grado di dare origine alle cellule progenitrici di tutti i tessuti. Durante la segmentazione, la pluripotenza e il suo mantenimento sono determinati a diversi livelli, strettamente correlati tra loro: trascrizionale, epigenetico e, come evidenziato in numerosi studi, da microRNA (miRNA).

Studi di espressione e di knock out con embrioni di topo hanno mostrato che il mantenimento della pluripotenza e la maturazione della blastocisti sono regolati da 3 fattori di trascrizione chiave, *OCT3/4*, *SOX2*, che come eterodimeri sono fondamentali per la transizione da morula a blastocisti precoce, e *NANOG*, fondamentale per il corretto sviluppo in blastocisti tardiva [Boyer et al., 2005; Chen e Daley, 2008].

Il mantenimento della condizione pluripotente è determinato *in primis* dai livelli di trascrizione di questi tre geni, a loro volta regolati da circuiti di retroazione positiva e controllo duale (i.e. ogni gene regola l'espressione degli altri). Codificando, poi, per fattori di trascrizione, questi interagiscono direttamente o mediante altri fattori con la cromatina, modificandone la conformazione, rendendo accessibili o meno alla trascrizione determinate regioni. L'espressione dei geni della pluripotenza induce l'espressione di altri geni correlati allo stato indifferenziato per attivazione del promotore di questi [Boyer et al., 2005; Marson et al., 2008], di geni che influenzano direttamente o meno il ciclo cellulare [Pauklin e Vallier, 2013], e, al contempo, reprimono l'espressione dei geni per la determinazione dei tessuti extraembrionali e dell'endoderma primitivo [De Leo et al., 2009; Gilbert, 1996]. In questa rete di regolazione è stato mostrato che anche gli RNA non tradotti hanno un ruolo nel mantenimento della pluripotenza. L'espressione di *OCT3/4*, *SOX2* e *NANOG* è stata infatti correlata alla presenza di un set di microRNA, specifico dello stato indifferenziato [Barroso-delJesus et al., 2008; Card et al., 2008, Marson et al., 2008], che coadiuva i meccanismi di autorinnovamento indirettamente, inibendo la metilazione della cromatina, l'apoptosi e bloccando gli inibitori del ciclo cellulare [Greve et al., 2013; Pauklin e Vallier, 2013].

La transizione tra lo stadio di blastocisti e l'inizio della gastrulazione è segnata da una drastica perdita di potenzialità differenziative delle cellule embrionali. Le

cellule dei tre foglietti germinativi proseguiranno indipendentemente il percorso differenziativo che sarà limitato ad un numero ristretto di tipi cellulari.

I meccanismi molecolari che regolano queste fasi e l'instaurarsi della multipotenza sono molto complessi e l'induzione e regolazione di questa (la multipotenza) è da ricercarsi in una fitta rete che coinvolge numerosi pathway, famiglie di proteine, nonché cluster specifici di miRNA. L'inibizione dell'espressione dei geni della pluripotenza, mediata da molteplici fattori, tra cui il raggiungimento del numero critico di cellule nella blastocisti e specifici set di microRNA, si ripercuote sugli stessi circuiti di regolazione responsabili del mantenimento della pluripotenza.

Il ciclo delle cellule pluripotenti è caratterizzato da una rapida transizione tra le fasi G1-S e G2-M [Greve et al., 2013] che si traduce in una rapida proliferazione. Durante il differenziamento sia in topo che uomo, invece, la fase G1 risulta più lunga; il significato di questo sta non solo nel rallentamento della proliferazione ma, come recentemente evidenziato, nella definizione del destino differenziativo [Pauklin e Vallier, 2013].

L'inibizione dell'azione regolatoria dei geni della pluripotenza viene accompagnata dall'attivazione della trascrizione di *Gooseoid*, o "organizzatore della gastrulazione" [Spemann e Mangold, 2001; Sharon et al., 2011], dei marker precoci della gastrula, quali *BRACHYURI*, *NODAL*, *NOGGIN* e *FOXA2*, e poi dei geni specifici dell'endomesoderma, *TBX6*, *HAND1*, *ESP1* ed *ESP2*, e neuroectoderma, *SOX1* e *GB2* [Calder et al., 2013]. Numerosi sono i pathway che regolano questi eventi tra cui quello dell'FGF (Fibroblast Growth Factor) e WNT nell'induzione alla gastrula e sonic-edgehog (Shh) nella neurulazione i quali, nel complesso, causano una serie di eventi a cascata. Le vie di segnalazione di WNT e del TGF β (Transforming Growth Factor beta) mediano i meccanismi di migrazione cellulare, predefinita a livello spazio-temporale che portano alla definizione dell'endomesoderma e la differenziazione dei foglietti germinativi. All'interno di questi, i vari gruppi di cellule inizieranno a assumere la propria identità e il commitment andrà a definirsi con espressione dei marcatori di lineage specifici, come ad esempio *GATA4* ed *NKX 2.5* nel mesoderma cardiaco, *NEUROG1* nell'ectoderma nervoso, *RUNX2* nell'osteogenesi. Iniziano anche i primi eventi di morte programmata; il silenziamento di *OCT3/4*, *SOX2* e *NANOG*, in parallelo con l'azione di cluster stadio specifici di miRNA, porterà all'attivazione di p53 e del pathway delle caspasi e al rimodellamento fisiologico delle future strutture corporee [Greve et al., 2013].

In tutti i processi fisiologici, la descrizione dei meccanismi molecolari rischia di conferire ai processi stessi un'accezione statica e definita su una scala temporale che in realtà non è così discreta. Nel caso delle cellule staminali, i vari pathway che regolano commitment e differenziamento non sono da relegare in una fissa finestra temporale né come meccanismi che agiscono indipendentemente. Basti pensare al duplice ruolo di *NODAL* (uno dei geni chiave della via di segnalazione di WNT), la cui espressione è generalmente associata al mantenimento della pluripotenza. Nello stadio di blastocisti, l'induzione al differenziamento ectodermico è bloccata dall'espressione concomitante di *NODAL*, *FGF* e *NANOG*. Recentemente, è stato evidenziato che *NODAL* regola sistemi trascrizionali diversi e divergenti, partecipando anche alla specificazione endodermica [Brown et al., 2011; Mullen et al., 2011], o, ancora, l'espressione di *SOX2* è fisiologicamente attiva anche nei progenitori neurali [Cedar e Bergman, 2008].

Inoltre, non è solo l'espressione di uno o più geni a determinare il destino di una cellula. Molecole ad azione morfogena, come l'acido retinoico o Shh, regolano lo sviluppo in funzione del loro gradiente. Inoltre, in un recentissimo lavoro di Pauklin e Vallier [2013] è stato mostrato il ruolo fondamentale che ricopre il ciclo cellulare nel differenziamento. A parità di stimoli differenziativi, la percentuale maggiore di cellule staminali embrionali che intraprenderanno un percorso differenziativo è in fase G1 del ciclo. Mediante saggi d'espressione hanno anche mostrato che cellule in fase G1 precoce esprimono prevalentemente marcatori endomesodermici, mentre quelle in G1 tardiva neuroectodermici [Pauklin e Vallier, 2013].

Queste evidenze sperimentali sottolineano il dinamismo dei processi cellulari, in cui lo stesso segnale, che sia un trascritto e/o un morfogeno, partecipa a più vie di segnalazione cellulari con effetti diversi in funzione di dove e quando questi processi avvengono.

1.6.3 - Dedifferenziazione, transdifferenziazione e riprogrammazione

Anche le cellule staminali adulte mantengono la capacità di intraprendere un percorso differenziativo. Queste restano quiescenti nella nicchia tissutale in cui si trovano e, solo sotto determinati stimoli, rientrano nel ciclo direttamente in fase S [Di Leo et al., 2009; Ullah et al., 2013] in modo da mantenere l'omeostasi del tessuto in cui risiedono. Vale a dire che, seppur staminali, queste cellule possono differenziare in un numero limitato di tipi cellulari. Recentemente, la linearità dei processi

differenziativi è stata messa in contraddizione da numerose evidenze, sia in topo che in uomo, sulle potenzialità differenziative di tutti i tipi cellulari. Sia *in vitro* che, in alcuni casi limitati, *in vivo*, cellule somatiche possono intraprendere programmi differenziativi e, in definitiva, rigenerativi, mediante dedifferenziazione, transdifferenziazione e riprogrammazione nucleare.

E' stato osservato *in vivo*, in modelli murini, che le cellule di Schawn, tipo cellulare considerato in fase G0 dopo lo sviluppo, dopo danno assonale, riprendono a proliferare come cellule precursori e ri-differenziano in cellule mature. In altri termini, perdono temporaneamente il loro stato differenziato, o de-differenziano, per ripristinare un danno [Mirsky et al., 2008]. In uomo, questo processo è stato verificato solo *in vitro*, modificando le condizioni di coltura. In assenza di siero, cellule follicolari della tiroide hanno iniziato ad esprimere i marcatori delle cellule progenitrici ma non quelli del differenziamento [Suzuki et al., 2011] e cheratinociti, mantenuti in terreno supplementato con il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), esprimevano i marcatori delle staminali dei cheratinociti [Sun et al., 2011].

Il de-differenziamento di una cellula matura può portare anche alla manifestazione di un fenotipo di cellula differenziata diverso da quello iniziale. E' questo definito transdifferenziamento. Non c'è ancora accordo se questo processo avvenga mediante la temporanea acquisizione dei caratteri di cellula progenitrice o per diretta conversione di lineage in quanto, *in vitro*, le evidenze sono contrastanti. Se da un lato, da fibroblasti umani sono state ottenute cellule del sangue [Szabo et al., 2010] o neuroni [Vierbuchen et al., 2010] direttamente, esperimenti di transdifferenziazione con cellule differenziate derivate da cellule mesenchimali hanno mostrato che queste acquisivano i caratteri di progenitrici per poi assumere un nuovo fenotipo maturo [Liu et al., 2010; Ullah et al., 2013].

Parallelamente, sono state sviluppate metodiche per ottenere il ripristino della pluripotenza in cellule già differenziate. Takahashi e Yamanaka hanno mostrato come fosse possibile riprogrammare cellule mature senza l'utilizzo di oociti o fusione con cellule embrionali [Takahashi e Yamanaka, 2006]; l'induzione del fenotipo simil-embrionale era possibile trasferendo nelle cellule murine *Oct3/4*, *Sox2*, fattori di trascrizione già identificati come responsabili del mantenimento della pluripotenza [Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006], *c-Myc*, fattore correlato all'oncogenesi [Cartwright et al., 2005] e *Klf4* [Takahashi e Yamanaka, 2006]. Lo stesso approccio si è rivelato efficace anche per la generazione di cellule pluripotenti indotte (iPS)

umane, sia trasfettando *c-MYC* e *KLF4* [Takahashi et al., 2007] che *NANOG* e *LIN28* [Yu et al., 2007] oltre ad *OCT3/4*, *SOX2*.

Se, da un lato, l'utilizzo di vettori virali rappresenta un'alternativa all'utilizzo di oociti e di embrioni umani, dall'altro comporta importanti limitazioni per l'applicazione in medicina rigenerativa. L'introduzione di transgeni, tra cui oncogeni come *c-Myc*, così come l'utilizzo dei retrovirus, può infatti contribuire allo sviluppo e progressione di lesioni cancerose [Mitalipov e Wolf, 2009].

1.7 - Le strategie differenziative

Lo studio e comprensione dei vari meccanismi molecolari dello sviluppo e differenziamento è uno dei principi su cui trova fondamento la medicina rigenerativa, in quanto offre le basi per riprodurre *in vitro* ed *in vivo* l'induzione verso uno specifico percorso differenziativo di una cellula staminale. Prenderemo in esame alcune strategie che negli ultimi anni stanno trovando grande applicazione nella ricerca in terapia cellulare. Verrà illustrato come l'utilizzo di molecole, sia naturali che di sintesi, sono utilizzate per indurre l'espressione di determinati geni o per inibire la proliferazione e verranno illustrate le recenti evidenze di come stimoli di natura fisica si sono dimostrati modulatori della fisiologia delle cellule staminali.

1.7.1 L'induzione al differenziamento mediante l'utilizzo di molecole

L'induzione della pluripotenza in cellule somatiche adulte [Takahashi e Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007] ha dato la consapevolezza che il destino di una cellula, adulta o staminale, può essere modificato. L'espressione di transgeni, sia mediata da vettori virali che non [Bayart et al., 2013; Park et al., 2012], così come i cosiddetti "cocktail differenziativi", non sono però gli unici approcci sperimentali per indurre un determinato stato differenziativo. Lo studio della biologia molecolare dello sviluppo ha infatti permesso di identificare alcune molecole regolatrici dei momenti critici che determineranno il destino di una cellula e in numerosi lavori è stato evidenziato come la somministrazione di questi composti possa indirizzare cellule staminali ad esprimere un determinato fenotipo o modificare il fenotipo di una cellula già differenziata.

L'acido retinoico (RA), metabolita della vitamina A, rappresenta un interessante esempio. Al contrario dei fattori proteici, dei quali è stato già discusso, l'acido retinoico è una molecola che è in grado di entrare direttamente nel nucleo legandosi ai geni bersaglio. Il ruolo di questa molecola durante lo sviluppo embrionale è stato ampiamente investigato [Duester, 2008], portando all'evidenza che l'acido retinoico partecipi allo sviluppo di numerosi tessuti ed organi, dalla specificazione dei neuroni motori [Li et al., 2005] e sviluppo del midollo spinale [Lara-Ramírez R et al., 2013], allo sviluppo del mesoderma cardiaco [Niederreither et al., 2001].

L'azione morfogena dell'acido retinoico si è rivelata efficace anche *in vitro*, nell'induzione al differenziamento in molte tipologie di cellule staminali. Ad esempio, RA promuove il differenziamento neurale in cellule embrionali [Erceg et al., 2008], in cellule di carcinomi embrionali [Jones-Villeneuve et al., 1982; Yu et al., 2012] e nelle MSCs [Anghileri et al., 2008]. Inoltre, esteri dell'acido retinoico con acido ialuronico e butirrico (HBR) promuovono il differenziamento in maniera specifica in senso cardiaco in cellule embrionali di topo e MSC umane [Maioli et al., 2010; Ventura et al., 2007].

Oltre alle molecole somministrate esogenamente, un ruolo fondamentale nella determinazione del destino di una cellula è ricoperto dalle molecole secrete presenti nel microambiente extracellulare. In diversi studi è stato infatti riportato come sistemi di co-coltura agiscano da fattori pro-differenziativi. A titolo d'esempio, corpi embrioidi derivati da hES in co-coltura con MSC da midollo osseo formano cluster cellulari simil-emopoietici [Wang et al., 2005]. Analogamente, è stato evidenziato come la co-coltura di MSC da tessuto adiposo umano con tenociti isolati *ex-vivo* inducesse il differenziamento in senso tenogenico nelle cellule mesenchimali [Kraus et al., 2013].

Anche il destino di una cellula adulta può essere modificato mediante la somministrazione di molecole di origine naturale. E' il caso, ad esempio, delle cellule tumorali trattate con soluzioni contenenti fattori di differenziamento di cellule staminali embrionali ("Stem cell differentiation stage factors", SCDSF) di Zebrafish (*D. rerio*). Studi sia *in vitro* che *in vivo* hanno mostrato gli effetti antiproliferativi di questi estratti. Linee cellulari tumorali, trattate con soluzioni derivanti da embrioni di pesce zebra in organogenesi, rallentano la loro proliferazione entro le 48 ore dalla somministrazione [Biava et al., 2001]. Questo effetto è stato riscontrato anche *in vivo*, in un trial clinico con pazienti affetti da epatocarcinoma in stadio avanzato non trattabili con le terapie concenzionali. La risposta ai trattamenti, stimata come crescita del tumore e livelli di

marcatori tumorali, nel 25% dei soggetti risultava completa o in remissione mentre la sopravvivenza dopo 36 mesi di follow-up era del 60% [Livraghi et al., 2005].

Il significato a livello cellulare e molecolare di questi risultati, è da ricercare in alcune caratteristiche delle cellule tumorali e nella composizione degli estratti embrionali. La proliferazione e autorinnovamento cellulare che sostengono la crescita tumorale hanno basi molecolari simili alle cellule staminali. Analisi *in vitro* su cellule tumorali immortalizzate hanno fatto luce sui meccanismi molecolari bersaglio dei trattamenti con SCDSF. I fattori contenuti in queste soluzioni promuovono l'attivazione di p53 e inducono modificazioni post-trascrizionali di pRb (proteina del retinoblastoma), entrambe a funzione anti-oncogenica [Biava e Carluccio, 1997; Biava et al., 2002] ed entrambe coinvolte nell'instaurarsi del differenziamento nelle cellule staminali [Greve et al., 2013; De Falco et al., 2006]. A titolo d'esempio studi effettuati su linee CaCo2 trattate con gli estratti di pesce zebra all'inizio della gastrula hanno evidenziato che l'inibizione di crescita e proliferazione cellulare erano correlate all'aumento di pRb fosforilata [Cucina et al., 2006] e al pathway proapoptotico mitocondriale, provocando un aumento dei livelli di caspasi-3, -7 ed -8 [D'anselmi et al., 2011].

Studi comparativi degli effetti degli estratti di Zebrafish a diversi stadi di sviluppo hanno indicato che solo le soluzioni derivate da embrioni in organogenesi erano efficaci nell'inibire la proliferazione dei vari modelli cellulari [Biava et al., 2001]. Ciò ha suggerito che gli effetti evidenziati fossero da imputare a fattori proteici stadio-specifici, conservati a livello evolutivo, che agiscono non solo sullo sviluppo di *D. rerio* ma anche sulle cellule con caratteristiche di staminalità di altre specie.

Le ricerche condotte su queste molecole naturali costituiscono la base scientifica di parte del lavoro di ricerca presentato in questa tesi.

1.7.2 Il ruolo regolatorio delle forze fisiche sulla fisiologia cellulare: le onde

Il concetto di onda è stato definito inizialmente da Einstein e Infeld [Einstein e Infeld, 1971] come “movimento di energia attraverso la materia”, mantenendo implicita la presenza a monte di una sorgente. Questa definizione generica si può ampliare specificando le caratteristiche della sorgente, del mezzo di propagazione, della direzione e tipologia del moto dell'energia. Possiamo quindi definire l'onda acustica come la propagazione tridimensionale della pressione esercitata a partire da una sorgente su un mezzo elastico, che sia gassoso, liquido o solido (onde

meccaniche). Ogni fenomeno ondulatorio può essere descritto a livello matematico mediante la definizione dei parametri dell'onda, ovvero frequenza, periodo ed ampiezza (Fig. 2) che ne descrivono la morfologia, sinusoidale o quadra.

Il concetto di "propagazione dell'energia" utilizzato da Einstein può essere tradotto come "propagazione dell'informazione": sotto quest'ottica, che si adatta meglio alla trattazione delle energie fisiche sui sistemi biologici, uno stimolo ondulatorio rappresenta un pacchetto di informazioni, costituito dalla modulante dell'onda, che, attraversando un mezzo può modificarne temporaneamente o meno le caratteristiche. Il passaggio attraverso un mezzo dell'informazione, modifica il mezzo ma ha anche effetti sull'informazione stessa per i fenomeni di diffrazione, rifrazione, attenuazione o l'interferenza ad opera di altre onde [Mencuccini e Silvestrini, 2010].

Dati questi presupposti è stato lecito ipotizzare un ruolo regolatorio nell'omeostasi e fisiologia cellulare delle vibrazioni, ipotesi che ha avuto maggior consistenza con l'utilizzo del microscopio a forza atomica (AFM) su cellule da parte del gruppo di ricerca di Gienzewski. Questo strumento è in grado di fare una scansione tridimensionale di un preparato, grazie ad una microleva con punta di silicio che entra in contatto dinamico con una superficie e ne registra le variazioni nanometriche. La scansione di cellule di *S.cerevisiae* con l'AFM ha permesso di registrare una mappa della superficie cellulare e al contempo variazioni nanometriche date dai movimenti della cellula stessa [Pelling et al., 2004]. L'apparato citoscheletrico, infatti, genera e trasmette stimoli di natura meccanica in virtù delle sue caratteristiche contrattili. Queste contrazioni producono dei movimenti di natura ondulatoria e rappresentano, in definitiva, una via di segnalazione che si può propagare attraverso l'ambiente intra- ed extracellulare. Qualsiasi evento cellulare, quindi, può essere causa e conseguenza dell'azione di forze di natura nanomeccanica e, viceversa, un determinato pattern di vibrazioni può essere associato ad uno specifico evento cellulare. Cross e colleghi hanno evidenziato ad esempio come i profili vibrazionali di cellule sane e tumorali fossero diversi [Cross et al., 2007 e 2008].

Anche l'applicazione di forze fisiche su un modello cellulare può modularne la fisiologia sia *in vitro* che *in vivo*. Onde elettromagnetiche somministrate con un dispositivo chiamato REAC (Radio Electric Asymmetric Conveyer) possono modificare l'espressione genica di cellule staminali embrionali murine, staminali adulte umane e fibroblasti adulti [Maioli et al., 2012, 2013a e 2013b], inducendo l'espressione dei marcatori dei principali destini differenziativi accompagnata dall'inibizione di quella dei geni della pluripotenza, mentre vibrazioni meccaniche

aumentano *in vitro* il potenziale osteogenico di cellule mesenchimali di ratto [Lau et al., 2011] ed *in vivo* inibiscono l'adipogenesi nel topo [Rubin et al. 2007].

1.8 Potenzialità delle cellule stromali mesenchimali adulte

Dall'isolamento delle prime cellule stromali dal midollo osseo [Friedentein et al., 1982, 1987], la ricerca si è concentrata nello studio delle caratteristiche e potenzialità terapeutiche delle cellule mesenchimali, considerando anche tutti i problemi di natura etica correlati alle staminali embrionali umane [Maienschein, 2010].

I numerosi studi sulle MSC hanno infatti indicato queste cellule come ottime candidate per la terapia cellulare, in termini di distribuzione e isolamento e delle loro caratteristiche fisiologiche.

Le cellule stromali sono distribuite in tutti gli organi adulti e sono facilmente reperibili mediante comuni procedure chirurgiche. Inoltre, la frazione stromale è relativamente semplice da isolare da altri tipi cellulari in quanto in coltura aderiscono rapidamente alla plastica e, a livello genetico, presentano stabilità durante la fase di espansione [Bellavia et al., 2013].

Alla facile reperibilità delle cellule staminali stromali adulte, si associa la plasticità di queste. Nelle opportune condizioni, infatti, le MSC intraprendono i percorsi differenziativi mesodermici *in vitro* e trial clinici sono stati condotti per valutare l'applicabilità di queste cellule nel trattamento di patologie a carico del sistema scheletrico, nervoso, cardiaco, così come per il diabete [Trounson et al., 2011 Liu SH et al., 2013; Domínguez-Bendala et al., 2011 e 2012].

Non da ultimo, le MSC presentano dimostrate proprietà immunomodulatorie, sono scarsamente immunogeniche, data la minima espressione delle proteine MHC II, e, *in vivo*, dopo infusione, migrano verso il tessuto danneggiato coadiuvando i processi rigenerativi *in loco*. Per queste ragioni potrebbero essere utilizzate sia per autotrapianti che trapianti allogenici per via intravenosa, evitando i fenomeni di rigetto.

Nonostante queste potenzialità terapeutiche, l'utilizzo delle MSC ha ancora molteplici aspetti da approfondire, dovuti alle variabili difficili da analizzare e controllare *in vitro* [Robey, 2000; Kolf et al., 2007].

Il successo di un trapianto di cellule staminali, sia autologo che allogenico, è vincolato da molteplici fattori. Nel caso più semplice in cui il donatore di MSC è allo stesso tempo il ricevente, se da un lato il rischio di immunogenicità è nullo, dall'altro la patologia che richiede il trapianto può inficiare sulla disponibilità ed efficacia delle MSC [Patel et al., 2008]. Più in generale, la variabilità fenotipica e fisiologica che si riscontra tra individui diversi si ripercuote sull'efficacia del trattamento a base cellulare; ad esempio, è stato stimato che le potenzialità delle MSC variano notevolmente con l'età ed il sesso del donatore [Cook et al., 2012; Bianchi et al., 2013].

Anche le caratteristiche del ricevente rappresentano un'importante variabile. Nella terapia cellulare, il farmaco, il prodotto biologicamente attivo è una popolazione cellulare e l'efficacia terapeutica di questa richiede la somministrazione di una data dose per un dato periodo che varia non solo con le patologie, ma anche in funzione dell'individuo. Studi *in vivo* sull'asma hanno indicato che un'unica somministrazione di MSC risultava efficace sui modelli animali utilizzati [Bai et al., 2009]. Tuttavia, in trial clinici per il trattamento di molte patologie, quali il morbo Chron e la sclerosi multipla, hanno richiesto molteplici infusioni di MSC [Bonfield et al., 2010].

Altro aspetto non valutabile *in vitro* è l'homing, ovvero la migrazione delle MSC verso l'organo bersaglio, e l'efficienza di differenziamento di queste in quanto non c'è modo di quantificare quante cellule infuse arrivino al tessuto bersaglio né quante differenzino nel tipo cellulare necessario [Dimarino et al., 2013]. Per questo motivo, al momento non è possibile stabilire se i segnali locali siano sufficienti ad indurre migrazione e differenziamento delle MSC o se sia necessario un commitment o un differenziamento *in vitro* in cellule progenitrici prima del trapianto [Lanzoni, 2010].

SCOPO DELLA RICERCA

La ricerca alla base di questa tesi si inserisce nel contesto della medicina rigenerativa e si propone di trovare nuove strategie differenziative per rendere più efficace la terapia cellulare. Particolare rilievo nella nostra ricerca ha avuto tutto ciò che riguarda la preparazione del PTC, ovvero la scelta della tipologia di cellula mesenchimale, l'isolamento da tessuto e, appunto, la ricerca di fattori che ne possano modificare il fenotipo, nel nostro caso fattori che possano indurre il commitment o il differenziamento.

Abbiamo scelto come modello le cellule stromali isolate da tessuto adiposo (hASC) mediante un dispositivo medico, il Lipogems, che consente l'isolamento della frazione stromale senza l'utilizzo di digestioni enzimatiche; come fattori modulatori e/o differenziativi abbiamo scelto di testare stimoli fisici di natura ondulatoria ed estratti proteici embrionali di Zebrafish ottenuti turboemulsionando degli embrioni.

La scelta della tipologia di stimoli si basa su evidenze sperimentali pregresse, descritte anche nell'introduzione che ne suggeriscono il potenziale pro-differenziativo o, quantomeno, inducono a pensare a tale possibilità.

Stimoli di natura ondulatoria vengono prodotti fisiologicamente dalle cellule, sia per vibrazioni molecolari che per movimenti citoscheletrici, rappresentando una forma di comunicazione cellulare. Lavori che hanno studiato gli effetti di trattamenti di natura ondulatoria su modelli cellulari hanno evidenziato che questi stimoli risultano modulatori della fisiologia cellulare e in determinati casi risultano pro-differenziativi.

Analoga ipotesi sperimentale è stata fatta per i trattamenti con gli estratti embrionali di pesce zebra. Queste soluzioni si sono dimostrate antiproliferative su diverse linee di cellule tumorali mentre in un trial clinico, che coinvolgeva pazienti con epatocarcinoma, hanno ridotto la crescita del tumore. Analisi molecolari hanno mostrato come trattamenti con estratti di embrioni in organogenesi di Zebrafish modificassero l'espressione di p53 e pRb, fattori proteici coinvolti nell'instaurarsi dei processi differenziativi nelle cellule staminali, suggerendo un'azione pro-differenziativa di questi.

Su queste basi è iniziato un nuovo progetto multidisciplinare che ha coinvolto biologi e biotecnologi, medici, ingegneri e fisici del suono, i cui obiettivi erano e sono tuttora:

-
- messa a punto di un nuovo modello cellulare, le hASC isolate con il Lipogems;
 - identificazione di nuovi di nuovi stimoli differenziativi, di natura fisica (onde) e molecolare (estratti proteici embrionali di Zebrafish);
 - messa a punto dei trattamenti con gli stimoli scelti;
 - analisi degli effetti prodotti da tali stimoli sul percorso differenziativo delle hASC utilizzate;
 - messa a punto ed ottimizzazione di strumenti per la somministrazione di stimoli meccanici sul modello cellulare in uso.

In questa tesi verranno presentati i risultati della parte svolta fino ad ora di uno studio multidisciplinare ancora in corso il cui obiettivo è quello di promuovere ed ottenere una rigenerazione tissutale con l'utilizzo di protocolli sperimentali che consentano la minor manipolazione possibile del prodotto per terapia cellulare, associata ad una maggiore efficienza del processo.

MATERIALI E METODI

2.1 - Isolamento delle hASC mediante tecnologia Lipogems

Il tessuto adiposo umano rappresenta un'abbondante e promettente risorsa di cellule stromali adulte (hASC, human adipose-derived stromal cells) e un importante strumento per la terapia cellulare [Sachs et al., 2012, Bianchi et al., 2013]. Nonostante i vantaggi dati dalla procedura di prelievo ed isolamento rispetto alla controparte da midollo osseo e le dimostrate potenzialità differenziative delle hASC [Zuk et al, 2001; Sachs et al., 2012], la frazione stromale isolata con il protocollo tradizionale dal lipoaspirato [Zuk 2001] risulta molto sensibile al congelamento e scongelamento [Bianchi et al., 2013; Bonaros et al., 2008]. Il ridotto tasso di sopravvivenza dopo la criopreservazione può essere correlato al ridotto potenziale adesivo delle cellule stesse come conseguenza della digestione enzimatica con Collagenasi I utilizzata nel protocollo di Zuk e collaboratori [Zuk et al., 2001].

Nel 2011 è stato brevettato il Lipogems (PCT/IB2011/052204), un dispositivo medico che consente di isolare la frazione stromale del lipoaspirato direttamente in sede chirurgica, sostituendo la digestione enzimatica con la triturazione meccanica. Il sistema è costituito da un cilindro, il core del dispositivo, riempito di soluzione salina e biglie, e da cannule che lo connettono ad una siringa per l'ingresso dell'aspirato e uscita del prodotto processato e ad una sacca di raccolta dello scarto. Alle due estremità del cilindro sono collocati dei filtri che riducono durante il processamento le dimensioni degli aggregati di tessuto. Il lipoaspirato viene immesso nel dispositivo tramite una siringa e, grazie alla pressione esercitata, questo subisce la prima triturazione per la presenza del filtro. Durante la procedura, il dispositivo viene ruotato di 180° più volte; grazie alla presenza delle biglie, gli aggregati di tessuto vengono ulteriormente ridotti in dimensione. I movimenti esercitati in associazione con la soluzione salina presente all'interno del cilindro consentono la formazione di un'emulsione di olio, presente per la rottura di adipociti, e elementi del sangue che vengono dirottati nella sacca di scarto grazie al flusso aperto di soluzione tampone. Il lipoaspirato flottante viene ulteriormente ridotto di dimensioni grazie alla presenza di un altro filtro (Fig. 3). Alla fine delle sollecitazioni meccaniche, il prodotto di Lipogems viene immesso in una nuova siringa e può essere subito utilizzato in caso di autotrapianto, messo in coltura o conservato a +4°C [Bianchi et al., 2013; Tremolada et al., 2010].

2.2 - Allestimento e mantenimento delle colture di hASC

Il prodotto di Lipogems arriva in laboratorio in siringa e si presenta visivamente bifasico in quanto, oltre al lipoaspirato processato è presente una porzione liquida derivante dai lavaggi durante la procedura di triturazione che verrà eliminata in fase di semina.

Allestimento delle colture.

L'allestimento della coltura prevede la semina diretta di 1.5 ml del prodotto di Lipogems in terreno α MEM (Lonza) supplementato con siero fetale bovino inattivato dal calore al 10% (FBS-HI, EuroClone), L-glutammina (2 mM, Lonza) e antibiotici entrambi all'1% (penicillina 200 U/ml e streptomina 100 μ g/ml, Lonza) in fiasche da 75 cm² con filtro (T75, Corning) e incubate a 37°C al 5% di CO₂. I cambi di terreno vengono effettuati ogni 4 giorni; per le prime 2 settimane di coltura, denominate passaggio 0, per favorire e massimizzare l'adesione delle hASC al supporto plastico, le T75 sono preventivamente trattate con una soluzione di coating (Fibronectina 0.55 μ g/cm², Collagene I/III 0.5 μ g/cm² in α MEM), si utilizza un minor volume di terreno e i cluster non aderenti del prodotto di Lipogems non vengono eliminati.

Mantenimento delle colture.

Quando le hASC al passaggio 0 raggiungono l'80-100% di confluenza, le cellule possono essere espanse in sottocolture, seminate per gli esperimenti o crioconservate.

Dopo rimozione degli aggregati flottanti e lavaggi in PBS, le cellule vengono distaccate con Tripsina-EDTA 1X (SIGMA-Aldrich, stock 10X con Tripsina 5 g/L e EDTA 2 g/L; diluizione in PBS) e fatte sedimentare a 2000 giri al minuto (rpm) per 5 minuti in centrifuga (ALC 4235A). Il surnatante viene scartato per rovesciamento e il pellet risospeso in funzione dell'utilizzo finale delle hASC.

Espansione delle colture.

La risospensione del pellet viene fatta in α MEM e la sospensione cellulare è messa nuovamente in coltura utilizzando 12 ml di terreno in fiasche T75. Generalmente si effettuano sottocolture ad un rapporto di 1:2 o 1:3 (supporto coltura iniziale e numero di sottocolture). Le colture in espansione sono mantenute alle stesse condizioni delle hASC al passaggio 0, ovvero a 37°C e CO₂ al 5% in α MEM con complementi.

Semina di hASC per gli esperimenti.

Dopo risospensione in terreno, le hASC vengono contate con Trypan Blue (SIGMA-Aldrich) in rapporto 1:1 con il volume dell'aliquota di sospensione cellulare in camera di conta Neubauer. Le cellule vengono seminate alla densità di 7000 cellule/cm² in piastre da 6 pozzetti (NUNC Falcon) o 5000 cellule/cm² in piastre da 48 pozzetti in α MEM con complementi e mantenute in incubazione per 24 ore prima dei trattamenti.

Crioconservazione.

Le hASC isolate con il Lipogems possono essere criopreservate senza modificarne la vitalità [Bianchi et al., 2013]. Il sedimento cellulare ottenuto dopo distacco con tripsina-EDTA viene risospeso in FBS e congelato a -80°C in terreno con 10% di dimetilsulfossido (DMSO, SIGMA-Aldrich) in apposite provette crioresistenti. Al momento dello scongelamento, effettuato a 37°C, le hASC vengono seminate come il prodotto fresco, direttamente in T75 effettuando il primo cambio di terreno il giorno seguente per eliminare il DMSO ed eventuali cellule morte.

2.3 - Caratterizzazione delle hASC isolate con il Lipogems

Sebbene le MSC siano state isolate da tessuto adiposo nel 2001 e ne sia stato dimostrato il potenziale differenziativo [Zuk et al., 2001 e 2002], la procedura utilizzata per la separazione della frazione stromale dal lipoaspirato prevedeva l'utilizzo di digestioni enzimatiche.

Con l'utilizzo del Lipogems invece, tale protocollo è stato sostituito da sollecitazioni meccaniche. Ciò ha reso necessaria la caratterizzazione della frazione cellulare isolata in modo da stabilire se questa soddisfacesse i requisiti per essere considerata una popolazione di MSC.

Si è quindi proceduto con l'identificazione del fenotipo immunologico delle hASC mediante FACS e sono state saggiate le loro potenzialità differenziative.

2.3.1 - Determinazione del profilo immunofenotipico delle hASC

Le cellule stromali da tessuto adiposo isolate con la tecnologia Lipogems sono state caratterizzate mediante citofluorimetria a flusso (FACS) in modo da identificarne il fenotipo immunologico.

Le hASC sono state distaccate dal supporto di coltura seguendo il protocollo standard per il trattamento con Tripsina-EDTA. Il sedimento cellulare è stato risospeso in 100 µl di PBS ed è stata effettuata la conta cellulare. La sospensione cellulare è stata diluita in un rapporto 1:1 con Trypan Blue e la conta è stata effettuata utilizzando la camera di conta Burker.

La sospensione cellulare è stata quindi incubata al buio a 4°C per 40 minuti con anticorpi anti-CD105, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD29, anti-CD166, anti-CD14, anti-CD34, anti-CD44 e anti-CD45 alla concentrazione di 1µg/10⁶ cellule. Le cellule marcate sono state quindi analizzate al citofluorimetro, utilizzando 10000 eventi, e i dati sono stati analizzati con il software associato allo strumento (FACSAria, BD Biosciences).

2.3.2 - L'esplicazione del potenziale differenziativo delle hASC

Altro requisito per definire mesenchimale una popolazione cellulare è la potenzialità di questa di differenziarsi in adipociti, osteociti e condrociti. Abbiamo condotto quindi saggi di induzione specifica sulle hASC.

Induzione adipogenica.

Le hASC, seminate alla densità di 10⁴ cellule/cm² in piastre da 24 pozzetti (NUNC), sono state indotte al differenziamento adipogenico utilizzando l' "Adipogenesis induction medium" (Millipore), ovvero D-MEM a basso contenuto di glucosio (D-MEM low glucose) al 10% di FBS, isobutil-metil xantina 0.5 mM, idometacina 200 µM, desametasone 1µM e insulina 10 µg/ml.

Il terreno è stato cambiato ogni 3 giorni e, dopo 2-3 settimane dalla semina le cellule sono state fissate in formalina al 10% e colorate con red-O solution in modo da poter visualizzare le gocce lipidiche.

Induzione osteogenica.

L'induzione all'osteogenesi è stata ottenuta con il "Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis kit" (Millipore). Le cellule sono state messe in coltura alla densità di 10⁴

cellule/cm² in piastre da 24 pozzetti in D-MEM low glucose al 10% di FBS con i seguenti complementi: β -glicerofosfato 10 mM, acido ascorbico 0.2 mM e desametasone 10 nM.

Il cambio di terreno è stato effettuato ogni 3 giorni e dopo 3-4 settimane di coltura in queste condizioni, le cellule sono state fissate in formalina e colorate con Alizarin Red Solution per visualizzare i depositi di Calcio.

Induzione condrogenica.

Per indurre il differenziamento condrogenico, aliquote di 5000 hASC sono state fatte sedimentare a 5000 rpm per 5 minuti in tubi da 15 ml e il surnatante è stato scartato. Sono stati aggiunti, senza risospendere, 0.5 ml di Chondrogenic Basal Medium (Lonza) addizionato con i complementi forniti dalla casa produttrice e pronti all'uso (supplementi ITS, desametasone, ascorbato, sodio piruvato, prolina, streptomicina/penicillina, L-glutammina) e 10ng/ml di Transforming Growth Factor - β 3 (TGF- β 3 R&D Systems).

Il terreno completo è stato sostituito ogni 3 giorni per almeno 3 settimane.

Per verificare l'avvenuto differenziamento, i pellet sono stati fissati in formalina e paraffina e poi trattati con il kit Vectastain elite ABC in modo da marcare il Collagene di tipo II (Chemicon. Int; Vector Laboratories).

2.4 - La somministrazione degli stimoli

Le hASC sono state il nostro modello cellulare nell'indagine sugli effetti di due tipologie di stimoli nei percorsi differenziativi; energie di natura ondulatoria e trattamenti con estratti embrionali di *Danio rerio* (Zebrafish).

2.3.1 Gli stimoli fisici: le onde acustiche

Le nostre condizioni sperimentali hanno previsto l'utilizzo di onde acustiche, ovvero quelle onde di frequenza compresa tra i 20 e i 20000 battiti al secondo o Hertz (Hz), la cui propagazione, raggiunta la membrana timpanica, causa la loro trasduzione in suono dal sistema nervoso.

Le hASC in coltura sono state sottoposte a stimoli ondulatori acustici utilizzando due apparati progettati e costruiti in collaborazione con ingegneri e tecnici del suono per l'utilizzo su sistemi biologici.

Abbiamo condotto due gruppi di esperimenti, diversi per il tipo di stimolo (onde semplici e onde complesse) e per la progettazione del piano sperimentale (analisi degli effetti dopo un tempo variabile dalla fine dello stimolo e immediata) che è stato definito *in itinere*.

Nella fase preliminare dello studio è stata applicata un'onda semplice, sinusoidale o quadratica, per diversi tempi utilizzando il diaframma di un altoparlante come trasduttore. In un secondo momento lo stimolo utilizzato è stato un'onda complessa, mediante l'utilizzo di un altro apparato di trasduzione, il Cell Exciter.

La somministrazione di onde semplici: il generatore di oscillazioni meccaniche.

Il concetto di onda semplice o singola è da ricercare nella definizione della modulante dell'onda, ovvero nell'informazione che si propaga. Avremo un'onda semplice, quindi, se la modulante dell'onda (informazione che si propaga) è contenuta nel periodo o lunghezza d'onda di un'unica frequenza. L'onda singola può essere ulteriormente caratterizzata definendone la funzione, data da equazioni matematiche, come sinusoidale (oscillatoria) o quadra (del tipo 0-1) (Fig. 2).

L'onda semplice è stata somministrata a colture di hASC utilizzando un apparato progettato e costruito in collaborazione con Sandro Sandrolini, esperto tecnico del suono, chiamato generatore di oscillazioni meccaniche. Questo è costituito da un generatore di frequenze (Fig. 4A) collegato ad un amplificatore (Fig. 4B). Quest'ultimo contiene fisicamente anche il trasduttore (Fig. 4C), cioè l'elemento che converte l'onda teorica in onda meccanica, rappresentato dalla membrana dell'altoparlante (Fig. 4C). Questo sistema è stato appositamente costruito per i nostri scopi sperimentali. Il dispositivo usato come sorgente è stato progettato per consentire all'operatore di selezionare i parametri d'onda desiderati in termini di frequenza (espressa in Hz), funzione (sinusoidale o quadratica), duty cycle (il parametro che definisce la proporzione dell'onda positiva rispetto a tutta l'onda, espressa come percentuale dell'oscillazione completa; Fig. 2) ed intensità (o volume). La regolazione di quest'ultima, ci ha permesso di mantenere l'intensità dell'onda somministrata sotto la soglia dell'accelerazione gravitazionale g ($g = 9,8 \text{ m/s}^2$). La regolazione di questo parametro risulta molto importante in quanto un'intensità di accelerazione oltre i $9,8 \text{ m/s}^2$ provocherebbe vibrazioni del supporto di coltura che interferirebbero con il

nostro trattamento. Lo stimolo selezionato a livello del generatore di frequenze, ancora di natura elettrica, viene amplificato e poi trasdotto in onde meccaniche dalla membrana (o diaframma) dell'altoparlante. Peculiarità dell'altoparlante, che si è rivelata fondamentale per la somministrazione dello stimolo ondulatorio a cellule in coltura, è il diaframma piatto. Questa caratteristica ha consentito la propagazione dello stimolo in uscita perpendicolare rispetto alla piastra, posta su di esso, e non nelle 3 dimensioni dello spazio.

Per gli esperimenti con le onde semplici, l'amplificatore e l'altoparlante sono stati collocati all'interno dell'incubatore, posizionando la piastra di coltura a contatto con il diaframma, la componente vibrante del sistema. La posizione relativa tra la coltura cellulare e il diaframma è stata modificata durante il percorso sperimentale così come l'isolamento interno dell'incubatore. L'apparato di trasduzione in virtù delle sue componenti elettriche genera un campo elettromagnetico, anch'esso di natura ondulatoria, che non solo può interferire con lo stimolo vibrazionale da noi somministrato ma è stato dimostrato avere effetti sull'espressione genica su diversi tipi cellulari [Maioli et al., 2011]. Il sistema amplificatore-altoparlante è stato poi isolato grazie ad una scatola di materiale amagnetico, consentendo la trasmissione delle vibrazioni alle colture grazie alla presenza di un connettore plastico, posizionato sul diaframma e su cui sono state collocate le piastre (Fig. 4B). Per evitare che le vibrazioni somministrate si trasmettessero al ripiano dell'incubatore e, per il principio di azione e reazione, queste venissero ritrasmesse al nostro sistema, è stato inserito un piano di marmo, facilmente sterilizzabile, come base d'appoggio per l'apparecchiatura. In questo modo è stato possibile mantenere le colture di controllo nello stesso incubatore utilizzato per la somministrazione degli stimoli.

I trattamenti con le onde semplici somministrate con il generatore di vibrazioni meccaniche.

Le hASC al passaggio 3-5 di sottocoltura sono state seminate alla densità di 7000 cell/cm² su piastre da sei pozzetti (NUNC) in 3.2 ml di α MEM con complementi e mantenute in incubatore a condizioni standard (37°C, 5% di CO₂) per 24 ore prima dell'inizio del trattamento. Sono stati effettuati trattamenti sia con onde quadriche che sinusoidali di frequenza pari a 0.55 Hz, duty cycle del 50% e intensità inferiore a 1g per 24 ore; per l'estrazione dell'RNA è stato atteso un tempo di 24 e 48 ore in incubazione dopo la fine dello stimolo (Tab. 1A).

In ogni esperimento le colture di controllo sono state mantenute in incubatore senza stimolo per la stessa durata dei vari trattamenti.

La somministrazione di onde complesse.

Il secondo gruppo di esperimenti è stato eseguito utilizzando come stimolo un'onda complessa, ovvero un insieme di frequenze con le proprie caratteristiche che si propagano nel mezzo nella stessa finestra temporale, utilizzando il generatore di onde meccaniche, usato in precedenza per le onde singole, ed un nuovo strumento, il Cell Exciter.

Caratterizzazione del suono.

Lo stimolo acustico scelto per i nostri studi deriva da suoni cardiaci, opportunamente processati in modo da convertirli in segnali elettro-musicali fedeli ai soli suoni cardiaci.

I suoni cardiaci sono stati acquisiti con uno stetoscopio digitale (E-Scope; Cardionics) e sono stati filtrati per eliminare il rumore, in particolare quello dovuto alla respirazione, in modo da riuscire a registrare anche i suoni a bassa frequenza, sotto i 20 Hz. Il segnale filtrato è stato caratterizzato a livello informatico in termini di frequenze e durata. E' stata misurata la forma dell'onda, in modo da ricostruirla fedelmente a partire dal campione iniziale filtrato ed è stata monitorata per determinare e localizzare l'ampiezza dei picchi negativi e positivi del segnale. Il massimo valore della differenza fra picchi successivi, infatti, ci fornisce la durata di ciascun suono cardiaco. Il suono cardiaco, così registrato e processato, è composto da 8 frequenze diverse a funzione sinusoidale (Tab. 2), dai 40 ai 105 Hz con durata diversa, dai 91 ai 905 millisecondi (ms).

Infine, il segnale filtrato è stato convertito nel segnale audio elettro-musicale che abbiamo somministrato alle cellule durante i nostri esperimenti con l'onda complessa. Durante la prima fase sperimentale, abbiamo utilizzato questo suono come normalizzato o sovrapposto (overlaid), ovvero il suono in cui tutte le singole frequenze partono nello stesso momento (t_0).

Successivamente, abbiamo effettuato trattamenti con la stessa onda complessa ma non sovrapposta, in cui le varie frequenze partono al proprio t_0 fisiologico, dando quindi una melodia.

Il Cell Exciter.

Per le nostre esigenze sperimentali dopo una prima sperimentazione con il generatore di vibrazioni meccaniche si è reso necessario l'utilizzo di uno strumento costruito in modo che fosse anche riproducibile, il Cell Exciter. La progettazione di questo apparato per la somministrazione del suono è stata effettuata *ad hoc*, in collaborazione con il tecnico Maurizio Villa, in modo da avere un segnale in uscita (suono effettivo che viene somministrato alle cellule) fedele al suono originale e ripetibile a livello sperimentale. Tutte le parti che compongono il Cell Exciter sono di origine industriale, acquistate singolarmente ed assemblate in modo da avere: un ingresso per lo stimolo desiderato (lettore CD), un mixer, un equalizzatore, un amplificatore, una sonda di carico per dissipare il calore e un trasduttore per l'uscita dello stimolo (Fig. 5). L'onda complessa utilizzata è stata masterizzata su compact disk (CD) come traccia audio; il lettore CD, dotato di modalità di ripetizione, ci ha consentito di effettuare trattamenti di diversa durata. Come per lo strumento utilizzato in precedenza, regolando il volume dal mixer si riesce a impostare l'intensità dello stimolo in modo che sia minore di 1g. La taratura dell'intensità è stata eseguita con le piastre di coltura posizionate sul supporto del trasduttore in quanto l'accelerazione è una funzione della massa. Con il Cell Exciter la fedeltà del suono in uscita rispetto a quello in entrata è ottenuta a più livelli. Il pannello di equalizzazione ci ha consentito di filtrare e regolare i livelli del suono in modo che il rumore di fondo della macchina e altri suoni esterni non andassero ad alterare il nostro stimolo. Il suono linearizzato passa quindi attraverso l'amplificatore e ne esce identico, della stessa morfologia, ma amplificato in termini di voltaggio. Il suono amplificato, ancora sotto forma di impulsi elettrici, passa per una sonda di carico (che dissipa l'energia in eccesso sotto forma di calore) e viene inviato al trasduttore, la componente che converte lo stimolo da elettrico a vibrazionale nel modo più lineare possibile. La bobina interna, racchiusa da una struttura metallica cilindrica, è dotata di un perno di ottone (materiale amagnetico) sul quale è fissato un supporto piano di legno opportunamente verniciato per la permanenza in un ambiente umido e calibrato per accogliere due piastre di coltura da 6 pozzetti. In questo sistema, il campo elettromagnetico generato dalla bobina che potrebbe agire sulle colture è minimizzato dalla lunghezza e composizione del perno e del supporto per le piastre.

I trattamenti con le onde complesse mediante l'utilizzo del generatore di vibrazioni meccaniche.

Considerando che tra i nostri obiettivi c'era quello di mettere a punto sia lo stimolo acustico che gli strumenti per la somministrazione, abbiamo effettuato trattamenti con l'onda complessa utilizzando il generatore di vibrazioni meccaniche. Per questo pool di esperimenti, l'amplificatore dell'apparato è stato collegato ad un computer portatile che è servito come sorgente dello stimolo.

Le hASC al passaggio 3-5 di sottocoltura sono state seminate alla densità di 7000 cell/cm² su piastre da sei pozzetti (NUNC Falcon) in 3.2 ml di α MEM con complementi e mantenute in incubatore a condizioni standard (37°C, 5% CO₂) per 24 ore prima dell'inizio del trattamento. Le colture sono state trattate, quindi, per 24 ore continuative, seguite da un periodo variabile di incubazione 48 ore, 7 e 12 giorni (rispettivamente n=3, n=4, n=1), prima dell'estrazione dell'RNA in assenza dello stimolo, e per 2, 4, 8 e 16 ore senza periodo di latenza (n=1 per ogni tempo sperimentale) (Tab. 1B).

Le cellule di controllo sono state mantenute in incubatore senza stimolo per la stessa durata dei trattamenti.

I trattamenti con le onde complesse con il Cell Exciter.

In prima istanza, abbiamo somministrato alle hASC, seminate secondo il protocollo standard, l'onda complessa normalizzata per 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore continuative (n=2 per ogni tempo sperimentale).

Infine, abbiamo testato la melodia, ovvero l'onda complessa in cui le singole frequenze hanno un proprio t_0 , andando ad estrarre immediatamente l'RNA dopo i medesimi tempi di trattamento utilizzati per gli esperimenti con l'onda complessa sovrapposta (n=1 per ogni tempo sperimentale) (Tab. 1B).

In ogni esperimento, le colture di controllo sono state mantenute in incubatore senza stimolo per gli stessi tempi sperimentali.

2.4.2 - Gli stimoli molecolari: gli estratti embrionali di pesce zebra

Le cellule mesenchimali isolate dal tessuto adiposo con il Lipogems sono state il modello cellulare anche per lo studio degli effetti di estratti di embrioni di pesce zebra sul percorso differenziativo delle hASC.

Gli estratti.

Gli estratti ci sono stati forniti dalla Montefarmaco Srl di Milano come soluzioni di cinque specifici stadi di sviluppo di Zebrafish e denominati fasi (ZF-):

- ZF1, 50% epibolia (inizio della gastrulazione, 5 ore dopo la fecondazione o hpf);
- ZF2, tail bud (distinzione tra i due poli del corpo, 10 hpf);
- ZF3, 5 somiti (fase iniziale della segmentazione, 12 hpf);
- ZF4, 20 somiti (segmentazione avanzata, 19 hpf);
- ZF5, *primordia* (24 hpf);
- ZF6, soluzione ottenuta come mix delle fasi precedenti

Ogni fase è stata ottenuta per turboemulsione degli embrioni in una soluzione glicerolalcolica composta da glicerolo vegetale al 60%, alcool etilico al 5%, acqua e uova al 35% conservata in sorbato di potassio e sodio benzoato.

La quantificazione mediante BCA assay.

Gli estratti di embrioni di Zebrafish ci sono stati forniti senza specificazioni sul quantitativo proteico in essi contenuto. Abbiamo quindi proceduto con la quantificazione mediante il saggio colorimetrico BCA assay (Pierce ThermoScientific). Abbiamo utilizzato 8 soluzioni di BSA a concentrazione nota per generare la curva standard di calibrazione in modo da poter quantificare il solvente glicerolalcolico e tutti gli estratti ZF a 3 diluizioni diverse (puri, 1:2 e 1:4 in acqua deionizzata).

Ogni campione è stato incubato per 30 minuti a 37°C in bagnetto termostato con le soluzioni A e B del kit (al rapporto di 50:1) e l'assorbanza è stata letta in duplicato da 2 µl di ognuno con tecnologia NanoDropN1000 utilizzando l'opzione d'analisi BCA assay.

I dati ottenuti, espressi come milligrammi per millilitro (mg/ml), sono stati elaborati ed utilizzati per calcolare le concentrazioni per la separazione elettroforetica e per i trattamenti.

Elettroforesi su gel di acrilammide.

Le sei soluzioni sono state sottoposte ad elettroforesi verticale. In un gel da 0.75 mm di Acrilammide (Acrilamide/Bis-Acrilamide, soluzione al 30%; SIGMA-Aldrich) al 12% abbiamo caricato 17.5 µg di ogni estratto, preventivamente denaturati per 10 minuti in una soluzione di caricamento (LB, con Glicerolo al 20%, bromofenolo 0.24%, β-mercaptoetanolo 4%, SDS 8%, Tris base pH 6.8 1M diluito in acqua deionizzata), utilizzando come marcatore 5 ul di Precision Plus Protein Dual Xtra standards

(BioRad). L'elettroforesi in apparato BioRad è stata eseguita a 110 - 130V costanti per 90 minuti a temperatura ambiente in buffer di corsa 1X (per 500 ml 5X: 7.5 g Tris Base, 36 g Glicina, 25 ml SDS 10% in acqua deionizzata).

Terminata la separazione, i gel di acrilamide sono stati colorati con Coomassie gel staining (BioRad) seguendo le istruzioni della casa produttrice. Le immagini sono state salvate e analizzate tramite GelDoc e software associato (GelDoc e QuantityOne, BioRad) in modalità epi-white (luce bianca).

I trattamenti con gli estratti di Zebrafish.

Le hASC sono state seminate alla densità di 7000 cellule/ cm² in piastre da 6 pozzetti e trattate dopo 24 ore in incubatore. La scelta delle fasi embrionali da utilizzare, così come le concentrazioni e i tempi di trattamento sono stati scelti sia in funzione dei risultati dei saggi di proliferazione (descritti nei paragrafi successivi) sia in funzione di dati presenti in letteratura.

Abbiamo quindi trattato le hASC con:

- ZF6 alla concentrazione di 0.01 - 0.1 - 1 - 10 µg/ml per 24 ore;
- ZF6 alla concentrazione di 0.01 - 0.1 - 1 - 10 µg/ml per 72 ore;
- ZF6 alla concentrazione di 0.01 - 0.1 - 1 - 10 µg/ml per 7 giorni;
- ZF5 alla concentrazione di 0.01 - 0.1 - 1 - 10 µg/ml per 24 ore;
- ZF5 alla concentrazione di 0.01 - 0.1 - 1 - 10 µg/ml per 72 ore.

Durante tutta la durata dei trattamenti, le colture sono state incubate in condizioni standard. In ogni esperimento è stato previsto un controllo, ovvero hASC trattate con il solo solvente gliceroalcolico alla concentrazione finale dello 0.5% (Tab. 1C).

2.5 - Saggio di vitalità

Sia per le hASC trattate con le onde acustiche che con estratti ZF, sono stati effettuati dopo la fine del trattamento saggi di vitalità con Trypan Blue diluito 1:1 con la sospensione cellulare utilizzando la camera di conta Neubauer.

2.6 - Saggio di proliferazione, MTT

Per i trattamenti con gli estratti proteici, oltre alla vitalità è stata valutata la proliferazione delle hASC con saggi MTT. Abbiamo dapprima ottimizzato la densità cellulare di semina per il saggio scelto, testando 5 densità (da 3 a 7 mila cellule/cm²) in piastre da 48 pozzetti dopo 24 e 72 ore dalla semina.

hASC alla densità di 5000 cellule/cm², quindi, sono state seminate in piastre da 48 pozzetti in 250 µl di aMEM. Dopo 24 ore dalla semina, abbiamo somministrato alle colture le fasi ZF alle concentrazioni di 0.01 - 0.1 - 1 - 10 µg/ml, in duplicato. Come controllo è stato utilizzato un trattamento con solvente allo 0.5%. A 24 e 72 ore dal trattamento, 25 µl di MTT (bromuro di 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio) sono stati aggiunti in ogni pozzetto direttamente nel mezzo di coltura. Il metabolismo del sale di tetrazolio è stato bloccato dopo 3 ore di incubazione con una soluzione di lisi (Isopropanolo 90%, TritonX-100 10% e HCl 0.008%) in modo da mettere in soluzione i sali di formazano. Dopo incubazione overnight (O/N) è stata letta l'assorbanza a 595 nm (Opsys MR Microplate Reader; Dynex Technologies) di ogni pozzetto e i risultati sono stati opportunamente analizzati statisticamente in GraphPad eseguendo il test ANOVA oneway con la correzione del test di Tuckey.

2.7 Analisi dell'espressione genica

Gli effetti dei nostri trattamenti, sia con le onde acustiche che con gli estratti di pesce zebra sono stati saggiati in termini di espressione genica, in RT-PCR quantitativa relativa e/o real time qPCR. Ai tempi prestabiliti dei vari trattamenti, le hASC sono state staccate dal supporto di coltura mediante tripsinizzazione e sottoposte a saggio di vitalità. L'RNA totale estratto è stato quantificato e retrotrascritto e parallelamente la qualità saggiata in gel di agarosio. I cDNA relativi ad ogni campione sono stati amplificati in modo da valutare l'espressione di geni di staminalità e geni specifici dei principali destini differenziativi, normalizzandola con l'espressione dei geni di riferimento.

2.7.1 - Estrazione dell'RNA

A fine trattamento, le hASC vengono distaccate dalle piastre di coltura. Dopo eliminazione del terreno e lavaggio in PBS, le piastre vengono incubate a 37°C per 3 minuti con una soluzione di Tripsina-EDTA 1X. Dopo l'inattivazione dell'enzima con pari volume di terreno con FBS al 10%, le hASC vengono fatte sedimentare a 2000 rpm per 5 minuti in tubi da 15 ml (Falcon) e risospese in 500 µl di PBS. Da questo volume viene prelevata un'aliquota per il saggio di vitalità e si procede con un'altra centrifugazione alle stesse condizioni.

Utilizzando il protocollo e il materiale in dotazione nel kit RNeasy minikit (QIAGEN), dal pellet di hASC, dopo lisi cellulare, stabilizzazione e lavaggi in tubi con membrana apposita, viene eluito l'RNA totale in 35 µl di acqua priva di RNasi.

L'RNA viene quindi quantificato con l'opzione "Acidi Nucleici RNA-40" di NanoDropN1000. Il software di quantificazione, in funzione dei valori di assorbanza dei campioni, fornisce la concentrazione, espressa come nanogrammi (ng) e la purezza dell'acido nucleico da proteine (rapporto delle assorbanze 260/280 nm, che per l'RNA deve essere circa 2.0) e da reagenti che assorbono a 230 nm (rapporto 260/230 nm, che per l'RNA deve essere circa 2-2.2).

L'acido nucleico estratto viene sottoposto ad un ulteriore controllo qualitativo. Un volume pari a circa 180-200 ng di RNA viene fatto correre su gel di agarosio (Lonza) all'1% in TAE buffer (soluzione stock 50X; Merck) 1X a 90V costanti per 90 minuti in apparato OWL B3 (Thermo Scientific), utilizzando come marcatore di massa il RiboRuler (Thermo Scientific). Dopo separazione, il gel viene colorato in una soluzione di Bromuro di Etidio (EtBr; SIGMA-Aldrich) 0.5 µg/ml in TAE 1X a temperatura ambiente a 40 rpm per 32 minuti. L'immagine del gel viene analizzata e salvata con il GelDoc e relativo software in modalità trans-UV. Questo tipo di analisi consente di escludere visivamente la presenza di DNA genomico e valutare la qualità e integrità dell'RNA estratto come proporzione tra le bande 28S e 18S dei ribosomi che devono presentarsi definite e con rapporto di intensità relativa tra 1 e 2 [Bustin et al., 2010].

L'RNA così estratto sarà conservato a -20°C o direttamente retrotrascritto.

2.7.2 - RT-PCR

Abbiamo retrotrascritto gli RNA totali isolati da hASC trattate e controllo utilizzando M-MLV retrotrascrittasi (Promega) con le seguenti condizioni di reazione:

1U di enzima per 1µg di acido nucleico, Random Hexamers 2 µM, Oligo-dT 2.5 µM (SIGMA-Aldrich), una soluzione di dNTP 10 µM (TaKaRa), buffer M-MLV 5X in 25 µl di volume finale. L'RNA è stato incubato per 5 minuti a 70°C con i primers e successivamente la reazione è stata completata con l'enzima, buffer e dNTP per 60 minuti a 37°C e terminata con 10 minuti a 70°C.

Il successo della retrotrascrizione è stato verificato in PCR (GenePro, Bioer). Le condizioni standard di PCR sono state: 1 µl di cDNA, primer 0.2 µM, 12,5 µl di BioMix Red (Bioline) in 25 µl di volume finale; iniziale denaturazione a 94°C per 2 minuti; 25 cicli di 30 secondi a 94°C, 30 secondi alla temperatura di annealing (Ta) dei primers, 30 secondi a 72°C; 7 minuti finali a 72°C.

I cDNA ottenuti in RT sono stati conservati a +4°C fino al loro utilizzo.

2.7.3 - Progettazione dei primers e clonaggio in RT-PCR

Obiettivo della nostra ricerca è stato valutare se i nostri trattamenti si traducevano in variazioni di espressione genica nelle hASC. Abbiamo quindi scelto di studiare geni che fossero rappresentativi dello stadio staminale e dei principali destini differenziativi. Nello specifico, abbiamo scelto i seguenti geni.

Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (*GAPDH*) come gene di riferimento.

Come indicatori dello stato indifferenziato pluripotente, abbiamo selezionato i seguenti fattori di trascrizione implicati nel mantenimento della pluripotenza e dell'auto-rinnovamento: l'Octamer-binding transcription factor 4 (*OCT3/4*) o *POU5F1*, il Sex determining region Y-box 2 (*SOX2*), *NANOG* e il Kruppel-like factor 4 (*KLF4*). Inoltre, per alcuni saggi, abbiamo scelto di studiare il proto-oncogene *c-Myc* (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog).

Per la specificazione cardiaca, abbiamo selezionato: i marcatori di commissionamento cardiaco NK2 homeobox 5 (*NKX2.5*) e GATA binding protein 4 (*GATA4*), fattori di trascrizione la cui espressione determina la formazione del cuore embrionale e il Myocyte enhancer factor 2C (*MEF2C*), implicato nel differenziamento dei progenitori cardiaci.

Come marcatori di differenziamento vascolare, abbiamo scelto di studiare l'espressione del vascular endothelial growth factor (*VEGF*), del kinase insert domain receptor (*KDR*), che codifica per un recettore di VEGF, e del hepatocyte growth factor (*HGF*) implicato nell'angiogenesi.

Inoltre, abbiamo deciso di indagare anche l'espressione di *MyoD* per il differenziamento miogenico e di neurogenina (*NEUROG1*) per il differenziamento nervoso.

Per ogni gene in esame abbiamo progettato coppie di primers adeguate per RT-PCR, qPCR o entrambe ad esclusione di quelli per *GATA4*, *MEF2C* e *SOX2* specifici per saggi real time, per i quali abbiamo utilizzato sequenze oligonucleotidiche commerciali (Tab. 3).

Analisi bioinformatica.

Dal database Gene dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) abbiamo ottenuto le sequenze nucleotidiche degli mRNA in studio in modo da poter individuare la o le regioni adeguate per la progettazione dei primers. Per alcuni geni, tra cui *OCT3/4* e *NKX2.5*, è stato necessario fare ulteriori analisi per scegliere la sequenza da studiare a causa della presenza di una o più varianti trascrizionali. Per i suddetti geni, utilizzando il tool dell'NCBI BLAST con l'opzione "nucleotide blast" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e i parametri di default, abbiamo fatto un'analisi comparativa dei trascritti alternativi in modo da identificare quale fosse la regione in comune tra questi e, quindi, dove progettare le sequenze oligonucleotidiche in modo da amplificare tutte le varianti. Sulle sequenze dei trascritti abbiamo individuato una o più coppie di oligonucleotidi candidati, a cavallo tra due esoni dove possibile e di lunghezza compresa tra le 18 e 25 basi. I test di specificità preliminari sulle coppie sono stati effettuati col software Amplify3 (University of Wisconsin-Madison) che ci ha consentito di verificare se le sequenze producevano dimeri per auto-appaiamento e se fossero specifiche per un'unica sequenza. Le coppie sono state analizzate in secondo luogo con PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>); questo programma consente di effettuare PCR *in silico* che forniscono come risultato il grado di specificità della coppia testata sulla sequenza bersaglio dell'mRNA corrispondente.

Clonaggio in RT-PCR.

Gli oligonucleotidi specifici per i geni d'interesse e con probabilità di formare dimeri nulla o molto bassa sono stati ottenuti da SIGMA-Aldrich come liofilizzato e sono stati testati utilizzando cDNA di hASC o ottenuti da RNA commerciale tessuto specifico (Clontech). In PCR abbiamo utilizzato 2,5 µl di cDNA in 25 µl di volume utilizzando le condizioni standard di reazione eccetto per la Ta, scelta in funzione della

temperatura di melting dei primers. Parallelamente abbiamo eseguito un'analisi della cinetica di reazione in modo da individuare il numero di cicli di amplificazione da utilizzare in PCR quantitativa relativa per ogni cDNA in studio, in modo da essere lontani dal plateau di reazione. Gli ampliconi sono stati analizzati in gel di agarosio all'1.5% in buffer TAE con EtBr alla concentrazione di 0.5 µg/ml utilizzando come marcatore di lunghezza il GeneRuler DNA Ladder mix (1 µl; Thermo Scientific).

Sequenziamento.

Per avere conferma sulla specificità dei primers, dopo aver verificato che gli ampliconi avessero lunghezza attesa, abbiamo proceduto con il protocollo per il sequenziamento. Gli ampliconi d'interesse sono stati purificati con il kit GenElute (SIGMA-Aldrich) seguendo il protocollo della casa produttrice. I purificati sono stati separati in gel di agarosio all'1.5% in buffer TAE con EtBr 0.5 µg/ml, utilizzando come marcatore di lunghezza il GeneRuler e di massa MassRuler High Range forward (Thermo Scientific) in modo da poterne stimare il quantitativo in nanogrammi.

La sequenza di ogni purificato è stata determinata usando il kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing-Ready Reaction e l'analizzatore di sequenza ABI-PRISM 3730 (Applied Biosystems). Infine, l'identità di sequenza è stata ottenuta in BLASTn con i parametri di base.

I primers specifici utilizzati in RT-PCR e/o PCR real time sono elencati in Tabella 3.

2.6.4 - PCR quantitativa relativa

L'analisi degli effetti dei trattamenti è stata effettuata preliminarmente mediante PCR quantitativa relativa. Per questa analisi abbiamo deciso di studiare l'espressione in duplicato tecnico di *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4*, *MEF2C*, *NKX2.5*, *NEUROG1*, *MyoD*, *VEGF*, *KDR* e *HGF* utilizzando come gene di riferimento *GAPDH*.

Le PCR per i geni di interesse.

Sono state eseguite PCR per ogni coppia di primers in duplicato tecnico seguendo il protocollo standard ad esclusione della Ta, di 61°C per *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4*, *MEF2C*, *NKX2.5*, *NEUROG1*, *MyoD* e 58°C per *VEGF*, *KDR* e *HGF*, usando 2,5 µl di cDNA stampo derivato sia da cellule controllo che trattate e per un numero di cicli determinato con lo studio della cinetica (Tab. 3).

L'elettroforesi su gel d'agarosio.

Gli ampliconi sono stati fatti correre su gel di agarosio al 1.5% (per *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4*, *MEF2C*, *NKX2.5*, *NEUROG1*, *MyoD*) o 2% (per *VEGF*, *KDR* e *HGF*) in TAE 1X a 90-110 V per 90 minuti in apparato OWL B3 . Come marcatori sono stati utilizzati 1 μ l di GeneRuler, 5 μ l di MassRuler High Range Forward e 5 μ l di MassRuler High Range Reverse. I gel sono stati colorati a fine corsa in una soluzione di EtBr 0.5 μ g/ml in TAE 1X, in agitazione a 40 rpm per 32 minuti.

La quantificazione degli ampliconi.

L'analisi degli ampliconi è stata eseguita con l'ausilio del GelDoc e software associato (BioRad). Le immagini dei gel sono state acquisite in modalità trans-UV e regolando opportunamente il diaframma in modo da non avere pixel saturati. Abbiamo proceduto quindi con la quantificazione: è stata generata una retta di calibrazione utilizzando 6 punti dei marcatori di massa in modo da avere un $R^2 > 0.98$ e le bande di interesse sono state selezionate utilizzando un'area di selezione costante. In funzione della retta di calibrazione, per regressione lineare il software converte la densità di pixel in ng.

L'espressione di ogni gene espressa è stata normalizzata utilizzando *GAPDH* come gene di riferimento e la variazione dell'espressione di ogni gene è stata valutata come rapporto tra trattato e controllo.

2.7.5 - Real Time qPCR

Gli effetti delle onde acustiche somministrate sia con il generatore di vibrazioni meccaniche che con il CellExciter sono stati saggiati anche in real time qPCR, utilizzando il kit goTaq qPCR master mix (Promega) e l'apparato Lightcycler System 1.5 (Roche Diagnostic).

Per ogni coppia di primers utilizzata (Tab. 3) è stata preventivamente valutata l'efficienza e la curva di melting su campioni di controllo, utilizzando diluizioni scalari sia dei primers stessi che di cDNA. Ogni gene è stato analizzato in duplicato utilizzando 2 μ l di cDNA e primers alla concentrazione di 0.25 μ M. Per le nostre esigenze sperimentali, abbiamo utilizzato il seguente programma di reazione: 2 minuti a 95°C, 45 cicli di 3 secondi a 95°C, 15 secondi alla Ta, 15 secondi a 72°C, con dissociazione finale a 95°C.

A fine corsa, i dati ottenuti sono stati normalizzati con *GAPDH* e l'espressione relativa è stata calcolata con il metodo del "delta-delta-Ct" ($\Delta\Delta Ct$) utilizzando i valori medi dei cicli soglia (Ct) dei geni in esame, come indicato nelle linee guida MIQE [Bustin et al., 2010]. Per la rappresentazione dei risultati, i valori di $\Delta\Delta Ct$ minori di 1 (i.e. sottoespressione) sono stati convertiti come numeri negativi.

2.8 - Analisi dell'espressione proteica

Allo studio dell'espressione genica, abbiamo affiancato l'analisi d'espressione proteica mediante western blot. Abbiamo scelto come proteine due marcatori della pluripotenza, NANOG e SOX2, e uno del commitment cardiaco, NKX2.5, e abbiamo iniziato l'ottimizzazione del protocollo di blotting per questi fattori di trascrizione utilizzando le proteine totali da hASC non trattate.

2.8.1 - Estrazione delle proteine

Culture a confluenza di hASC in T75 sono state utilizzate per l'estrazione delle proteine totali modificando il protocollo di RIPA buffer (Pierce).

Le cellule sono state distaccate dalla fiasca con il protocollo standard con Tripsina (cfr. paragrafo "Allestimento e mantenimento delle colture di hASC") e fatte sedimentare a 2000 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato lavato in PBS freddo per due volte e fatto sedimentare a 1000 g per 5 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C (Centrifuga 5414R; Eppendorf). Il supernatante è stato rimosso con cura e sono stati aggiunti 50 μ l di buffer di lisi RIPA (SIGMA-Aldrich), addizionando al momento l'inibitore delle proteasi (PMSF, 1mM; Pierce) e DTT 1mM (Pierce) come agente riducente. Il lisato è stato sottoposto a tre cicli di congelamento a -80°C e scongelamento. L'estrazione è stata completata centrifugando il campione a 14000 g per 5 minuti a 4°C. Il supernatante è stato conservato a -80°C fino all'utilizzo.

Le proteine totali estratte sono state quantificate mediante BCA assay e lettura al NanoDropN100 e successivamente denaturate per 10 minuti a 100°C con il buffer di caricamento (LB).

2.8.2 - Western Blot

Nel nostro approccio allo studio dell'espressione proteica, abbiamo cercato di ottimizzare tutto il protocollo di western blot per le proteine d'interesse, dall'elettroforesi alla visualizzazione dei risultati.

In un gel di acrilammide al 12% dello spessore di 0.75 mm abbiamo caricato, oltre a 5 µl di Precision Plus Protein Dual Xtra standards, quantità variabili di proteine totali estratte da hASC in funzione della proteina da saggiare: 40 µg per GAPDH (Rabbit anti-GAPDH, Cell Signaling), 40 e 60 µg per NANOG (Rabbit anti-NANOG, OriGene) e per SOX2 (Rabbit anti-SOX2, OriGene). Per quanto riguarda NKX2.5, (polyclonal anti-NKX2.5, Cell Signaling) sono stati caricati 40 µg di proteine estratte dal ventricolo destro di ratto.

La corsa elettroforetica, in apparato BioRad, è stata fatta a 110-130V costanti per 90 minuti a temperatura ambiente in buffer di corsa 1X (per 500 ml 5X: 7.5 g Tris Base, 36 g Glicina, 25 ml SDS 10%).

Il gel, la membrana di nitrocellulosa, la carta da filtro 3M (SIGMA-Aldrich) e le spugne sono state equilibrate per 10 minuti nel buffer di blotting freddo 1X (per 500ml 5X: 7.5 g Tris Base, 36 g Glicina, 25 ml SDS 10% in acqua deionizzata. Soluzione 1X in uso con 20% di metanolo), addizionato ulteriormente con lo 0.05% di SDS. Il blotting, in apparato Hoefer è stato fatto in ghiaccio a 30V per 90 minuti. L'efficienza del trasferimento è stata valutata sia mediante colorazione Ponceau (SIGMA-Aldrich) della membrana, sia colorando il gel con Coomassie gel staining (BioRad), seguendo le indicazioni della casa produttrice.

La membrana è stata saturata in agitazione per 1 ora in una soluzione di TBS-Tween al 5% di latte (Tween20, allo 0.05%; SIGMA-Aldrich. No fat dry milk; BioRad) a temperatura ambiente.

Le incubazioni con gli anticorpi primari sono state fatte in agitazione a +4°C per tutta la notte. L'incubazione con l'anticorpo secondario (AbII) è stata fatta con Goat Anti-rabbit IgG coniugato alla perossidasi (Pierce) diluito 1:5000 in TBS-T con 5% di latte, a temperatura ambiente e sempre in agitazione per un'ora; in entrambi i casi sono state testate diverse diluizioni e solventi. Le condizioni migliori sono state: per l'anti-GAPDH, la diluizione 1:3000 in sieroalbumina (BSA) al 5% in TBS; per l'anti-NANOG, la diluizione 1:1000 in 5% BSA; per l'anti-NKX2.5, la diluizione 1:1000 in 5% BSA. Per quanto riguarda SOX2, invece, sono state testate diverse diluizioni dell'anticorpo primario, da 1:1000 a 1:5000 sia in TBS-T con il latte e senza.

Per visualizzare le bande dopo le incubazioni, abbiamo utilizzato due kit diversi, l'ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare) e il SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce), seguendo le istruzioni delle case produttrici, con lastre fotografiche e soluzioni di sviluppo e fissativa KODAK. Di volta in volta si è reso necessario testare diversi tempi di esposizione, variabili dai 10 secondi alle 24 ore.

2.9 - Analisi statistica

Per tutti gli esperimenti condotti è stato eseguito il test-t di Student considerando significativi i risultati con $p < 0.05$ e in ExCell sono stati generati i grafici con relative deviazioni standard, dove possibile calcolarle.

Per i saggi MTT, in GraphPad, è stata eseguita l'ANOVA One-way con test di Tuckey considerando significativi i risultati con $p < 0.05$.

RISULTATI

3.1 - Progettazione dei primers, clonaggio in RT-PCR e sequenziamento

Per le nostre indagini sperimentali abbiamo selezionato alcuni geni marcatori di pluripotenza e dei principali destini differenziativi (cardiaco, vascolare, nervoso e muscolare).

Abbiamo fatto uno studio di sequenza di tutti gli mRNA dei geni scelti in modo da identificare le potenziali regioni su cui progettare i primers e mediante strumenti bioinformatici abbiamo valutato la specificità di questi.

Ogni coppia di primer da noi progettata per RT-PCR è stata testata utilizzando cDNA da hASC, tranne che per *NEUROG1* e *MyoD* in cui si è reso necessario l'utilizzo di cDNA da cuore, cervello e muscolo scheletrico (da RNA commerciali umani). L'amplificazione è stata fatta seguendo il protocollo standard, utilizzando le Ta primers specifiche (Tab. 3) e un numero di cicli crescente in modo da valutarne la cinetica.

Per i primer utilizzati in RT-PCR, il numero di cicli ottimale e sufficientemente lontano dalla fase di plateau è stato: *GAPDH* 20 cicli (cy), *VEGF* 25 cy, *OCT3/4* e *MEF2C* 30 cy, *KLF4*, *SOX2*, *NANOG*, *NKX2.5*, *KDR* e *HGF* 35 cy, *NEUROG1* e *MyoD* 40cy (a titolo di esempio, l'analisi della cinetica di *NKX2.5* è mostrata in Figura 6).

Per testare i primer specifici per qPCR, è stato seguito il protocollo standard di real time (come descritto nella specifica sezione in "Materiali e Metodi") utilizzando le Ta primers specifiche (Tab. 3) e 45 cicli. Sono stati usati cDNA da hASC tranne che per *GATA4*, *NEUROG1* e *MyoD* per i quali è stato usato cDNA tessuto specifico ottenuto. Gli ampliconi ottenuti sia in RT- che q-PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio per l'analisi di lunghezza della banda e, nel caso dei primers da RT-PCR, per identificare il numero di cicli ottimale.

Gli ampliconi di lunghezza attesa sono stati quindi sequenziati e la successiva analisi bioinformatica della sequenza ha dimostrato che corrispondevano alla sequenza di mRNA attesa.

3.2 - Caratterizzazione delle cellule mesenchimali isolate dal tessuto adiposo con Lipogems

La tecnologia innovativa utilizzata per isolare le hASC (in Fig. 7 una foto rappresentativa della morfologia di tali cellule in coltura) da tessuto adiposo ha reso necessario verificare se la frazione cellulare stromale possedesse i requisiti delle cellule mesenchimali, ovvero l'espressione di CD105, CD73 e CD90 e le capacità di differenziarsi in osteociti, condrociti ed adipociti. Inoltre, *in itinere*, ci è stato possibile delineare il profilo di espressione genica delle hASC in condizioni basali, analizzando l'espressione delle cellule utilizzate come controllo nei trattamenti con le onde.

3.2.1 L'immunofenotipo delle hASC

Abbiamo saggiato mediante FACS l'espressione da parte delle hASC dei marcatori di membrana che, da letteratura, sono generalmente espressi dalle MSC. La frazione cellulare isolata con il Lipogems presenta il fenotipo CD105/73/90⁺ e risulta essere negativa per CD34 (uno dei marcatori dei precursori emopoietici) e CD45 (antigene dei linfociti) [Bianchi et al., 2013].

3.2.2 Il potere differenziativo delle hASC

Uno dei requisiti per definire mesenchimale una popolazione cellulare è la capacità di differenziarsi di queste come in condrociti, osteociti ed adipociti.

Abbiamo quindi utilizzato kit commerciali e relativi protocolli sperimentali per osteogenesi, condrogenesi ed adipogenesi su colture di hASC.

Il differenziamento adipogenetico.

Il trattamento con Red-O oil delle colture dopo 2-3 settimane di induzione adipogenica ha mostrato la presenza di cellule vacuolate, tipica caratteristica morfologica degli adipociti. La dimensione dei vacuoli così come delle cellule è risultata essere correlata linearmente con il tempo di induzione [Bianchi et al., 2013].

Il differenziamento osteogenetico.

Le colture incubate con il terreno di induzione osteogenica per 3 settimane presentavano i caratteristici depositi di Calcio, evidenziati dopo trattamento con l'Alizarin Red staining. Tuttavia, le modificazioni morfologiche tipiche del differenziamento osteogenico, come l'appiattimento del corpo cellulare in concomitanza con la perdita dei processi fibroblastoidi, appariva entro la settimana dall'inizio dell'induzione [Bianchi et al., 2013].

Il differenziamento condrogenetico.

L'analisi dei pellet cellulari indotti al differenziamento condrogenico ha mostrato la presenza di abbondante matrice cellulare dopo 3 settimane ed è stata confermata la presenza di Collagene di tipo II [Bianchi et al., 2013].

3.2.3 - Il profilo d'espressione genica delle hASC in condizioni basali

Le nostre indagini sull'espressione genica di hASC sottoposte a stimoli fisici potenzialmente differenziativi ci ha consentito indirettamente di delineare il profilo d'espressione e la stabilità di questo nelle hASC in condizioni basali.

Abbiamo confrontato l'espressione dei marcatori di staminalità (i.e. *SOX2*, *NANOG* e *KLF4*), del differenziamento cardio-vascolare (i.e. *NKX2.5*, *GATA4*, *MEF2C*) e neuronale (i.e. *NEUROG1*) relativa alle colture utilizzate come controllo dei vari trattamenti.

Questo approccio ci ha permesso di ottenere ulteriori informazioni importanti sulle hASC isolate da tessuto adiposo con Lipogems.

Le hASC esprimono tutti i geni in studio, anche se a livelli che possono essere considerati basali. Inoltre, l'espressione di questi, relativizzata con quella del gene di riferimento, è stata confrontata a diversi tempi dopo la semina, corrispondenti ai tempi di trattamento utilizzati per gli esperimenti. I dati relativi all'espressione normalizzata di ogni marcatore d'espressione ai vari tempi sperimentali sono stati mediati, ne è stata calcolata la deviazione standard (DS) e la relativa deviazione percentuale dalla media.

Per i due approcci sperimentali, con e senza tempo di incubazione alla fine del trattamento, abbiamo ottenuto dati contrastanti.

L'espressione genica delle cellule controllo utilizzate negli esperimenti che prevedevano 48 ore (n=3) e 7 giorni (n=4) di latenza ed analizzati in RT-PCR dopo la

fine dello stimolo è risultata molto variabile sia tra le due classi di esperimenti che all'interno della medesima classe (dati non mostrati).

Risultati diversi per i controlli del set di esperimenti che prevedevano l'analisi in qPCR dell'espressione subito dopo la fine del trattamento (n=4 per i tempi sperimentali di 2, 4, 8 e 16 ore e n=3 per 24, 48 e 72 ore). Qui, l'espressione dei vari marcatori in studio è stata analizzata sia all'interno dello stesso classe di trattamento, confrontando 4 o 3 esperimenti indipendenti per valutare la ripetibilità del risultato (Fig. 8A), sia globalmente, ovvero confrontando l'espressione dei vari geni in tutti i tempi sperimentali (Fig. 8B), per stabilire se tale espressione fosse stabile. Il confronto dei replicati relativi all'espressione di ogni gene per ogni tempo sperimentale mostra che le hASC in condizioni basali presentano valori di espressione, espressi come differenza media tra il Ct del gene d'interesse e il Ct del gene di riferimento, ripetibili, presentando deviazioni percentuali rispetto a tale media comprese tra il 2 e 30%, con moda pari al 7% (Fig. 8A).

E' stata inoltre condotta l'analisi di espressione a livello globale, mediando i ΔCt di ogni gene relativi a tutti i nostri tempi sperimentali e calcolando le relative DS. Anche in questo caso, l'espressione di ogni gene risulta stabile: infatti, la media di tutti i ΔCt dei vari tempi sperimentali (n=7) di ogni gene presenta deviazioni percentuali minori del 10% (valore modale 4%) (Fig. 8B).

3.3 - Trattamenti con stimoli fisici

Abbiamo condotto due tipologie di esperimenti sul nostro modello cellulare.

Colture di hASC sono state trattate con onde semplici a morfologia quadratica e sinusoidale alle frequenza di 0.55 Hz. Per la somministrazione abbiamo utilizzato un amplificatore e un altoparlante costruiti per le nostre esigenze sperimentali e collegati ad un generatore di onde meccaniche. Sono stati effettuati trattamenti di 24 ore continuative seguite da 24 e 48 ore di latenza prima dell'estrazione dell'RNA. Durante questi esperimenti si è reso necessario isolare il sistema per bloccare il campo elettromagnetico prodotto dalle componenti elettriche. Inoltre, tale sistema è stato posto su un piano di marmo per evitare la propagazione dello stimolo ondulatorio all'interno dell'incubatore.

Lo stesso modello cellulare è stato trattato anche con un'onda acustica complessa normalizzata utilizzando il generatore di onde meccaniche, collegato ad un computer portatile, e il Cell Exciter.

L'onda complessa è stata somministrata con il generatore di vibrazioni meccaniche per 24 ore seguite da 2, 7 e 12 giorni di latenza prima dell'estrazione dell'RNA e per 2,4,8 e 16 ore senza incubazione dopo la fine dello stimolo.

La somministrazione con il Cell Exciter ha invece seguito un differente protocollo sperimentale: sono stati effettuati trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore e l'estrazione dell'RNA è stata effettuata subito dopo la fine dello stimolo.

Oltre ai trattamenti con il suono normalizzato, abbiamo eseguito un altro set di esperimenti che prevedevano l'utilizzo dello stesso pool di frequenze ma non sovrapposte.

Per tutti i trattamenti effettuati sono stati saggiati gli effetti in termini di variazione dell'espressione genica tra cellule controllo e trattate mentre, solo per i trattamenti con l'onda complessa sono stati valutati anche il numero di cellule e la vitalità.

3.3.1 Effetti delle onde semplici sull'espressione genica delle hASC

La fase preliminare della nostra ricerca ha previsto l'applicazione di onde quadratiche e sinusoidali sul modello cellulare in uso.

Il nostro protocollo sperimentale ha previsto una somministrazione di 24 ore e l'analisi degli effetti sia immediata che dopo 24 e 48 ore di incubazione senza stimolo. In RT-PCR, abbiamo saggiato l'espressione di *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, come marcatori di staminalità, *NKX2.5* come marcatore del commitment cardiaco, *VEGF*, *HGF*, *KDR* per il differenziamento vascolare e *NEUROG1* e *MyoD* per lo sviluppo nervoso e muscolo scheletrico rispettivamente.

I primi esperimenti, sia con onde quadratiche che sinusoidali, sono stati condotti ponendo direttamente le piastre di coltura sul trasduttore del generatore di onde meccaniche (dati non mostrati). Successivamente, grazie alla collaborazione con ingegneri e fisici, abbiamo modificato il sistema di somministrazione: il sistema amplificatore-altoparlante è stato inserito in un box in modo da schermare i campi elettromagnetici generati dalle componenti elettriche dell'apparato. Inoltre, all'interno dell'incubatore è stato posto un piano di marmo, su cui veniva poggiato il box, per evitare la propagazione delle onde.

Di seguito, verranno illustrati i risultati ottenuti in PCR quantitativa relativa relativi alla somministrazione di onde quadriche con l'apparato schermato e posizionato sul piano di pietra; considerando l'isolamento del nostro sistema sia dalle forze elettromagnetiche che da vibrazioni aspecifiche, le colture di controllo sono state poste all'interno dello stesso incubatore dei trattamenti. In questa fase preliminare abbiamo effettuato solo un set di esperimenti.

Ai tre tempi sperimentali, l'analisi quantitativa relativa mostra che le hASC trattate per 24 ore con le onde quadriche a 0.55 Hz subiscono fluttuazioni nell'espressione dei geni in studio.

L'analisi degli effetti del trattamento senza tempo di latenza (n=1) mostra un trend globale di sovraespressione dei marcatori del differenziamento vascolare e cardiaco mentre l'espressione dei marcatori della staminalità è tendenzialmente stabile, ad eccezione di *KLF4*, molto sovraespresso (Fig. 9A).

Gli effetti dei trattamenti analizzati dopo tempi variabili di latenza risultano essere differenti tra di loro. Dopo 24 ore dalla fine dello stimolo (n=1), si può osservare la sovraespressione dei geni della pluripotenza mentre i marcatori del differenziamento, upregolati subito dopo le 24 ore di somministrazione, risultano diminuire la loro espressione, sebbene siano ancora tendenzialmente sovraespressi (Fig. 9B). Alle 48 ore (n=1), invece, l'analisi da noi condotta ha portato risultati solo per l'espressione di *NANOG*, sottoespresso rispetto al controllo, e dei marcatori vasculogenici sovraespressi rispetto al controllo (dati non mostrati).

In nessuno degli esperimenti è stato possibile valutare l'espressione di *NEUROG1* e *MyoD* in PCR quantitativa relativa.

Questi dati, inclusi quelli relativi alle 48 ore di latenza (dati non mostrati) ci hanno fornito il primo suggerimento in termini di approccio sperimentale; nonostante le hASC rispondano alla stimolazione di natura vibrazionale, questa risposta, relativa ad onde singole, tende a non fissarsi nel tempo (Fig. 9C).

3.3.2 - Effetti delle onde complesse sul numero di cellule e vitalità delle hASC

Gli effetti dei trattamenti con le onde acustiche complesse sono stati valutati in termini di differenze tra conta cellulare e vitalità nei controlli e trattati.

Tali differenze sono state valutate sia a livello di specifico trattamento che a livello globale, per valutare se i trattamenti di tipo vibrazionale con intensità inferiore a 1 g (i.e. $9,8 \text{ m/s}^2$) si ripercuotessero sulla vitalità cellulare.

La conta cellulare, che ci ha permesso sia di valutare il numero totale di cellule sia di discriminare le cellule morte, è stata effettuata con Trypan Blue e camera di conta Neubauer.

La somministrazione di stimoli ondulatori su hASC, senza considerare la durata del trattamento, non è risultata avere effetti significativi né sul numero di cellule né sulla vitalità (n=21; Fig. 10A e B). A livello di singolo trattamento, sebbene abbiamo potuto riscontrare variabilità, il test di correlazione effettuato (i.e. t-test) tra numero di cellule e viability in controlli e trattati è risultato in tutti i casi non significativo, con p-value molto maggiore di 0.05.

3.3.3 - Effetti delle onde complesse sull'espressione genica delle hASC

Suoni derivati da battiti cardiaci sono stati processati, come descritto nella corrispondente sezione del capitolo "Materiali e Metodi", in modo da ottenere un'onda complessa da utilizzare come potenziale stimolo differenziativo su colture di hASC isolate con il Lipogems. Quest'onda complessa, composta da 8 frequenze diverse, è stata utilizzata come suono overlaid o normalizzato, in cui le componenti ondulatorie avevano lo stesso tempo di inizio t_0 . Successivamente, le stesse 8 frequenze sono state utilizzate come melodia, ovvero ognuna con il proprio e fisiologico t_0 .

Il piano sperimentale relativo alla somministrazione dell'onda complessa normalizzata è stato definito *in itinere* ed ha previsto l'utilizzo del generatore di vibrazioni meccaniche con e senza sistema di schermatura e l'utilizzo del Cell Exciter. Nell'ultima fase sperimentale con il Cell Exciter, il suono overlaid è stato sostituito con la melodia.

Di seguito verranno descritti i risultati relativi a parte degli esperimenti da noi effettuati durante il mio percorso di dottorato, riassunti in Tabella 1.

Effetti dell'onda complessa normalizzata somministrata con il generatore di vibrazioni meccaniche.

In RT-PCR quantitativa relativa abbiamo saggiato l'espressione dei seguenti marcatori sia in cellule controllo che dopo trattamento: *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*,

NANOG per la staminalità, *NKX2.5* e *MEF2C* per il commitment cardiaco, *VEGF*, *HGF* e *KDR* per lo sviluppo vascolare e *NEUROG1* e *MyoD* per lo sviluppo nervoso e muscolo scheletrico rispettivamente. In nessuno degli esperimenti effettuati è stato possibile valutare l'espressione di *NEUROG1* e *MyoD* in PCR quantitativa relativa.

La prima tipologia di trattamenti effettuati ha previsto la somministrazione per 24 ore del suono overlaid ed è stata eseguita utilizzando il generatore di vibrazioni meccaniche, senza sistema di schermatura, e con periodo di incubazione pre analisi di 24 (n=1) e 48 ore (n=1). Lo studio dell'espressione genica ha mostrato una tendenza alla sovraespressione di tutti i geni in esame dopo 24 ore di latenza. Analogamente agli esperimenti con le onde semplici, dopo 48 ore di incubazione senza stimolo vibrazionale, il profilo d'espressione delle cellule trattate risultava pressoché stabile rispetto ai controlli (dati non mostrati).

Simile approccio sperimentale è stato intrapreso utilizzando l'apparato di somministrazione schermato da vibrazioni aspecifiche e dai campi elettromagnetici. Questo gruppo di esperimenti prevedevano 24 ore di stimolo, associate a 48 ore, 7 o 12 giorni di latenza.

Dopo 48 ore dalla fine dello stimolo (n=3), si può osservare una generale tendenza alla sovraespressione di *OCT3/4* e *SOX2* e di *NKX2.5* e *VEGF*, espressi oltre 1.5 volte i controlli. Gli altri geni in studio, invece, risultano essere tendenzialmente espressi stabilmente rispetto ai controlli (Fig. 11A). Tuttavia, i dati ottenuti in RT-PCR quantitativa relativa, associati ad un'alta variabilità, non sono risultati essere statisticamente significativi (t-test con $p > 0.05$).

L'analisi dell'espressione genica effettuata dopo 7 giorni di latenza dalla fine delle 24 ore di stimolo mostra, ancora, un'alta variabilità nell'espressione dei vari geni (Fig. 11B). Nonostante ciò, *KLF4*, *NANOG* e *VEGF* sono significativamente sovraespressi (n=4) sia in PCR quantitativa relativa che qPCR real time (Fig. 11C). L'introduzione della qPCR come tecnica di analisi, inoltre, ci ha permesso di ottenere informazioni anche sull'espressione di *NEUROG1*, significativamente sottoespresso rispetto ai controlli (Fig. 11C).

In ultima analisi, abbiamo studiato gli effetti dell'onda complessa normalizzata, prolungando il tempo di incubazione dopo la fine del trattamento a 12 giorni (n=1). Le variazioni nell'espressione genica, sia statisticamente significative che non, presenti dopo i 2 e 7 giorni di latenza, a 12 giorni non sono più percettibili per quanto riguarda

l'espressione dei marcatori di staminalità. Più variabile il profilo d'espressione dei marcatori di commitment e differenziamento: se da un lato *NKX2.5*, *MEF2C*, *VEGF* e *HGF* sono ancora sovraespressi, *KDR* risulta essere circa l'80% in meno rispetto ai controlli (Fig. 11D).

Osservando globalmente questi risultati, possiamo notare come l'aumento del tempo di latenza dai 2 a 7 giorni attenui gli effetti dei nostri trattamenti, dimostrata dalla riduzione dell'espressione relativa tra i 2 tempi sperimentali. I 12 giorni di incubazione, invece, sembrano avere un triplice effetto: l'espressione dei geni della staminalità presenta livelli comparabili a quelli dei controlli, *NKX2.5*, *VEGF* e *HGF* risultano ancora molto espressi mentre l'altro marcatore della vasculogenesi in studio è fortemente sottoespresso (Fig. 11E).

I risultati poco chiari relativi agli effetti dell'onda acustica complessa studiati dopo un periodo di latenza variabile, ci hanno indotto a modificare il nostro approccio sperimentale. Abbiamo deciso, quindi, di sottoporre le colture di hASC a tempi brevi di somministrazione, 2, 4, 8 e 16 ore (n=1 per ogni tempo sperimentale) utilizzando il generatore di vibrazioni meccaniche, e di analizzarne in qPCR gli effetti alla fine del trattamento.

Questa tipologia di studio ci ha consentito di evidenziare gli effetti a fine trattamento della somministrazione dell'onda acustica complessa come variazione d'espressione di *KLF4*, *SOX2*, *NANOG* (per la staminalità), *NKX2.5*, *GATA4* e *MEF2C* (per commitment cardiaco), *VEGF* (sviluppo vascolare) e *NEUROG1* (sviluppo nervoso). Come mostrato nella Figura 12, l'espressione di tutti i geni in studio presenta delle fluttuazioni lungo il tempo. Dopo 2 ore di stimolo, le cellule trattate mostrano una generale tendenza alla stabilità di espressione rispetto ai controlli per quanto riguarda i geni della staminalità e *NKX2.5*; al contempo, gli altri marcatori di commitment e differenziamento, risultano sottoespressi. Tra le 4 e 8 ore di trattamento abbiamo registrato una generale sovraespressione, più precoce per *NKX2.5*, *GATA4* e *VEGF*. Dopo 16 ore, invece, tutti i geni in studio risultavano fortemente sottoespressi nei trattati. Estrapolando i dati d'espressione relativi a *NKX2.5*, *MEF2C* e *VEGF*, inoltre, è stato possibile notare che le fluttuazioni di questi 3 geni, che partecipano allo sviluppo cardiovascolare, sono simili tra loro a tutti e 4 i tempi sperimentali (Fig. 12B). Sebbene senza significatività statistica, quanto osservato in questi esperimenti, ci ha portato ad utilizzare questo approccio sperimentale nei successivi esperimenti con le onde complesse.

Effetti dell'onda complessa normalizzata somministrata con il Cell Exciter.

Il suono cardiaco processato, sia come suono normalizzato che come melodia, è stato somministrato anche con un secondo apparato, il Cell Exciter. Colture di hASC sono state quindi sottoposte a 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore di stimolo e ne è stata saggiata l'espressione in qPCR di *KLF4*, *SOX2*, *NANOG* (staminalità), *NKX2.5*, *GATA4* e *MEF2C* (sviluppo cardiaco), *VEGF* (sviluppo vascolare), *NEUROG1* (sviluppo nervoso).

In prima istanza, abbiamo saggiato gli effetti dell'onda complessa overlayed ai vari time points (n=2). Come mostrato in Figura 13A, l'espressione di tutti i geni in studio presenta delle fluttuazioni. Sebbene nessun dato risulti significativo a livello statistico, il trend di espressione globale è risultato interessante.

Mentre dopo 2 ore di trattamento tutti i geni in studio sono risultati sottoespressi, tra le 4 e 72 ore si può notare una coordinazione tra l'espressione dei geni della staminalità e dello sviluppo cardiovascolare.

KLF4, *NANOG* e *SOX2*, sottoespressi nei trattati dopo 2 ore di stimolazione, tra le 4 e 8 ore di trattamento presentano picchi di sovraespressione; tra le 16 e 48 ore di trattamento, invece, l'entità di sovraespressione tende a diminuire progressivamente. Alle 72 ore, i geni della staminalità risultano essere sottoespressi (Fig. 13B).

L'espressione dei geni correlati ai vari destini differenziativi risulta essere meno chiara in quanto non è evidenziabile un pattern d'espressione ma solo fluttuazioni (Fig. 13C).

Valutando però i dati d'espressione relativi ai vari time points non come istogrammi ma come curve di distribuzione, è possibile apprezzare come la morfologia delle curve di *NKX2.5*, *GATA4* e *MEF2C* risulti essere simile (Fig 13D).

Colture di hASC sono state successivamente trattate con i suoni cardiaci processati ma non sovrapposti. Questa melodia è stata somministrata per 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore (n=1 per ogni tempo sperimentale) ed in qPCR è stata valutata l'espressione dei marcatori di staminalità e dei principali destini differenziativi, includendo anche lo studio di *MyoD*.

Come mostrato in Figura 14A, l'andamento a livello globale di tutti i marcatori in studio mostra numerose fluttuazioni in funzione dei tempi di trattamento.

Per quanto riguarda l'espressione di *KLF4*, *NANOG* e *SOX2* (Fig. 14B e C), i trattamenti di diversa durata con la melodia inducono oscillazioni dell'espressione di

SOX2 e NANOG coordinate nel tempo. Tra i trattamenti di 2, 4 e 8 ore entrambi da un'iniziale sovraespressione tendono ad eguagliare i livelli registrati nei controlli a cui segue una forte sottoespressione dopo 16 e 24 di stimolazione. Dopo 48 e 72 ore, invece, l'espressione di questi risulta infine upregolata dal trattamento. Parallelamente, l'espressione di *KLF4* presenta più fluttuazioni ai vari tempi sperimentali.

I livelli d'espressione dei marcatori dei differenziamenti presentano anch'essi delle fluttuazioni (Fig. 14D ed E). A livello globale si può notare come i trattamenti di 16, 24 e 48 ore inducano una sottoespressione di tutti i geni in studio, mentre gli altri tempi sperimentali vedono una globale tendenza alla sovraespressione.

Utilizzando i grafici di distribuzione, si nota un pattern di espressione coordinato tra *NKX2.5*, *GATA4*, *MEF2C* e *VEGF* (Fig. 14F). Le curve che rappresentano l'espressione di questi quattro marcatori presentano una morfologia quasi sovrapponibile, specialmente per *NKX2.5* e *GATA4*, sebbene siano sfasate a livello temporale (Fig. 14G).

3.4 - Trattamenti con estratti embrionali di Zebrafish

Le cellule mesenchimali isolate dal tessuto adiposo con tecnologia Lipogems hanno rappresentato il modello cellulare per studiare gli effetti di estratti embrionali di Zebrafish sul differenziamento. L'ipotesi sperimentale di questa specifica ricerca trova le basi su dati in letteratura che mostrano il potenziale antiproliferativo di queste soluzioni *in vitro*, su linee cellulari tumorali. Anche *in vivo* sono stati riportati risultati in merito: pazienti con epatocarcinoma avanzato cui sono stati somministrati gli estratti durante un trial clinico hanno mostrato nel 25% dei casi una risposta completa al trattamento, in termini di crescita della massa tumorale e livelli di marcatori specifici del cancro.

Dati questi presupposti, abbiamo iniziato uno studio preliminare per valutare se tale effetto antiproliferativo poteva assumere una connotazione di effetto pro-differenziativo a livello molecolare.

Abbiamo quindi testato con saggi MTT gli effetti di tali estratti sulla proliferazione del nostro modello e abbiamo trattato, quindi, colture di hASC con gli estratti più efficaci. Lo studio degli effetti è stato condotto sia a livello di vitalità cellulare che di

espressione di marcatori della pluripotenza (*OCT3/4* e/o *KLF4* e/o *c-Myc*) e marcatori dello sviluppo cardiovascolare (*NKX2.5* e/o *MEF2C* e *VEGF*) e nervoso (*NEUROG1*).

3.4.1 - Caratterizzazione degli estratti embrionali di Zebrafish

Dalla casa produttrice, abbiamo ottenuto 6 soluzioni gliceroalcoliche contenenti estratti embrionali di Zebrafish relativi a 5 fasi di sviluppo più una soluzione mix di queste. Non avendo avuto indicazioni specifiche sulla composizione, in termini molecolari sia qualitativi che quantitativi, se non l'alto contenuto proteico, abbiamo deciso di caratterizzare a livello quantitativo le soluzioni.

Mediante BCA assay e lettura al NanoDrop abbiamo effettuato il dosaggio proteico delle 6 fasi a 3 diluizioni diverse (puro, 1:2 e 1:4 in acqua deionizzata). In tale misurazione abbiamo anche incluso il solo solvente glicero alcolico, sempre a 3 diluizioni, verificando che l'assorbanza di questo fosse praticamente nulla (Tab. 4).

Abbiamo quindi separato con corsa elettroforetica verticale lo stesso quantitativo in µg dei sei estratti per visualizzare la composizione specifica di ogni soluzione.

Come evidenziato in Figura 15, tutti gli estratti ZF presentano 2 cluster proteici principali, ovvero tra i 70 e 250 KDa e tra i 25 e 37 KDa. Confrontando l'intensità delle bande dei cluster è possibile individuare delle differenze in termini quantitativi.

Le proteine a più alto peso molecolare sono meno abbondanti negli estratti relativi allo sviluppo tardivo, in particolare quelle oltre i 150 KDa, mentre le proteine intorno ai 75 KDa risultano maggiori negli estratti ZF4 e ZF5. Quadro analogo per il range 20-37 KDa: le proteine da circa 30 KDa sono meno abbondanti in ZF4 e ZF5 mentre quelle tra i 20 e 25 KDa sono maggiori nelle due fasi di sviluppo tardivo.

Oltre ai cluster comuni, è possibile notare la presenza di polipeptidi stadio specifici, come ad esempio le bande da circa 18 KDa e 37 KDa visibili solo in ZF5 e/o ZF4.

3.4.2 - Effetti dei trattamenti con gli estratti ZF sulla proliferazione delle hASC

La letteratura pregressa [Biava et al., 2001] in merito agli effetti antiproliferativi degli estratti embrionali di *D. rerio* su cellule tumorali immortalizzate ci ha suggerito la prima indagine sperimentale da effettuare sul nostro modello.

Dopo l'ottimizzazione della densità cellulare di semina, appurata per 5000 cellule/cm² in piastre da 48 pozzetti, abbiamo condotto saggi MTT in triplicato sulle hASC trattate

con tutti gli estratti in nostro possesso a 4 concentrazioni, pari a 10, 1, 0.1 e 0.01 µg/ml dopo 24 e 72 ore dalla somministrazione.

Dopo 24 ore dal trattamento, l'analisi dell'assorbanza non ha dato risultati statisticamente significativi. Nonostante ciò, come mostrato in Figura 16A, è possibile notare che mentre le fasi derivanti da embrioni precoci (ZF1-3) mantengono il numero di cellule delle colture trattate pressoché stabile rispetto a quello dei controlli, le fasi ZF4, ZF5 e la mix ZF6 inibiscono la proliferazione.

L'analisi dell'assorbanza dopo 72 ore dal trattamento (Fig. 16B), invece, ha portato alla significatività statistica quanto evidenziato dallo studio alle 24 ore. I trattamenti con gli estratti ZF1, ZF2 e ZF3 non risultano significativamente inibitori della proliferazione, sebbene sia possibile notare come il trattamento con le soluzioni 10 µg/ml riducano il numero di cellule nelle colture trattate. Al contrario, i trattamenti con le soluzioni ZF4, ZF5 e ZF6 alla concentrazione di 10 µg/ml riducono significativamente la proliferazione delle hASC ($p < 0.01$), così come i trattamenti con ZF5 1 µg/ml e ZF6 1 e 0.1 µg/ml.

In funzione di questi risultati abbiamo deciso di iniziare lo studio preliminare degli effetti sull'espressione genica della soluzione ZF6, la mix dei 5 estratti stadio-specifici.

3.4.3 - Effetti dei trattamenti con gli estratti ZF sulla vitalità delle hASC

Alla fine di ogni trattamento con ZF6 alle 4 concentrazioni e ZF5 10 µg/ml abbiamo valutato la viability ai tempi sperimentali scelti.

Nessun trattamento effettuato risulta inficiare la vitalità cellulare. Tuttavia, gli estratti ZF6, mix delle fasi, e ZF5, derivato da embrioni allo stadio di *primordia*, alla massima concentrazione, riducono la viability rispettivamente del 2.5 e 3 % nei trattati dopo 24 ore dal trattamento (Fig. 17A e B).

3.4.4 - Effetti dei trattamenti con estratti ZF sull'espressione genica delle hASC

Dopo aver evidenziato quali estratti avessero effetti inibitori sulla proliferazione del nostro modello, abbiamo deciso di indagare gli effetti sulle hASC a livello molecolare della mix delle fasi, ZF6, e della ZF5, relativa allo stadio di *primordia* dello sviluppo del pesce zebra.

Sebbene siano stati eseguiti più esperimenti (cfr. “I trattamenti con gli estratti di Zebrafish” nel capitolo “Materiali e Metodi”), qui verranno illustrati i risultati ottenuti ad oggi relativi agli esperimenti riassunti nella Tabella 1C.

Per lo screening preliminare, abbiamo saggiato in RT-PCR l'espressione di *OCT3/4* e/o *KLF4* per quanto riguarda i marcatori di staminalità, di *NKX2.5* e/o *MEF2C* per lo sviluppo cardiaco e *VEGF* per quello vascolare nelle hASC trattate con ZF6 alle concentrazioni di 10, 1, 0.1 e 0.01 µg/ml. Come tempi sperimentali abbiamo scelto 24 ore per tutte le concentrazioni, 72 ore per la 10 µg/ml e 7 giorni dalla somministrazione per le concentrazioni minori.

Dopo 24 ore dalla somministrazione della mix delle fasi (ZF6) alle 4 concentrazioni (n=1 per ogni concentrazione) abbiamo studiato l'espressione di *OCT3/4*, *MEF2C* e *VEGF* in RT-PCR.

Come mostrato in Figura 18A, ZF6 10 µg/ml induce la sottoespressione di *OCT3/4* mentre i marcatori del differenziamento cardiovascolare risultano essere comparabili ai controlli (variazione d'espressione rispetto al controllo compresa tra ± 0.18). Le concentrazioni minori, invece, tendono a mitigare gli effetti riscontrati, ovvero minor sottoregolazione di *OCT3/4* che culmina con un'importante sovraespressione dopo trattamento con la ZF6 0.01 µg/ml e ripristino dell'espressione basale per *MEF2C* e *VEGF*.

Dopo 72 ore, gli effetti del trattamento con ZF6 10 µg/ml (n=1), stimato come variazione d'espressione di *OCT3/4*, *KLF4*, *NKX2.5*, *MEF2C* e *VEGF* in RT-PCR sono rappresentati da una sostanziale stabilità dei marcatori della staminalità e *NKX2.5* (variazione dell'1% circa rispetto ai controlli) mentre *MEF2C* e *VEGF* (Fig. 18B) risultano essere sovraespressi.

Ai 7 giorni dal trattamento con la mix delle fasi, invece, abbiamo valutato in RT-PCR solo le concentrazioni 1 (n=1), 0.1 e 0.01 µg/ml (n=2). Le variazioni dell'espressione di *OCT3/4*, *KLF4*, *NKX2.5*, *MEF2C* e *VEGF* non presentano una correlazione con la concentrazione dopo 7 giorni dal trattamento (Fig. 18C); infatti se 1 µg/ml di ZF6 mantiene pressoché stabili i livelli di *KLF4*, *MEF2C* e *VEGF* in parallelo con la sovraespressione di *OCT3/4* e *NKX2.5*, ZF6 ai 0.1 µg/ml dà sovraespressione solo di *KLF4* ed *NKX2.5*. Per quanto riguarda la concentrazione minima in uso, gli effetti di questa sull'espressione genica delle hASC risultano paragonabili a quelli descritti per la mix delle fasi somministrata alla dose di 1 µg/ml.

Dato che la concentrazione di 10 µg/ml risultava avere effetti antiproliferativi sia dopo 24 che 72 ore (Fig. 16A e B), all'analisi d'espressione in PCR quantitativa relativa, abbiamo associato lo studio in qPCR dell'espressione di *c-Myc* come marcatore di staminalità, *VEGF* e *NEUROG1*. Per la ZF6, abbiamo valutato tutti e tre i tempi sperimentali (i.e. 24 e 72 ore e 7 giorni) ed incluso lo studio di *NKX2.5* alle 72 ore, mentre per ZF5 al momento, solo 24 ore dal trattamento.

Nonostante abbiamo valutato due marcatori diversi nelle due tecniche, per quanto riguarda la stima degli effetti del trattamento in termini di espressione di staminalità abbiamo potuto riscontrare concordanza di risultati sia alle 24 che 72 ore dal trattamento. Come mostrato in Figura 18 D ed E, nel trattamento con ZF6 10 µg/ml i marcatori di pluripotenza dopo 24 ore risultano sottoespressi mentre alle 72 le variazioni sono da considerarsi prossime allo zero.

Considerazioni simili per l'espressione di *VEGF* alle 24 e 72 ore in cui quanto evidenziato in RT-PCR è risultato confermato ed amplificato dallo studio in qPCR. *VEGF* alle 24 ore è infatti, è risultato più sottoespresso in qPCR rispetto alla RT-PCR e viceversa sovraespresso alle 72 ore, più sensibilmente in real time (Fig. 18F e G). E' stata condotta anche l'analisi d'espressione di *NKX2.5*; la stabilità riscontrata in PCR quantitativa relativa dopo 72 ore dal trattamento, in qPCR è risultata essere una sovraespressione (Fig. 18G). Infine, dato che in RT-PCR non siamo mai riusciti ad ottenere risultati in merito all'espressione di *NEUROG1* nelle hASC, anche per lo studio degli effetti di ZF abbiamo utilizzato la qPCR per indagarne l'espressione (Fig. 18H).

Considerando i risultati ottenuti per la ZF6, in cui le variazioni dell'espressione genica correlabili all'inibizione della proliferazione erano maggiori dopo 24 ore del trattamento, abbiamo valutato anche l'espressione delle hASC trattate con ZF5 dopo 24 ore dal trattamento. Alla medesima concentrazione, pari a 10 µg/ml, e allo stesso tempo sperimentale, i due estratti inducono effetti diversi per quanto riguarda l'espressione di *c-Myc* e *NEUROG1*, rispettivamente sottoespresso e stabile dopo trattamento con ZF6, e stabile e sottoespresso dopo quello con ZF5. In entrambi i trattamenti, invece, si ha la sottoespressione di *VEGF*, più spiccata con la fase 5 (Fig. 18I).

3.5 - L'ottimizzazione del protocollo di Western Blot

Nel nostro percorso sperimentale, il piano prevedeva di verificare se le variazioni dell'espressione di alcuni geni in esame si traducevano in variazioni significative dell'espressione delle proteine corrispondenti o, in altri termini, se queste variazioni erano di tipo funzionale.

Abbiamo scelto con proteine d'interesse i fattori di trascrizione SOX2 e NANOG come indicatori di pluripotenza ed NKX2.5 per il destino differenziativo cardiaco mentre la proteina del GAPDH è stata scelta come riferimento.

Dato che nel nostro laboratorio l'analisi dell'espressione proteica non era una procedura di routine, tanto meno per queste specifiche proteine, abbiamo iniziato l'ottimizzazione a partire dall'estrazione delle proteine totali delle hASC con il protocollo del RIPA buffer.

Le proteine totali da hASC non trattate sono state utilizzate per la messa a punto del protocollo di Western Blot, percorso che è ancora in atto in quanto le condizioni procedurali adeguate e ripetibili sono state definite solo per il GAPDH in hASC e per NKX2.5 solo in proteine totali estratte dal ventricolo destro di ratto.

Lo studio dell'espressione della proteina di riferimento ci ha consentito di valutare ed identificare le condizioni procedurali non solo specifiche di questa proteina ma anche della fase di blotting in sé, indipendentemente da quale anticorpo/proteina fosse in studio.

Per lo studio dell'espressione proteica di GAPDH, le migliori condizioni sono state: l'SDS-page di 40 µg di proteine estratte da hASC, trasferimento su membrana per 90 minuti a 30V in ghiaccio con buffer addizionato con lo 0.05% di SDS, Rabbit anti-GAPDH 1:3000 diluito in una soluzione di BSA al 5% e incubato O/N in camera fredda, incubazione secondaria con anti-Rabbit 1:5000 diluito in una soluzione di latte al 5% ed esposizione di un'ora dopo incubazione con l'ECL.

La modifica del buffer di trasferimento si è resa necessaria per massimizzare il trasferimento delle proteine, soprattutto quelle ad alto peso (oltre i 100 KDa), dal gel alla nitrocellulosa. Sono state testate diverse concentrazioni aggiuntive di SDS in associazione o meno con concentrazioni decrescenti di metanolo. Il buffer con lo 0.05% di SDS in più oltre a quello standard e senza metanolo addizionato è risultato essere il più efficiente ed è stato utilizzato in tutti i test.

Ci è stato possibile saggiare l'espressione di NKX2.5, fattore trascrizionale specifico del commisionamento cardiaco, solo utilizzando proteine tessuto-specifiche di ratto, nonostante, in accordo con le istruzioni della casa produttrice dell'anticorpo, la specie

murina non era menzionata come bersaglio. L'anticorpo reagisce con le 3 isoforme proteiche di NKX2.5 e le 3 bande corrispondenti sono state ottenute alle seguenti condizioni: 40 μ g di proteine ventricolari di ratto, blotting nelle nostre condizioni standard, Rabbit anti- NKX2.5 1:1000 diluito in una soluzione di BSA al 5% e incubato O/N in camera fredda, incubazione secondaria con anti-Rabbit 1:5000 diluito in una soluzione di latte al 5% ed esposizione di 24 ore dopo incubazione con l'ECL. Per SOX2 e NANOG, invece, la visualizzazione mediante ECL, sia a sensibilità standard che nel range dei femtogrammi, ha avuto successo solo una volta, nonostante i numerosi tentativi di ripetizione. Gli unici test con esito positivo hanno previsto le seguenti condizioni. Per NANOG, 60 μ g di proteine da hASC, blotting in condizioni standard, Rabbit-anti-NANOG 1:1000 diluito in una soluzione di BSA al 5% e incubato O/N in camera fredda, incubazione secondaria con anti-Rabbit 1:5000 diluito in una soluzione di latte al 5% ed esposizione di 24 ore dopo incubazione con l'ECL. Per SOX2, 40 μ g di proteine da hASC, blotting in condizioni standard, Rabbit-anti-SOX2 1:5000 diluito in TBS-T e incubato O/N in camera fredda, incubazione secondaria con anti-Rabbit 1:5000 diluito in una TBS-T ed esposizione di 8 minuti dopo incubazione con l'ECL ad alta sensibilità.

La messa a punto dell'analisi delle proteine è ancora in corso.

DISCUSSIONE

Tutti i processi biologici sono interpretabili come il risultato dell'interazione di molteplici reti regolatorie che, a più livelli, mantengono l'omeostasi cellulare e di tutto l'organismo.

Gli aspetti molecolari e chimici che portano all'esplicazione di una determinata risposta o di una funzione sono stati e sono tutt'oggi ampiamente studiati, nei microrganismi così come nelle specie superiori. Determinate molecole, sia naturali, come l'acido retinoico [Duester, 2008] o i fattori di differenziamento contenuti negli estratti embrionali di Zebrafish, che di sintesi, come gli esteri di acido retinoico, butirrico e ialuronico, si sono dimostrate essere importanti modulatrici della fisiologia cellulare [Biava et al., 2001], in particolare del processo del differenziamento [Duester, 2008; Maioli et al., 2010; Ventura et al., 2007]. Meno approfondito è, invece, lo studio del ruolo regolatorio che ricoprono le interazioni di tipo fisico. Il semplice contatto cellula-cellula può rappresentare lo stimolo che induce un blocco della proliferazione o, nel caso dell'embrione in via di sviluppo, l'*incipit* del programma differenziativo che determina la transizione tra morula e blastula [Gilbert, 1996]. In questo specifico esempio, oltre alle molecole di membrana, le pulsazioni citoscheletriche, risultato del continuo rimodellamento del citoscheletro, possono rappresentare la forma di comunicazione cellulare non molecolare alla base del significato dell'inibizione da contatto. O, ancora, è stato recentemente mostrato che le macromolecole organiche, quali le proteine, vibrano in maniera specifica in funzione delle modificazioni post-traduzionali cui sono sottoposte [Acbas et al., 2014]. Inoltre, interazioni di tipo fisico sono ipotizzate essere anche alla base della complessità a livello evolutivo. Il cromosoma circolare dei batteri è organizzato in unità policistroniche: geni che regolano un certo metabolismo e che devono essere espressi o inibiti nello stesso momento sono topograficamente localizzati in regioni adiacenti in modo da avere una rapida trascrizione [Prescott et al., 2008]. Negli organismi superiori, oltre a non essere presente l'organizzazione in operoni, i geni dello stesso pathway regolatorio sono localizzati spesso in regioni cromosomiche diverse. L'organizzazione della cromatina, in associazione con i fattori di trascrizione, assicura la rapidità e coordinazione dell'espressione genica negli eucarioti. L'impacchettamento del DNA, grazie alla presenza delle proteine strutturali, crea delle anse, dei ripiegamenti che avvicinano, o allontanano fisicamente le varie regioni cromosomiche [Alberts et al., 2002; Lodish et al., 2000]. Questa topografia viene opportunamente modificata dall'azione dei fattori di trascrizione. Queste molecole proteiche, in virtù dei loro domini, piegano il DNA in modo che la nuova conformazione sia stabile per il tempo necessario e interagisca col complesso dell'RNA

polimerasi in modo da velocizzare o inibire il processo trascrizionale. In questo contesto, la trascrizione può essere interpretata come il risultato dell'interazione di molteplici forze fisiche. Il legame tra l'omeodominio del fattore di trascrizione e il DNA, che risulta nel ripiegamento delle anse di DNA, genera forze elastiche di verso contrario tra loro che, da un lato, tendono a riportare il sistema nella posizione originale (forze elastiche intrinseche alla molecola dell'acido nucleico), dall'altro mantengono la nuova conformazione. La posizione relativa della nuova ansa formata andrà a determinare o meno l'attivazione della trascrizione. Se all'interpretazione meccanica di un processo fondamentale come la trascrizione si associa la variabile tempo, il gioco di forze appena descritto diventa il modulo dinamico che determina la fisiologia di una cellula. La conformazione derivante dal legame DNA-fattore di trascrizione non è permanente; in ogni specifico momento del ciclo cellulare determinate unità trascrizionali sono temporaneamente attive, mentre altre sono temporaneamente silenziate, determinando un'oscillazione dell'espressione dei geni in questione. Nel contesto dello sviluppo, non solo differenti topografie cromosomiche sono state associate ad uno specifico lineage differenziativo [Rajapakse et al., 2009] ma anche le oscillazioni nel tempo dell'espressione di determinati geni si sono rivelate fondamentali durante l'embriogenesi e l'instaurarsi dei vari pattern differenziativi. Il comportamento dei geni *Hes* rappresentano un chiaro esempio. Questa famiglia genica codifica per fattori di trascrizione che presentano domini elica-ansa-elica, tipico motivo dei geni repressori, e regolano l'instaurarsi del differenziamento sostenendo l'autorinnovamento cellulare. Nello specifico, l'espressione sia di *Hes1* che *Hes7* presenta una periodicità stimata intorno alle 2 ore. Inoltre, la periodicità di *Hes1* è cellula-specifica e varia in funzione delle diverse fasi di diversi cicli, risultando così una grande variabilità tra cellule diverse in ogni momento. In definitiva, questi livelli d'espressione fluttuanti nel tempo vanno a determinare il bilanciamento tra proliferazione e differenziamento [Kageyama et al., 2007].

Le evidenze sul ruolo regolatorio non solo di molecole ma anche di forze di tipo fisico hanno rappresentato la base teorica della nostra ricerca, il cui obiettivo finale è quello di identificare nuove strategie differenziative per migliorare la terapia cellulare e fornire nuovi strumenti alla medicina rigenerativa.

L'utilizzo di cellule staminali nella pratica clinica, se da un lato è altamente promettente, dall'altro comporta delle importanti limitazioni, strettamente correlate alla staminalità, quali la cancerogenicità, l'efficienza di differenziamento e l'homing dopo trapianto. Se a questi aspetti si aggiunge tutta la pratica di di preparazione del PTC (i.e. Prodotto per

Terapia Cellulare) che avviene in laboratorio, le variabili su cui la ricerca non ha ancora pieno controllo aumentano. Ad oggi, infatti, l'induzione al differenziamento è ottenuta per lo più mediante l'utilizzo di numerosi composti chimici o di cocktail differenziativi, strategie manipolative spesso efficaci ma altrettanto spesso non compatibili con l'utilizzo sull'uomo. Il requisito di poca manipolazione è infatti uno dei punti cardine delle cGMP, delle linee guida della pratica di produzione [Tremolada et al., 2010; Bianchi et al., 2013]. In linea con queste norme sarebbe il condizionamento verso un determinato destino differenziativo attuato mediante l'utilizzo di forze fisiche o con molecole di origine naturale che, comunemente, potremmo definire "integratori".

Interessanti risultati sono stati ottenuti *in vitro* con l'applicazione di campi elettromagnetici sia su cellule derivate da teratocarcinoma embrionale di topo sia su cellule mesenchimali umane e fibroblasti adulti utilizzando il Radio Electric Asymmetric Conveyer o REAC [Maioli et al., 2012, 2013a e 2013b]. Queste tipologie di cellule, dopo il trattamento, esprimevano i marcatori genetici tipici dei principali destini differenziativi passando attraverso una fase di sovraespressione dei marcatori della pluripotenza. Le onde applicate, in qualche modo, hanno direzionato le forze fisiche che naturalmente sono presenti ed agiscono a livello subnucleare a dare un profilo d'espressione che, in condizioni basali, non si sarebbe avuto.

Abbiamo quindi deciso di verificare se anche le onde di tipo meccanico, nello specifico acustiche, potessero agire sui sistemi di forze intracellulari, utilizzando come modello le cellule stromali mesenchimali isolate dal tessuto adiposo, le hASC, con il Lipogems. La scelta del modello è stata effettuata considerando due caratteristiche fondamentali di queste cellule, ovvero la reperibilità del tessuto d'origine e la tecnica di isolamento. Il tessuto adiposo, oltre ad essere abbondante nell'adulto [Lohman e Going, 1993], presenta la frazione stromale ricca di cellule multipotenti ed è generalmente scartato dopo gli interventi chirurgici [Tremolada et al., 2010]. La procedura di isolamento degli elementi stromali, da letteratura, prevede la digestione del tessuto con Collagenasi e successiva emolisi [Zuk et al., 2001], trattamenti che non compromettono la vitalità delle cellule multipotenti ma distruggono i glicocalici, strutture extracellulari fondamentali per comunicazione ed adesione cellulare [Bianchi et al., 2013]. Le hASC da noi utilizzate invece, sono state isolate dal lipoaspirato mediante la sola triturazione meccanica del tessuto. Con l'utilizzo del Lipogems, è stato possibile ottenere in pochi minuti un prodotto integro e pronto per essere messo in coltura. Le cellule aderenti isolate dal prodotto di Lipogems sono state caratterizzate e sono

risultate positive per i marcatori di membrana ed esplicazione del potenziale differenziativo tipici delle popolazioni mesenchimali [Bianchi et al., 2013].

Abbiamo quindi sottoposto le hASC a trattamenti con onde semplici e con veri e propri suoni per tempi diversi, utilizzando o meno tempi latenza prima dello studio dell'espressione genica e utilizzando due apparecchiature di somministrazione, diverse fondamentalmente per il grado di riproducibilità delle componenti.

Durante il nostro lavoro sperimentale oltre a valutare gli effetti dei vari trattamenti, abbiamo anche avuto modo di valutare la bontà del nostro modello cellulare e di constatare che la gamma di onde e frequenze in uso non induceva variazioni significative della vitalità cellulare (Fig. 10B). Mediante una meta-analisi dei dati d'espressione di tutte le colture di controllo, l'analisi critica dei risultati ci ha indirettamente consentito di valutare le hASC come modello. Abbiamo riscontrato una non coerenza tra i dati relativi ai controlli degli esperimenti che prevedevano i tempi di latenza e quelli con analisi immediata alla fine dello stimolo. Inizialmente, questa discrepanza è stata imputata alla lunghezza dei tempi sperimentali in quanto, durante il periodo di latenza post trattamento, le hASC sono state mantenute in incubatore e il terreno di coltura non è stato cambiato e ciò avrebbe inficiato sul profilo d'espressione a causa dell'accumulo di cataboliti. Questa considerazione, se poteva essere valida per gli esperimenti a 7 giorni (ovvero 9 giorni dalla semina), risultava molto debole per le 48 ore di incubazione dopo la fine dello stimolo; infatti, a livello teorico, le colture di controllo degli esperimenti che prevedevano 24 ore di stimolo e 48 di latenza erano equiparabili a quelli che prevedevano 72 ore di trattamento continuativo. Alla luce di ciò, abbiamo ipotizzato che le differenze tra questi due tipi di esperimenti potessero essere apparenti; questo perché sono state usate due tecniche differenti, RT-PCR e qPCR rispettivamente, che esprimono i risultati in maniera non comparabile, ovvero come numero puro, risultato di una rapporto tra due masse, e una differenza di cicli di PCR. Quest'ipotesi risulta essere supportata dal pool di dati omogenei, quelli relativi all'espressione dei controlli dei soli esperimenti che non prevedevano tempi di latenza. Tutti i valori di espressione dei geni in studio (*KLF4*, *SOX2*, *NANOG*, *NKX2.5*, *MEF2C*, *VEGF* e *NEUROG1*), ai 7 tempi sperimentali (2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore) sono il risultato della media di 4 o 3 replicati biologici, espressa come ΔCt tra il gene d'interesse e il gene di riferimento. La sola media di tali replicati presenta un valore modale di DS del 7% mentre per ogni gene la media dei ΔCt relativi ai 7 tempi sperimentali presentava DS percentuale con moda del 4%. Questi errori si traducono in una differenza di cicli tra i 7 tempi compresa tra 0.5 e 1.4 (Fig. 8B), valori che, nella

prassi comune, consentono di considerare accettabili due replicati tecnici. Per queste ragioni, abbiamo potuto assumere che le hASC rappresentano un modello cellulare stabile in termini d'espressione genica e, di conseguenza, ogni variazione dopo trattamento rappresenta un dato con un proprio significato.

Alla luce di ciò, tutti i nostri trattamenti hanno indotto variazioni nell'espressione dei geni in studio, sebbene non sempre di facile interpretazione. A prescindere dalla tipologia di onda somministrata, l'approccio sperimentale che prevedeva un tempo di incubazione dopo la fine dello stimolo si è dimostrato non essere adeguato per i nostri scopi. Più precisamente, il tempo di latenza post-trattamento non fornisce informazioni su quali effetti sulla trascrizione genica siano stati provocati dallo stimolo somministrato, ma solo la risposta cellulare che risulta dopo un tempo variabile dalla perturbazione e per quanto tempo questa risposta risulta registrabile. Come mostrato in Figura 8 E, relativo al set di esperimenti con maggior mole sperimentale, le variazioni dei livelli di trascritto dei marcatori di staminalità tende a tornare ai livelli basali dopo 12 giorni. Più variabile è il comportamento dei marcatori di commitment o differenziamento anche se si percepisce la tendenza a tornare ai livelli di controllo. Inoltre, la consapevolezza della periodicità nell'espressione di molti geni, rende ancora meno forte l'interpretazione delle piccole variazioni rispetto ai controlli, come ad esempio l'espressione di *NANOG* e *KDR*, rappresentata nel medesimo grafico.

Il cambio dell'approccio sperimentale si è rivelato efficace per i nostri obiettivi. L'analisi dell'espressione, sia in RT-PCR che qPCR, effettuata subito dopo la fine dello stimolo ci ha consentito di valutare in "tempo reale" se e come il nostro stimolo fisico agiva sull'espressione delle hASC. L'analisi degli effetti dell'onda complessa normalizzata, derivata da suoni cardiaci processati in modo da avere 8 singole frequenze sovrapposte, è stata eseguita, inoltre, utilizzando due approcci grafici: i classici istogrammi e i grafici di distribuzione, in cui abbiamo deciso di rappresentare la linea di tendenza come una curva. In particolare quest'ultimi ci hanno consentito di visualizzare le variazioni d'espressione come oscillazioni lungo il tempo, ovvero ci hanno fornito, seppur approssimata, l'immagine più simile a come variano realmente i livelli di trascritto in funzione della durata del trattamento.

Il primo set di esperimenti effettuati ha previsto l'utilizzo del generatore di vibrazioni meccaniche e del suono overlayed, somministrato per 2, 4, 8 e 16 ore. Osservando globalmente le variazioni dei geni in studio (Fig. 12A) abbiamo potuto notare che il nostro stimolo ha effetti già dopo 2 ore di somministrazione, corrispondente ad una tendenza alla sottoespressione sia dei marcatori di staminalità che di commitment.

Questi effetti, poi, si sono tradotti in una sovraespressione dopo le 8 ore ed una generale sottoespressione dopo 16 ore. Il grafico di oscillazione (Fig. 12B) ci ha fornito ulteriori informazioni: l'espressione di *NKX2.5*, *MEF2C* e *VEGF* è mostrata da curve praticamente sovrapponibili; in altri termini la loro espressione subisce variazioni molto simili dopo lo stesso tempo di stimolazione. Più tardivo il picco d'espressione di *GATA4*, ma compatibile con informazioni pregresse in merito. L'idea della coordinazione fra i geni fondamentali per l'inizio dello sviluppo cardiaco e la concomitante sottoespressione di tutti i geni analizzati, ci ha suggerito di prolungare i tempi di somministrazione fino alle 72 ore. Anche qui, 2 ore di trattamento hanno indotto una lieve tendenza alla sottoespressione dei marcatori in studio. Tempi maggiori di trattamento, invece, hanno prodotto effetti diversi. I geni correlati alla pluripotenza (*KLF4*, *NANOG* e *SOX2*) sono risultati molto sovraespressi tra le 4 e 24 ore per poi risultare downregolati dopo 72 ore di trattamento (Fig. 13B). Per quanto riguarda, invece, gli effetti dei trattamenti sui livelli dei marcatori di commitment, dal grafico delle oscillazione si può notare una periodicità nei vari picchi d'espressione che, per *NKX2.5*, *GATA4*, *MEF2C* e *VEGF* risulta, nuovamente, quasi sovrapponibile. Se da un lato la periodicità dell'espressione di questi marcatori sembra una condizione di oscillazione fisiologica piuttosto che indotta da un trattamento, il pattern d'espressione dei geni della staminalità che abbiamo evidenziato, ovvero un'iniziale upregolazione seguita da sottoespressione, è stata riportata anche in lavori antecedenti [Maioli et al., 2013a e 2013b] in cui la somministrazione di onde elettromagnetiche ha indotto l'espressione dei marcatori dei principali destini differenziativi in fibroblasti umani adulti. Alla luce di ciò, abbiamo ipotizzato che la tipologia di trattamento (e di analisi) eseguita potesse essere adeguata in quanto, nella nostra ipotesi sperimentale, le frequenze derivate da un battito cardiaco potrebbero modulare e indurre l'espressione dei geni cardiaci precoci. Inoltre, *NKX2.5*, *GATA4* e *MEF2C* sono dei fattori di trascrizione e la continuità dello stimolo di natura fisica potenzialmente può modularne l'espressione. Tuttavia, dopo 3 giorni di trattamento, l'espressione di questi tre marcatori risultava essere tendenzialmente ai livelli dei controlli (Fig. 13C). Abbiamo imputato a quest'evidenza due motivazioni principali. Il nostro protocollo di semina delle hASC non prevedeva la sincronizzazione del ciclo cellulare (starvation); se consideriamo la periodicità d'espressione di molti geni e la variabilità di questa tra le fasi dei cicli cellulari, ciò può implicare che il valore d'espressione registrato sia da interpretare solo come la risposta media di tutte le singole cellule della coltura. Sebbene questa supposizione

abbia dei validi fondamenti, abbiamo comunque deciso di non sincronizzare le nostre colture prima del trattamento in quanto ciò avrebbe rappresentato un'importante deviazione dalle condizioni naturali (in quanto manipolata) non solo relative allo sviluppo ma anche dei processi differenziativi in generale. Basti pensare che l'embrione di mammifero è l'unico che, per asincronia di divisioni, vede stadi transitori appena dopo la fecondazione caratterizzati da un numero di cellule dispari, indicando che la variabile tempo è fondamentale nei processi dello sviluppo [Gilbert, 1996]. L'altra e più ovvia spiegazione era relativa al tipo di suono scelto. La processazione del suono cardiaco è stata eseguita filtrando i rumori derivati principalmente dalla respirazione e dopo aver registrato le frequenze strettamente correlate al battito. Queste frequenze sono state poi sovrapposte in modo che tutte partissero allo stesso t_0 . Abbiamo quindi deciso di utilizzare anche i tempi fisiologici di ogni frequenza. La melodia risultante è stata quindi utilizzata per stimolare le hASC per tempi dalle 2 alle 72 ore. L'andamento dell'espressione di tutti i marcatori genici in studio è risultata essere globalmente più coordinata; i geni associati al mantenimento della pluripotenza così come i geni lineage-specifici presentavano tutti picchi di sovraespressione dopo 4 ore di trattamento, tra le 8 e 16 ore questa sovraespressione tendeva a diminuire per poi aumentare nuovamente, con picchi massimi alle 72 ore (Fig. 14A). Ancora più interessante è risultato il pattern d'oscillazione dei marcatori del commitment cardiaco e differenziamento vascolare (Fig. 14F e G). Visualizzando i risultati come grafici di dispersione, le curve relative all'espressione di *NKX2.5*, *MEF2C* e *VEGF* erano sovrapponibili sia a livello morfologico che come scansione temporale dei picchi positivi e negativi. Anche la morfologia della curva di *GATA4* risulta presentare gli stessi picchi solo spostati temporalmente. Da letteratura, il differenziamento cardiaco è determinato da numerosi fattori di trascrizione che fanno parte di una fitta rete regolatoria spazio-temporale che porterà alla morfogenesi del cuore adulto. Nei mammiferi, da due regioni mesodermiche distinte deriveranno le cosiddette regioni del cuore primario e secondario che andranno a chiudersi e fondersi portando alla formazione degli atri e poi dei ventricoli. A livello molecolare, la migrazione e coalescenza dei precursori delle cellule di queste due regioni a dare il tubo cardiaco primitivo sono regolate dal circuito costituito da *NKX2.5*, *GATA4*, *MEF2C* in cui l'espressione di *NKX2.5* induce l'espressione degli altri fattori di trascrizione. Questa prima struttura cardiaca è fondamentalmente un vaso, quindi, alla rete regolatoria della morfogenesi cardiaca si

aggiunge quella della specificazione vascolare [Buckingham et al., 2005; Srivastava, 2006], di cui *VEGF* è un importante marcatore.

Valutando globalmente gli effetti delle vibrazioni meccaniche e la stabilità in condizioni basali delle hASC, possiamo dedurre che il nostro modello risponde alle sollecitazioni vibrazionali con variazioni dell'espressione sia di marcatori di staminalità che dei principali destini differenziativi. L'analisi di tali variazioni in tempo reale, ovvero appena terminato lo stimolo, ci ha fornito importanti indicazioni sui potenziali effetti su larga scala dei nostri trattamenti, come il differenziamento in cardiomiciti, indicando la melodia come potenziale stimolo modulatore dei fattori di trascrizione alla base del commitment cardiaco e differenziamento vascolare. Quest'evidenza ci ha suggerito lo studio dell'espressione proteica relativa non solo a *NANOG* e *SOX2*, marcatori di pluripotenza, ma anche di *NKX2.5*, in modo da valutare se le variazioni d'espressione genica riscontrate a fine trattamento erano tradotte in variazione dei prodotti genici. Stiamo ancora lavorando sia sull'ottimizzazione del protocollo di Western Blot che sul nostro approccio all'estrazione proteica. Le proteine su cui vorremmo indagare l'espressione sono fattori di trascrizione, quindi di localizzazione nucleare. Per questo stiamo procedendo con la messa a punto di una procedura di estrazione che ci consenta di estrarre separatamente le proteine nucleari e citoplasmatiche dallo stesso campione senza l'utilizzo di kit commerciali.

La nostra ricerca di nuove strategie differenziative non si è concentrata solamente sulle forze fisiche. Le hASC isolate con il Lipogems sono state il nostro modello anche nell'indagine sugli effetti di alcune molecole naturali, precedentemente utilizzate come trattamento antiproliferativo in cellule cancerose immortalizzate e come cura sperimentale per alcuni tipi di cancro [Biava et al., 2001; Livraghi et al., 2005]. Tali molecole, derivate da embrioni di *D. rerio* a specifici stadi di sviluppo, consistono fondamentalmente di fattori proteici che, data la loro origine, sono strettamente correlati al differenziamento delle cellule staminali embrionali (denominati SCDSF, "Stem cell differentiation stage factors"). L'ipotesi alla base dell'utilizzo di questi estratti come terapia sta nella relazione sillogistica che sussiste tra cellule tumorali, cellule staminali e differenziamento. Ogni fase dello sviluppo è caratterizzata da un set di proteine o fattori di trascrizione specifici il cui dosaggio è bilanciato, in termini sia spaziali che temporali, durante i processi differenziativi che da una cellula staminale embrionale portano alla cellula adulta (o completamente differenziata). Le cellule

tumorali presentano delle caratteristiche comuni con le cellule staminali, quali l'alto tasso proliferativo e l'autorinnovamento e ciò fa indicare spesso queste cellule adulte come "dedifferenziate". Per questo parallelismo funzionale, i fattori che determinano il progredire del differenziamento delle cellule staminali possono in linea teorica indurre la riprogrammazione delle cellule cancerose. La formulazione di tale ipotesi, effettuata dal Dott. Biava (Multimedica, Milano) che da anni si occupa di oncologia biologica e che per primo ha studiato ed utilizzato questi estratti, ci ha suggerito lo studio degli effetti degli SCDSF su cellule mesenchimali umane.

Ci sono state fornite 6 soluzioni derivate da 5 specifici stadi di sviluppo e una sesta che rappresentava la mix delle 5 fasi, che abbiamo sottoposto a SDS-Page in modo da valutare la composizione proteica in termini di cluster di peso molecolare. Dalla letteratura, sapevamo che gli embrioni corionati precoci di pesce zebra presentano un alto contenuto proteico derivato dal sacco vitellino, stimato essere 10 volte quello dell'embrione in sé [Link et al., 2006]. Valutando il cluster 80-100 KDa, che corrisponde alle proteine del vitello, sia nel nostro gel di acrilammide (Fig. 15) che in quello pubblicato da Link e colleghi [2006] e valutandolo in comparazione con gli altri cluster proteici presenti, abbiamo potuto assumere che gli estratti in uso sono costituiti da cluster proteici più o meno omogenei. Quindi, gli eventuali effetti che avremmo potuto riscontrare dopo i trattamenti con le soluzioni di SCDSF erano da imputare principalmente ai fattori propri dell'embrione e non alle proteine del sacco vitellino.

Abbiamo quindi valutato se l'effetto antiproliferativo degli estratti ZF, riportato in letteratura in linee patologiche, si esplicasse anche su cellule staminali adulte, le hASC. Il saggio MTT alle 24 e 72 ore, eseguito testando tutti e sei gli estratti in nostro possesso, ha confermato l'effetto. La proliferazione delle hASC è inibita sia alle 24 e 72 ore dagli estratti relativi a stadi di sviluppo tardivi (19 e 24 ore dopo la fecondazione, ZF4 e ZF5 rispettivamente) e dalla soluzione mix (ZF6), raggiungendo la significatività statistica alle 72 ore.

L'indagine è proseguita a livello molecolare, andando a studiare le variazioni d'espressione di *OCT3/4*, *KLF4* e *c-Myc*, *NKX2.5*, *MEF2C* e *VEGF* dopo trattamento con le fasi efficaci (ZF6, mix delle fasi, e ZF5, stadio di *primordia*, 24 ore dopo la fecondazione). In questa fase preliminare, abbiamo saggiato gli effetti in RT-PCR quantitativa relativa e successivamente in qPCR. Osservando globalmente i dati d'espressione relativi al trattamento con ZF6 10 µg/ml abbiamo notato che dopo 24 dalla somministrazione solo i geni della staminalità presentavano variazione (Fig. 18A); viceversa, alle 72 ore dal trattamento (tempo sperimentale a cui abbiamo constatato il

significativo effetto antiproliferativo degli estratti), *MEF2C* e *VEGF* risultavano sovraespressi in concomitanza con la stabilità degli altri marcatori. Tali effetti sono stati evidenziati in RT-PCR e confermati in qPCR. La comparazione tra i dati del saggio MTT (Fig. 16) e quelli d'espressione sono coerenti in quanto i marcatori molecolari che sostengono la proliferazione (*OCT3/4* e *KLF4* o *c-Myc* nei nostri saggi) sono sottoespressi dopo 24 mentre è l'effetto di tale downregolazione visibile dopo 72 ore, tempo interpretato come fisiologico affinché i processi apoptotici portino ad una significativa e misurabile riduzione del numero di cellule.

Analogamente alla ZF6, anche l'estratto derivato dagli embrioni allo stadio di *primordia* alla concentrazione di 10 µg/ml dopo 72 ore inibiva con significatività statistica la proliferazione cellulare. L'espressione genica relativa a questo trattamento, saggiata dopo 24 ore in qPCR, non ha mostrato variazioni dell'espressione di *c-Myc*, gene correlato alla staminalità. Tuttavia, *VEGF* e *NEUROG1* risultavano fortemente sottoespressi. Inoltre, la valutazione in microscopia ottica degli effetti di questo trattamento, ha mostrato numerose cellule molto vacuolate, tipica caratteristica morfologica di cellule in apoptosi. Nonostante la stabilità dei livelli di trascritto di *c-Myc*, questi risultati ci suggeriscono comunque un effetto antiproliferativo della ZF5, dato dalla forte inibizione dei marcatori lineage specifici. Questa fase è specifica di uno stadio di sviluppo in cui le strutture corporee del pesce sono già quasi tutte definite al contrario di ZF6 che contiene i fattori di embrioni in gastrula, blastula ed in organogenesi. A livello teorico, ci attendiamo quindi che gli SCDSF contenuti in ZF5 abbiano effetti diversi a livello di singolo gene rispetto alla soluzione mix. Tenendo a mente il concetto di dinamicità dei processi biologici, il blocco della proliferazione, così come ogni processo biologico, è il risultato globale di numerose interazioni genetiche ed epigenetiche e si attua non in risposta alle variazioni di un singolo gene bensì in risposta agli equilibri che si creano tra tutti i fattori in gioco.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In questa tesi, sono stati presentati i risultati della parte svolta fino ad ora di uno studio multidisciplinare che ha coinvolto biologi, biotecnologi, medici, fisici, ingegneri e tecnici del suono. In collaborazione, abbiamo formulato le ipotesi sperimentali, progettato gli strumenti per la somministrazione del suono e il disegno sperimentale e svolto tutti gli esperimenti e relative analisi. L'obiettivo del nostro lavoro era ed è tuttora quello di ottenere una rigenerazione tissutale con l'utilizzo di protocolli sperimentali che consentano la minor manipolazione possibile del prodotto per terapia cellulare associata ad una maggiore efficienza del processo.

Abbiamo testato due tipologie di stimoli supposti essere modulatori della fisiologia cellulare, in particolare modulatori del percorso differenziativo.

Abbiamo utilizzato stimoli di natura ondulatoria e soluzioni di molecole naturali derivanti da embrioni di *D. rerio* andando a valutare se e come questi modificassero l'espressione di un pool di geni rappresentativi della condizione di staminalità e dei principali destini differenziativi nelle hASC isolate con il Lipogems, il nostro modello cellulare. Entrambi gli approcci sperimentali ci hanno fornito risultati promettenti e ci hanno suggerito come procedere a livello sperimentale.

I suoni cardiaci processati e somministrati sia come suono overlaid che come melodia, si sono dimostrati essere modulatori dell'espressione dei geni fondamentali per il commitment cardiovascolare. Oltre a replicare gli esperimenti, quest'evidenza ci ha suggerito di procedere con i trattamenti di tipo vibrazionale. Al momento stiamo valutando se, a livello di morfologia cellulare, la melodia somministrata *ad libitum* induce modificazioni sulle hASC. Passo successivo sarà quello di registrare fonocardiogrammi sia da individui sani che con cardiopatie ed utilizzare tali suoni senza nessun tipo di elaborazione, andando a valutare se le hASC sono sensibili anche a questa stimolazione e se rispondono in maniera diversa in funzione della condizione rappresentativa di fisiologicità e patogenicità.

Lo studio degli effetti degli estratti di Zebrafish è di più recente definizione. Tali estratti hanno mostrato importanti effetti antiproliferativi sia *in vitro* che *in vivo*, su linee tumorali e in pazienti affetti da epatocarcinoma non trattabile con le terapie convenzionali. Alla luce di ciò abbiamo ipotizzato che l'inibizione della proliferazione e il potenziale riprogrammatico sulle cellule tumorali dovuta al trattamento con gli estratti potesse rappresentare un potenziale stimolo prodifferenziativo sul nostro modello. Il saggio di proliferazione su hASC ha confermato il blocco proliferativo anche sul nostro modello cellulare, significativo per due estratti a determinate concentrazioni. Abbiamo quindi valutato a livello molecolare se la ridotta proliferazione potesse essere correlata a quella che si verifica durante l'esplicazione

di un percorso differenziativo. Il nostro studio si è quindi concentrato sul significato molecolare dell'effetto. Gli estratti ZF5 e 6, seppur in maniera diversa e in un set di marcatori limitato, sembrano inibire o mantenere stabile l'espressione dei marcatori di staminalità con una concomitante variazione dei marcatori di differenziamento in studio. Questi risultati, globalmente, ci suggeriscono che la nostra ipotesi sperimentale abbia a supporto basi molecolari simili a quelle che regolano i processi di differenziazione cellulare. Perciò abbiamo intenzione di approfondire lo studio, sia in termini di esperimenti che di marcatori in esame, non solo delle soluzioni di embrioni di pesce zebra antiproliferativi nel nostro modello, ma di ampliarlo anche agli altri estratti. Il fatto che la mix delle fasi (ZF6) sia risultata molto efficace, ci suggerisce infatti che i suoi effetti siano il risultato sinergico degli SCDSF presenti anche negli stadi più precoci. In questo modo potremo ottenere informazioni più approfondite sul ruolo regolatorio che hanno i fattori differenziativi delle cellule staminali di *D. rerio* nel percorso differenziativo delle hASC.

Entrambe le ricerche verranno approfondite anche con le analisi di espressione proteica e saggi funzionali specifici per i tipi di differenziamento che si stabilizzeranno nel tempo. Le variazioni dei livelli di trascritti genici, riscontrate dopo un qualsiasi tipo di perturbazione, che sia fisiologica o indotta da un trattamento, non sempre si fissano a livello funzionale. Nel nostro specifico esempio, l'upregolazione dei marcatori di commitment e differenziamento cardiovascolare non si può assumere che venga tradotta automaticamente in espressione di proteine contrattili. Non solo perché tra commitment e differenziamento c'è un amplissimo spettro di modificazioni che devono avvenire e fissarsi, ma anche perché, affinché queste avvengano, deve verificarsi un determinato equilibrio oltre soglia che provocherà effetti a catena fino alla completa esplicazione del potenziale differenziativo.

Numerose solo le indagini che andranno condotte sulle nostre tipologie di stimolo e sul nostro modello cellulare. Nonostante ciò, i dati preliminari qui presentati rappresentano un passo fondamentale per il nostro obiettivo, ovvero l'individuazione di nuove strategie differenziative atte a migliorare la terapia cellulare.

BIBLIOGRAFIA

- Acbas G, Niessen KA, Snell EH et al. 2014. Optical measurements of long-range protein vibrations. *Nat Commun.* 5:3076. doi: 10.1038/ncomms4076.
- Aggarwal S and Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 105:1815-22.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. 2002. *Molecular biology of the cell.* (4th ed). New York: Garland Science.
- Alison MR, Poulosom R, Jeffery R et al. 2000. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* 406:257.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 227: 271-278.
- Andrews PW, Damjanov I, Simon D et al. 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest.* 50:147-162.
- Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A et al. 2008. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17:909-16. doi: 10.1089/scd.2007.0197.
- Asakura A, Komaki M and Rudnicki M. 2001. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation.* 68:245-53.
- Bai L, Lennon DP, Eaton V et al. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immuneresponse and promote endogenous repair in animal models of multiplesclerosis. *Glia* 57:1192-203. doi: 10.1002/glia.20841.
- Baksh D, Song L and Tuan RS. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 8:301-16.
- Barroso-delJesus A, Romero-López C, Lucena-Aguilar G et al. 2008. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol.* 28:6609-19. doi: 10.1128/MCB.00398-08.
- Bayart E and Cohen-Haguenaer O. 2013. Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther.* 13:73-92.
- Bellavia M, Altomare R, Cacciabauda F et al. 2013. Towards an ideal source of mesenchymal stem cell isolation for possible therapeutic application in regenerative medicine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* doi: 10.5507/bp.2013.051.
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J et al. 2001. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 344:1750-7.
- Bernard-Kargar C and Ktorza A. 2001. Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes.* 50 Suppl 1:S30-5.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D et al. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-

- presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 105:2214-9.
- Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R et al. 2013. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood*. 103:2956-64.
- Bianchi F, Maioli M, Leonardi E et al. 2013. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant*. 22:2063-77. doi: 10.3727/096368912X657855.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S et al. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 19:180-92.
- Biava PM and Carluccio A. 1997. Activation of anti-oncogene p 53 produced by embryonic extracts in "vitro" tumor cells. *J. Tumor Marker Oncology*. 12:9-15.
- Biava PM, Bonsignorio D and Hoxha M. 2001. Cell proliferation curves of different human tumor lines after in vitro treatment with Zebrafish embryonic extracts. *J. Tumor Marker Onc*. 16:195-2001.
- Biava PM, Bonsignorio D, Hoxha M. 2002. Post-translational modification of the Retinoblastoma protein (pRb) induced by in vitro administration of Zebrafish embryonic extracts on a human kidney adenocarcinoma cell line. *J. Tumor Marker Oncology*. 17:59-64.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. 2001. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 105:829-41.
- Bonaros N, Rauf R, Schachner T et al. 2008. Enhanced cell therapy for ischemic heart disease. *Transplantation*. 86:1151-60. doi: 10.1097/TP.0b013e3181880f9e.
- Bonfield TL, Nolan Koloze MT, Lennon DP et al. 2010. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *J Inflamm (Lond)* 7:51. doi: 10.1186/1476-9255-7-51
- Boveri T. 1892. Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei *Ascaris megalcephala*, nebst Bemerkungen zur Entwicklungsgeschichte der Nematoden. *Sitzungsber Ges Morphol Physiol*. 8:114-25.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF et al. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 122:947-956.
- Brown S, Teo A, Pauklin S et al. 2011. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem Cells* 29:1176-85.
- Buckingham M, Meilhac S and Zaffran S. 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. 6:826-35.
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J et al. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol*. 11:74. doi: 10.1186/1471-2199-11-74.
- Calder A, Roth-Albin I, Bhatia S. 2013. Lengthened G1 phase indicates differentiation status in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 22:279-95. doi: 10.1089/scd.2012.0168.

- Card DA, Hebbbar PB, Li L et al. 2008. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 28:6426-38. doi: 10.1128/MCB.00359-08.
- Cartwright P, McLean C, Sheppard A et al. 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development.* 132:885-96
- Cedar H and Bergman Y. 2008. Epigenetic silencing during early lineage commitment. In *StemBook*, www.stembook.org. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.
- Chen L and Daley GQ. 2008. Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet.* 17:R23-7. doi: 10.1093/hmg/ddn050.
- Cohnheim J. 1877. *Vorlesungen über allgemeine Pathologie. Ein Handbuch für Aerzte und Studierende* (volume 1). Berlin: August Hirschwald. pp. 634-656.
- Cook MM, Futrega K, Osiecki M et al. 2012. Micromarrows 3D co-culture of haematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells. *TissueEng PartCMethods* 18:319-28. doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0159.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E et al. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 107:367-72.
- Cortés F, Deschaseaux F, Uchida N et al. 1999. HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues. *Blood.* 93:826-37.
- Cross SE, Jin YS, Rao J et al. 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol.* 2:780-3. doi: 10.1038/nnano.2007.388.
- Cross SE, Jin YS, Tondre J et al. 2008. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology.* 19:384003. doi: 10.1088/0957-4484/19/38/384003.
- Cucina A, Biava PM, D'Anselmi F et al. 2006. Zebrafish embryo proteins induce apoptosis in human colon cancer cells (Caco2). *Apoptosis* 11:1617-28.
- D'Anselmi F, Cucina A, Biava PM et al. 2011. Zebrafish stem cell differentiation stage factors suppress Bcl-xL release and enhance 5-Fu-mediated apoptosis in colon cancer cells. *Curr Pharm Biotechnol.* 12:261-7.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P et al. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44:1928-42.
- De Falco G, Comes F, Simone C. 2006. pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription. *Oncogene.* 25:5244-9.
- De Leo G, Ginelli E and Fasano S. 2009. *Biologia e Genetica*. Napoli: EdiSes.
- De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A et al. 2012. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 12:574-91.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A et al. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 174:101-9.
- Deng W, Han Q, Liao L et al. 2005. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice. *DNA Cell Biol.* 24:458-63.

- Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. 2013. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol.* 4:201.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M et al. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 99:3838-43.
- Domínguez-Bendala J, Inverardi L and Ricordi C. 2011. Stem cell-derived islet cells for transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 16:76-82. doi: 10.1097/MOT.0b013e32834252b5
- Domínguez-Bendala J, Lanzoni G, Inverardi L et al. 2012. Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Transl Med.* 1:59-63. doi: 10.5966/sctm.2011-0017.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8:315-7.
- Duester G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell.* 134:921-31. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.002.
- Eglitis MA and Mezey E. 1997. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4080-5.
- Einstein A and Infeld L. 1971. *The Evolution of Physics.* CUP Archive.
- Erceg S, Laínez S, Ronaghi M et al. 2008. Differentiation of human embryonic stem cells to regional specific neural precursors in chemically defined medium conditions. *PLoS One.* 3:e2122. doi: 10.1371/journal.pone.0002122.
- Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM et al. 2002. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:763-9.
- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z et al. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24:150-4.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK and Gerasimov UV. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 20:263-72.
- Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG et al. 1982. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol.* 10:217-27.
- Gazit Z, Pelled G, Sheyn D et al. 2010. Chapter 17 - Mesenchymal stem cells. In: Atala A, Lanza R, Thomson A, Nerem R (eds): *Principles of Regenerative Medicine*, 2nd ed. London-Burlington-San Diego: Elsevier Academic Press.
- Gilbert SF. 1996. *Biologia dello sviluppo*, seconda edizione italiana. Bologna: Zanichelli.
- Götherström C, Ringdén O, Tammik C et al. 2004. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol.* 190:239-45.
- Greve TS, Judson RL and Blalock R. 2013. microRNA control of mouse and human pluripotent stem cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 29:213-39. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512

- Haeckel E. 1877. *Anthropogenie*, 3rd edn. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Halvorsen YD, Bond A, Sen A et al. 2001. Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism*. 50:407-13.
- Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R et al. 2010. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. 10:1496-500. doi: 10.1016/j.intimp.2010.06.019.
- Huang GT, Gronthos S and Shi S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 88:792-806. doi: 10.1177/0022034509340867.
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D et al. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 6:88-95.
- Javazon EH, Beggs KJ and Flake AW. 2004. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 32:414-25.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T et al. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 30:896-904.
- Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA et al. 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol*. 94:253-62.
- Kageyama R, Yoshiura S, Masamizu Y et al. 2007. Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 72:451-7. doi: 10.1101/sqb.2007.72.012.
- Katz AJ and Mericli AF. 2010. Chapter 21 - Stem cells derived from fat. In: Atala A, Lanza R, Thomson A, Nerem R (eds): *Principles of Regenerative Medicine*, 2nd ed. London-Burlington-San Diego: Elsevier Academic Press.
- Kim JH, Lee YT, Hong JM et al. 2013. Suppression of in vitro murine T cell proliferation by human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is dependent mainly on cyclooxygenase-2 expression. *Anat Cell Biol*. 46:262-71. doi: 10.5115/acb.2013.46.4.262.
- Kolf CM, Cho E and Tuan RS. 2007. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*. 9:204.
- Krampera M, Marconi S, Pasini A et al. 2007. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*. 40:382-90.
- Kraus A, Woon C, Raghavan S et al. 2013. Co-culture of human adipose derived stem cells with tenocytes increases proliferation and induces differentiation into a tenogenic lineage. *Plast Reconstr Surg*. 132:754e-766e. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182a48b46.

- Lanzoni G. 2010. Cellule Staminali Mesenchimali umane da molteplici tessuti adulti: caratteristiche condivise e tessuto-specificità. Tesi di dottorato.
http://amsdottorato.unibo.it/2768/2/Lanzoni_Giacomo_Tesi.pdf
- Lara-Ramírez R, Zieger E and Schubert M. 2013. Retinoic acid signaling in spinal cord development. *Int J Biochem Cell Biol.* 45:1302-13. doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.002.
- Lau E, Lee WD, Li J et al. 2011. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteogenic differentiation of rat mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res.* 29:1075-80. doi: 10.1002/jor.21334.
- Lee JH and Kemp DM. 2006. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:882-8.
- Legge 19 febbraio 2004, n.40 - Norme in materia di procreazione medicalmente assistita, art. 13.
- Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED et al. 2005. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23:215-221.
- Link V, Schevchenko A e Heisenberg CP. 2006. Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Dev Biol.* 6:1. doi: 10.1186/1471-213X-6-1.
- Liu SH, Huo YE, Yin BY et al. 2013. Ischemic postconditioning may increase serum fetuin-A level in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing percutaneous intervention. *Clin Lab.* 59:59-64.
- Liu Y, Jiang X, Yu MK et al. 2010. Switching from bone marrow-derived neurons to epithelial cells through dedifferentiation and translineage redifferentiation. *Cell Biol Int.* 34:1075-83. doi: 10.1042/CBI20100516.
- Livraghi T, Meloni F, Frosi A et al. 2005. Treatment with stem cell differentiation stage factors of intermediate-advanced hepatocellular carcinoma: an open randomized clinical trial. *Oncol Res.* 15:399-408.
- Lodish H, Berk A, Zipursky L et al. 2000. *Molecular cell biology.* 4th ed. New York: W. H. Freeman.
- Loh YH, Wu Q, Chew JL et al. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 38:431-40
- Lohman TG and Going SB. 1993. Multicomponent models in body composition research: opportunities and pitfalls. *Basic Life Sci.* 60:53-8.
- Maehle AH. 2011. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes Rec R Soc Lond.* 65:359-78.
- Maienschein J. 2002. Stem Cell Research: a target article collection Part II - What's in a name: Embryos, Clones and Stem Cells. *Am J Bioeth.* 2:12-9, 30.
- Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S et al. 2012. Radiofrequency energy loop primes cardiac, neuronal, and skeletal muscle differentiation in mouse embryonic stem cells: a new tool

- for improving tissue regeneration. *Cell Transplant.* 21:1225-33. doi: 10.3727/096368911X600966.
- Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S et al. 2013a. Radio electric conveyed fields directly reprogram human dermal skin fibroblasts toward cardiac, neuronal, and skeletal muscle-like lineages. *Cell Transplant.* 22:1227-35. doi: 10.3727/096368912X657297
- Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S et al. 2013b. Radio electric asymmetric conveyed fields and human adipose-derived stem cells obtained with a non-enzymatic method and device: a novel approach to multipotency. *Cell Transplant.* doi: 10.3727/096368913X672037.
- Maioli M, Santaniello S, Montella A et al. 2010. Hyaluronan esters drive Smad gene expression and signaling enhancing cardiogenesis in mouse embryonic and human mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 5:e15151. doi: 10.1371/journal.pone.0015151.
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D et al. 2003. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 10:228-41.
- Marshall CJ, Moore RL, Thorogood P et al. 1999. Detailed characterization of the human aorta-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer. *Dev Dyn.* 215:139-47.
- Marson A, Levine SS, Cole MF et al. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell.* 134:521-33. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.020.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:7634-8.
- Mencuccini C and Silvestrini V. 2010. *Fisica II.* Napoli: Liguori Editore,
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G et al. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 290:1779-82.
- Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB et al. 2008. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* 13:122-135
- Militapov S and Wolf D. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 114:185-99. doi: 10.1007/10_2008_45.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M et al. 2002. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 109:199-209; discussion 210-1.
- Morrison SJ and Weissman IL. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolable by phenotype. *Immunity.* 1:661-73.
- Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ et al. 2011. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell.* 147:565-76.
- Nauta AJ and Fibbe WE. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 110:3499-506.
- Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N et al. 2001. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development.* 128:1019-31.
-

- Odorico JS, Kaufman DS and Thomson JA. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 19:193-204
- Orbay H, Tobita M and Mizuno H. 2012. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int*. doi: 10.1155/2012/461718
- Ozawa CR, Springer ML and Blau HM. 2000. Ex vivo gene therapy using myoblast and regulatable retroviral vectors. In N.S. Templeton and D.D. Lasic, eds. *Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 61-80.
- Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P et al. 2001. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature*. 411:42-3.
- Palmer TD, Takahashi J and Gage FH. 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 8:389-404.
- Pappenheim A. 1896. Ueber Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten. *Virchows Arch Pathol Anat*. 145:587-643.
- Pappenheim A. 1907. Zwei Fälle akuter grosslymphozytärer Leukämie. *Fol Haematol*. 4:301-308.
- Park HY, Noh EH, Chung HM et al. 2012. Efficient generation of virus-free iPS cells using liposomal magnetofection. *PLoS One*. 7:e45812. doi: 10.1371/journal.pone.0045812
- Parolini O, Alviano F, Bagnara GP et al., 2008. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 26:300-11.
- Patel SA, Sherman L, Munoz J et al. 2008. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 56:1-8. doi: 10.1007/s00005-008-0001-x.
- Pauklin S and Vallier L. 2013. The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell*. 155:135-47. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.031.
- Pelling AE, Sehati S, Gralla EB et al. 2004. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 305:1147-50.
- Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ et al. 2002. Adult stem cell plasticity. *J Pathol*. 197:441-56.
- Prescott LM, Harley JP and Kleyn DA. 2008. *Microbiology*. 7th ed. New York: MacGraw-Hill.
- Quirici N, Soligo D, Bossolasco P et al. 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 30:783-91.
- Rajapakse I, Perlman MD, Scalzo D et al. 2009. The emergence of lineage-specific chromosomal topologies from coordinate gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:6679-84. doi: 10.1073/pnas.0900986106.
- Ramlho-Santos M and Willenbring H. 2007. On the origin of the term "Stem Cell". *Cell Stem Cell*. 1:35-8.
- Ren G, Su J, Zhang L et al. 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 27:1954-62. doi: 10.1002/stem.118.

- Robey PG. 2000. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest.* 105:1489-91.
- Rubin CT, Capilla E, Luu YK et al. 2007. Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:17879-84
- Sachs PC, Francis MP, Zhao M et al. 2012. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res.* 349:505-15. doi: 10.1007/s00441-012-1423-7.
- Safford KM, Hicok KC, Safford SD et al. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294:371-9
- Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K et al. 2003. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res.* 287:289-300.
- Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D et al. 2001. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem.* 81:312-9.
- Seo MJ, Suh SY, Bae YC et al. 2005. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 328:258-64.
- Sharon N, Mor I, Golan-lev T et al. 2011. Molecular and functional characterizations of gastrula organizer cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 29:600-8. doi: 10.1002/stem.621.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD et al. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells.* 24:74-85.
- Spemann H and Mangold H. 2001. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int J Dev Biol.* 45: 13-38.
- Srivastava D. 2006. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell.* 126:1037-48.
- Stanko P, Kaiserova K, Altanerova V et al. 2013. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* doi: 10.5507/bp.2013.078.
- Stanko P, Kaiserova K, Altanerova V et al. 2013. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* doi: 10.5507/bp.2013.078.
- Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A et al. 2012. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 21:2724-52. doi: 10.1089/scd.2011.0722.
- Sun X, Fu X, Han Wet al. 2011. Dedifferentiation of human terminally differentiating keratinocytes into their precursor cells induced by basic fibroblast growth factor. *Biol*

- PharmBull. 34:1037-45.
- Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V et al. 2011. Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. PLoS ONE 6:e19354.
- Szabo E, Rampalli S, Risueño RM et al. 2010. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. Nature. 468:521-6. doi: 10.1038/nature09591
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc. 2:3081-9.
- Takahashi K and Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 126:663-76.
- Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R et al. 2007. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. Toxicol In Vitro. 21:324-9.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 282:1145-7. Erratum in: Science. 282:1827.
- Timper K, Seboek D, Eberhardt M et al. 2006. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. Biochem Biophys Res Commun. 34:1135-40
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ et al. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat Cell Biol. 3:778-84.
- Tremolada C, Palmieri G and Ricordi C. 2010. Adipocyte transplantation and stem cells: plastic surgery meets regenerative medicine. Cell Transplant. 19:1217-23. doi: 10.3727/096368910X507187
- Trounson A, Thakar RG, Lomax G et al. 2011 Clinical trials for stem cell therapies. BMC Medicine. 9:52.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S et al. 2003. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. Stem Cells. 21:681-93
- Ullah M, Stich S, Notter M et al. 2013. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes. Differentiation. 85:78-90. doi: 10.1016/j.diff.2013.02.001
- Ventura C, Cantoni S, Bianchi F et al. 2007. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. J Biol Chem. 282:14243-52.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP et al. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature. 463:1035-41. doi: 10.1038/nature08797.
- Wang J, Zhao HP, Lin G et al. 2005. In vitro hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells induced by coculture with human bone marrow stromal cells and low dose cytokines. Cell Biol Int. 26:654-61.

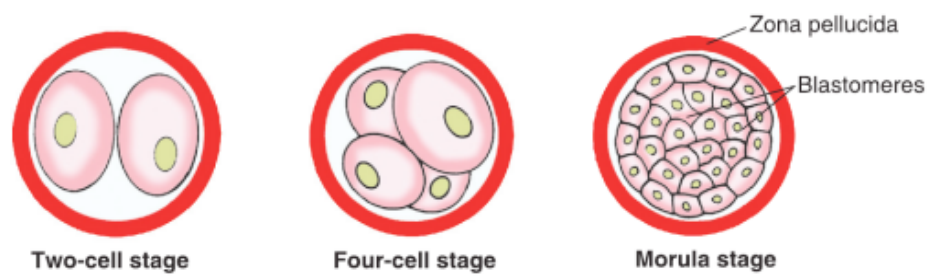
- Wang L, Mondal D, La Russa VF et al. 2002. Suppression of clonogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by HIV type 1: putative role of HIV type 1 tat protein and inflammatory cytokines. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18:917-31.
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P et al. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 121:368-74.
- Yousefi F, Ebtekar M, Soleimani M et al. 2013. Comparison of in vivo immunomodulatory effects of intravenous and intraperitoneal administration of adipose-tissue mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Int Immunopharmacol*. 17:608-16. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.016.
- Yu S, Levi L, Siegel R et al. 2012. Retinoic acid induces neurogenesis by activating both retinoic acid receptors (RARs) and peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ). *J Biol Chem*. 287:42195-205. doi: 10.1074/jbc.M112.410381.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318:1917-20.
- Zhang W, Ge W, Li C et al. 2004. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 13:263-71.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13:4279-95.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7:211-28.

FIGURE E TABELLE

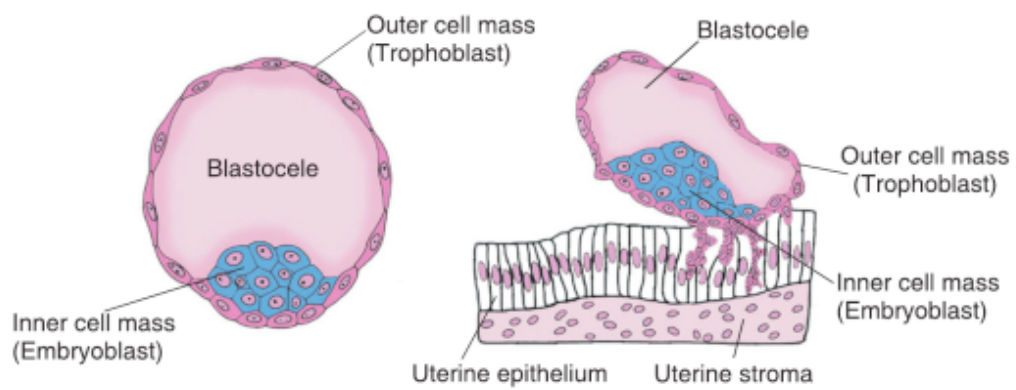
Figure e legende presenti lungo la tesi

Figura 1.

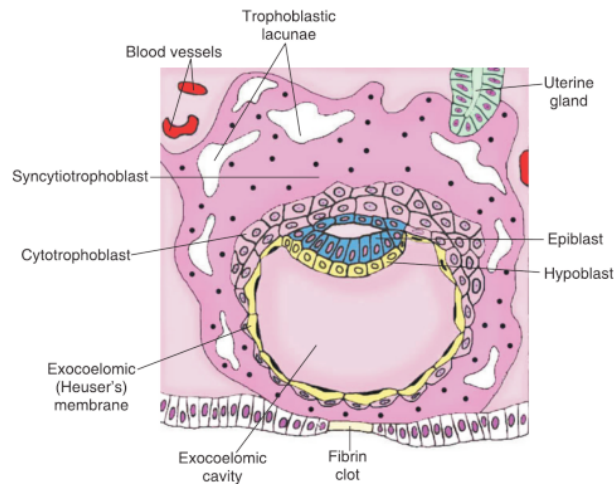
A



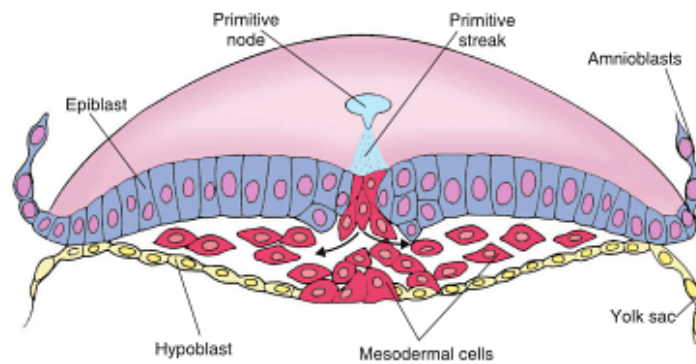
B



C



D



Lo sviluppo embrionale di *H. sapiens*.

A. La formazione della morula.

B. La blastocisti precoce e l'annidamento *in utero*.

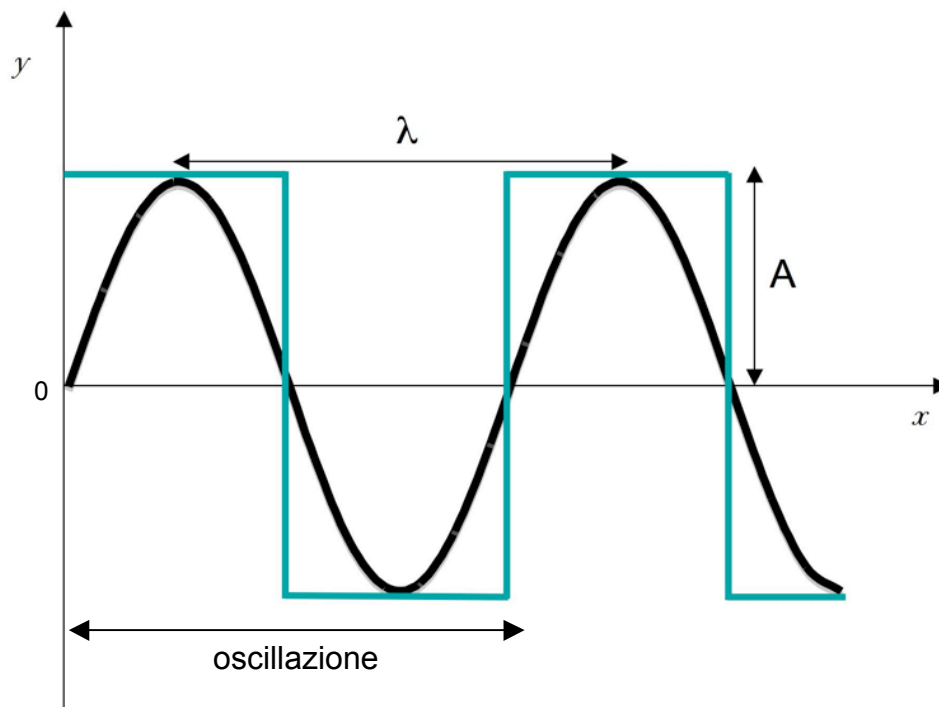
C. La blastocisti tardiva, annidata nella mucosa uterina.

D. I tre foglietti germinativi. Le frecce indicano la migrazione di blastomeri.

Figure tratte da:

Kumar R. Textbook of human embryology. 2008. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt Ltd.

Figura 2.



Rappresentazione schematica della funzione di un'onda e relativi parametri.

In nero, l'onda sinusoidale.

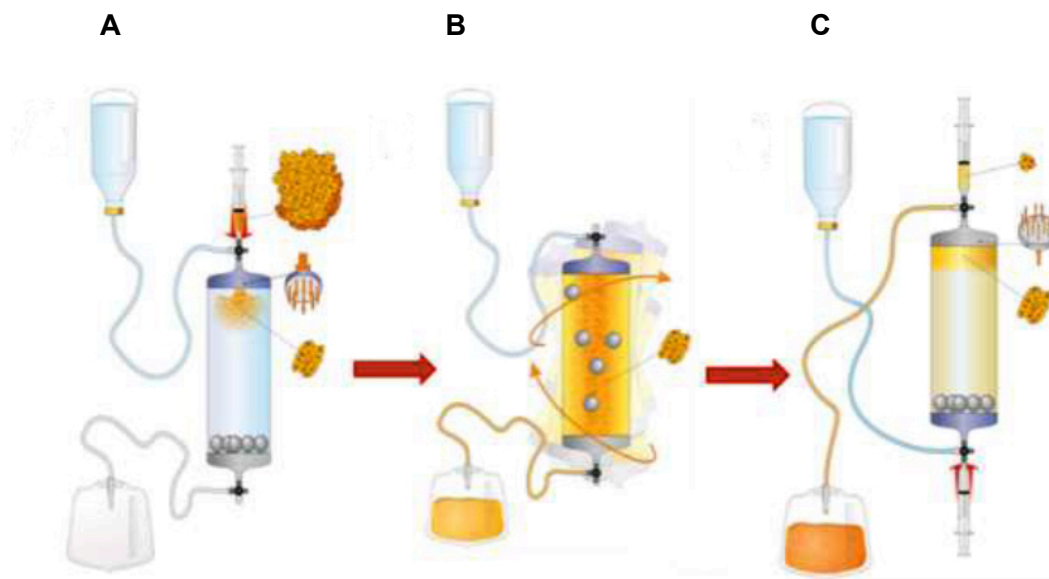
In celeste, l'onda quadratica.

Facendo riferimento alla sezione "La somministrazione di onde semplici: il generatore di oscillazioni meccaniche" in "Materiali e Metodi", il duty cycle di entrambe le onde della figura è del 50 % in quanto la parte di onda positiva è la metà dell'oscillazione completa.

λ , lunghezza d'onda.

A , ampiezza.

Figura 3.



Schematizzazione del Lipogems e del suo funzionamento.

A. Il lipoaspirato viene immesso nel dispositivo tramite la siringa in alto. La presenza del filtro, collocato nella parte superiore del cilindro (in blu) riduce le dimensioni degli aggregati di tessuto durante l'immissione. Contemporaneamente, viene introdotta nel dispositivo anche la soluzione salina (in alto a sinistra).

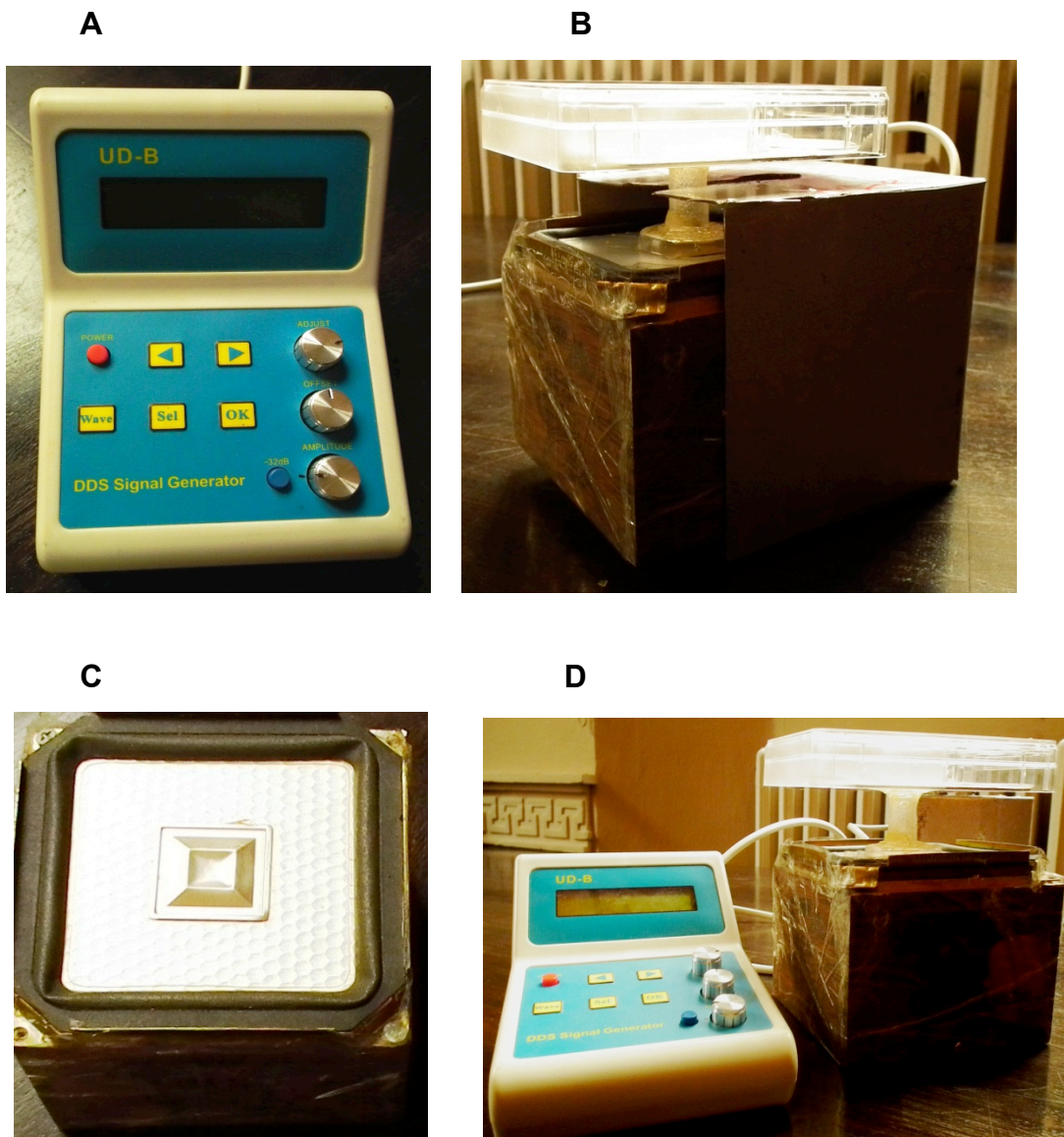
B. Il dispositivo viene scosso e le biglie all'interno riducono ulteriormente le dimensioni dei cluster. All'interno del dispositivo si crea l'emulsione oleosa che viene poi convogliata nella sacca di scarto (in basso a sinistra).

C. Il dispositivo viene capovolto e il secondo filtro è ora collocato nella parte superiore del cilindro (in grigio). Il prodotto di Lipogems è quindi aspirato, mediante una nuova siringa (in alto), ed è pronto per l'utilizzo.

Figura tratta da:

Bianchi F, Maioli M, Leonardi E et al. 2013. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant.* 22:2063-77. doi: 10.3727/096368912X657855.

Figura 4.



Il generatore d'onda meccanica utilizzato per somministrare le onde semplici alle hASC in coltura.

A. Il generatore di frequenze, dotato di pannello di regolazione del volume (amplitude) e del tipo di onda (wave).

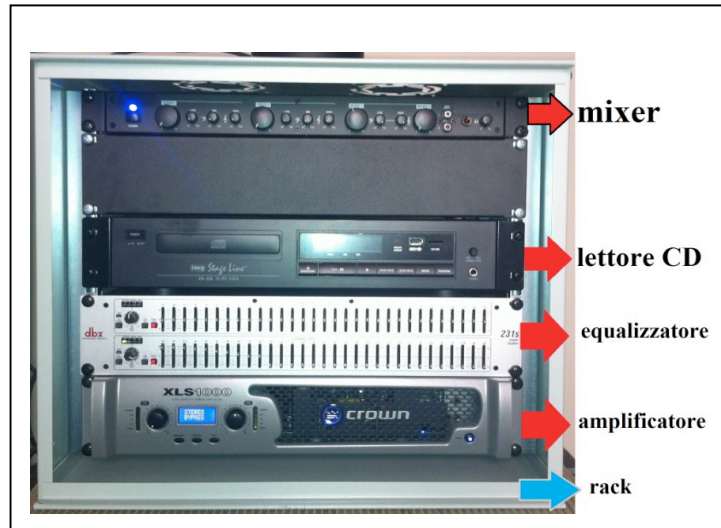
B. L'amplificatore e trasduttore, inseriti nel box d'isolamento, con la piastra di coltura posta sul connettore plastico.

C. Il trasduttore, costituito dalla membrana dell'altoparlante, dove viene poggiata la piastra di coltura.

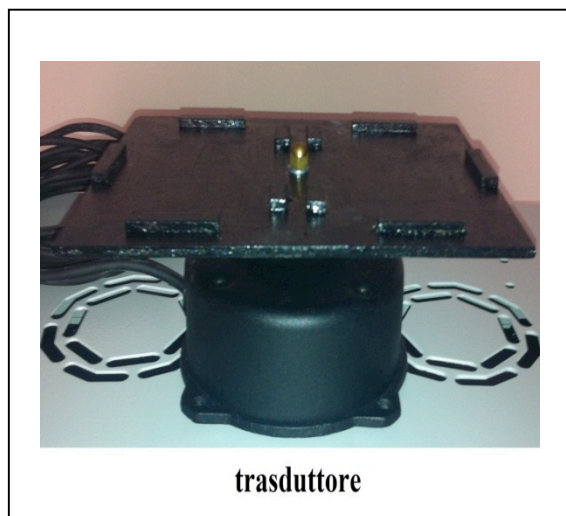
D. Il sistema di somministrazione completo.

Figura 5.

A



B

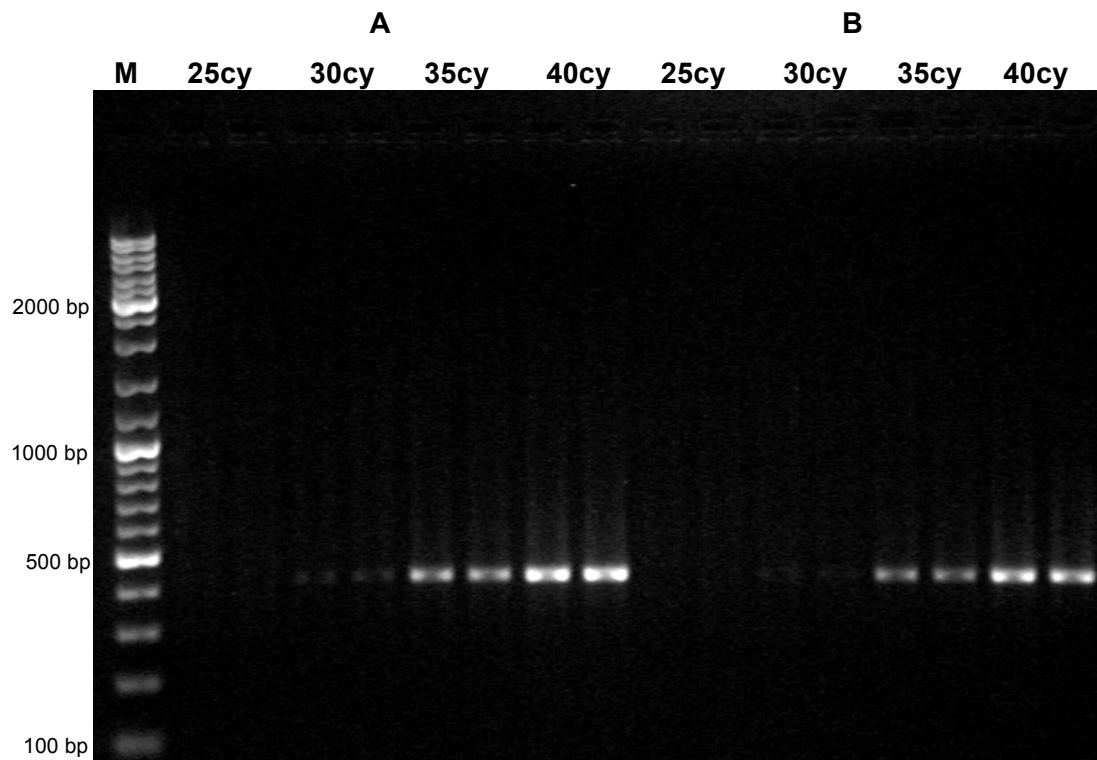


Il Cell Exciter.

A. Componenti dell'apparato di regolazione: il mixer, per regolare il volume/intensità e il bilanciamento del suono in uscita; il lettore CD; l'equalizzatore per filtrare e regolare i livelli che compongono il suono; l'amplificatore, che aumenta il segnale equalizzato.

B. Il trasduttore, ovvero l'apparato che converte il segnale elettrico, equalizzato ed amplificato, in vibrazioni. Sul piano di legno, opportunamente verniciato per non assorbire l'umidità, verranno poste le piastre di coltura all'interno dell'incubatore.

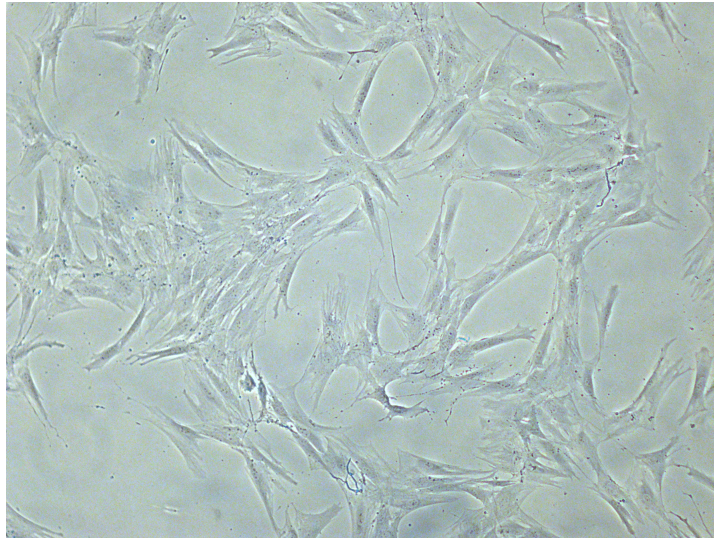
Figura 6.



Gel d'agarosio che esemplifica l'analisi della cinetica di reazione di una coppia di primers in RT-PCR, relativo all'amplificazione di una regione di 418 paia di basi (bp) del gene *NKX2.5*. Test eseguito a 25, 30, 35 e 40 cicli. Ogni punto sperimentale è stato fatto in doppio tecnico utilizzando cDNA da hASC da due donatori diversi (A e B). Per questi primers il numero di cicli ottimale è 35.

M, marker GeneRuler. cy, numero di cicli. A sinistra, la lunghezza in bp di alcune bande del marker.

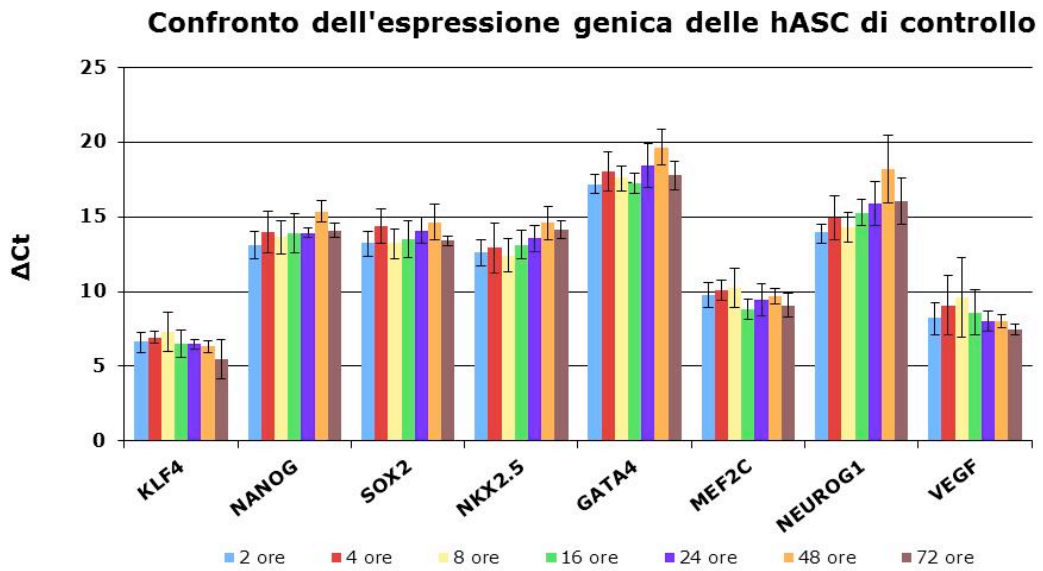
Figura 7.



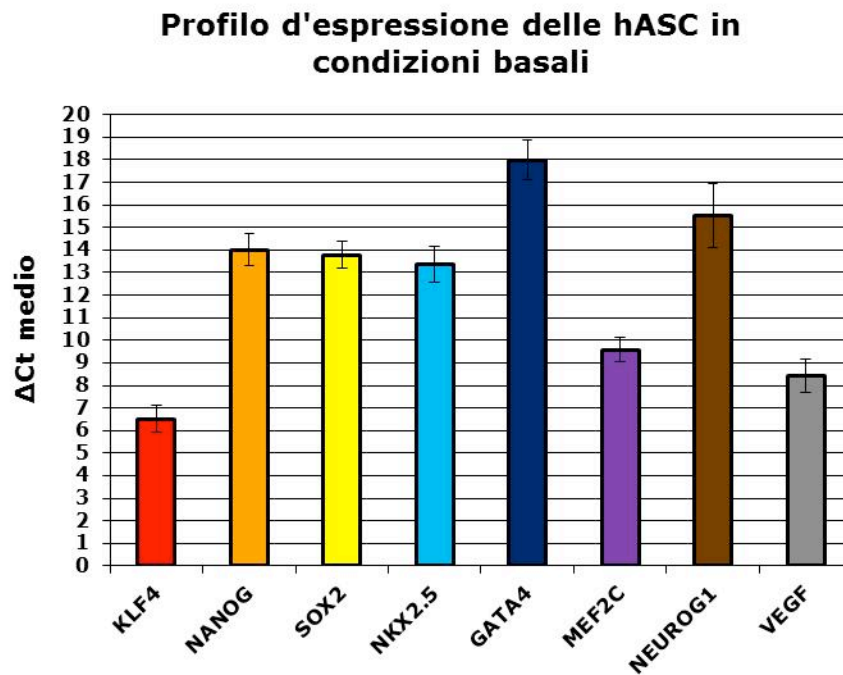
hASC isolate con il Lipogems in coltura.

Figura 8.

A



B



Analisi dell'espressione genica in qPCR condotta sulle colture di controllo relative agli esperimenti con l'onda complessa.

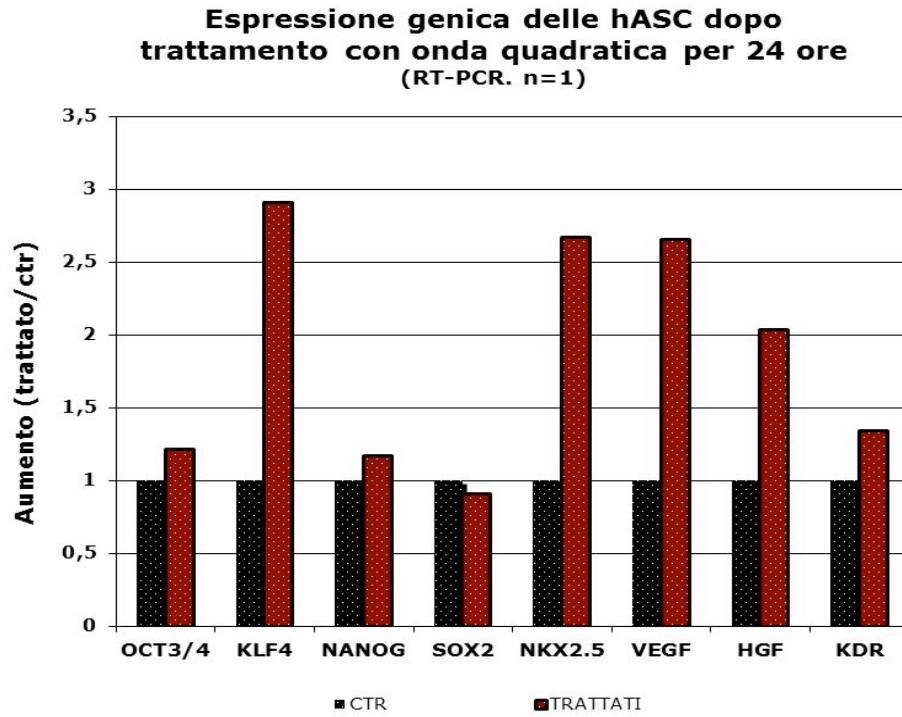
In ascissa i geni in studio e in ordinata i livelli d'espressione, espressi come differenza di cicli (ΔCt) tra il gene d'interesse e il gene di riferimento (*GAPDH*), con relative deviazioni standard (DS). L'altezza degli istogrammi è inversamente proporzionale all'entità di espressione del gene d'interesse rispetto al gene di riferimento.

A. Espressione di ogni gene ai 7 tempi sperimentali. Per i dati relativi ai controlli degli esperimenti a 2, 4, 8 e 16 ore, ogni istogramma è la media di 4 esperimenti indipendenti, mentre per le 24, 48 e 72 ore ogni istogramma è la media di 3 esperimenti indipendenti.

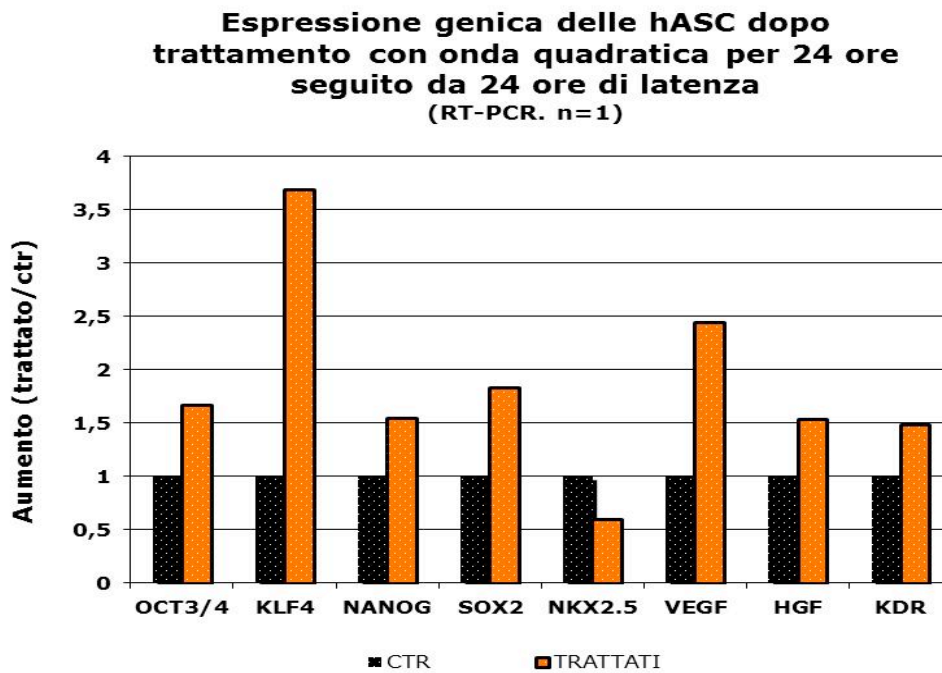
B. Profilo d'espressione delle hASC in condizioni basali. Gli istogrammi dei geni rappresentano la media dei ΔCt relativi ai 7 tempi sperimentali.

Figura 9.

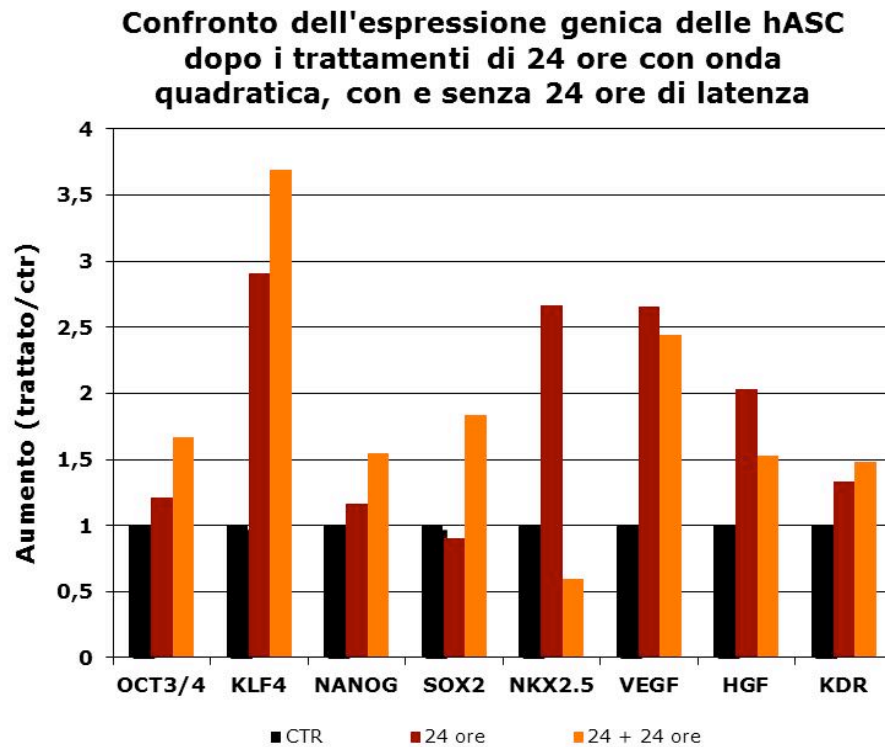
A



B



C



L'espressione genica delle hASC dopo trattamenti con onde quadrate alla frequenza di 0.55 HZ, saggiata in RT-PCR quantitativa relativa.

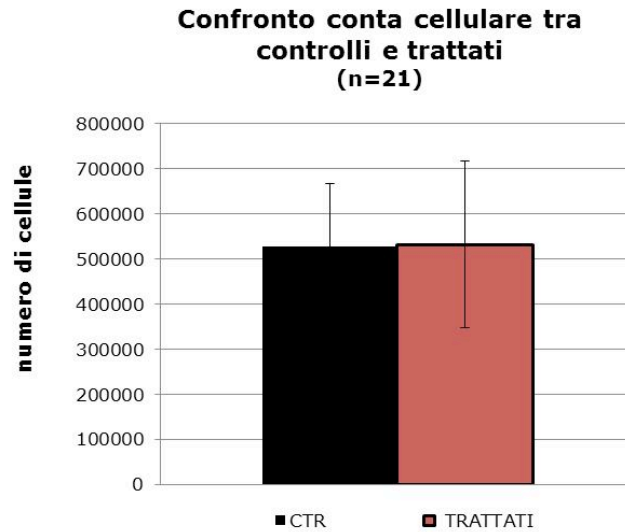
A. Espressione dopo 24 ore di trattamento con onda quadratica (n=1).

B. Espressione dopo 24 ore di trattamento con onda quadratica seguite da 24 ore di latenza prima dell'estrazione dell'RNA (n=1).

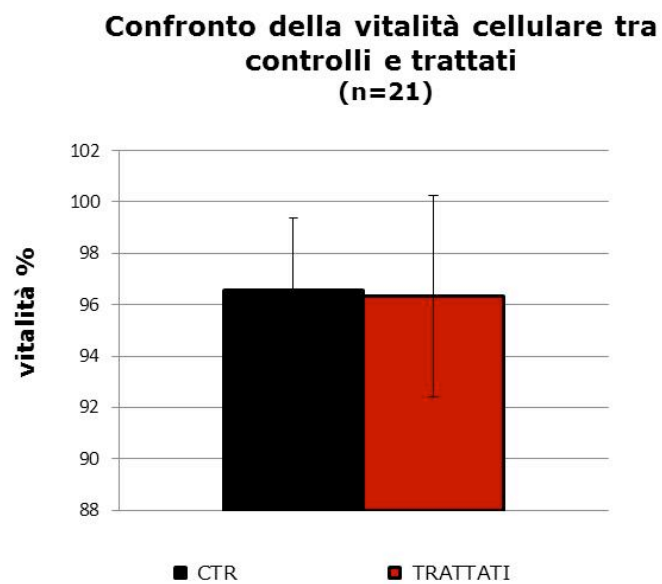
C. Confronto tra l'espressione genica dopo 24 ore di trattamento con e senza periodo di latenza.

Figura 10.

A



B



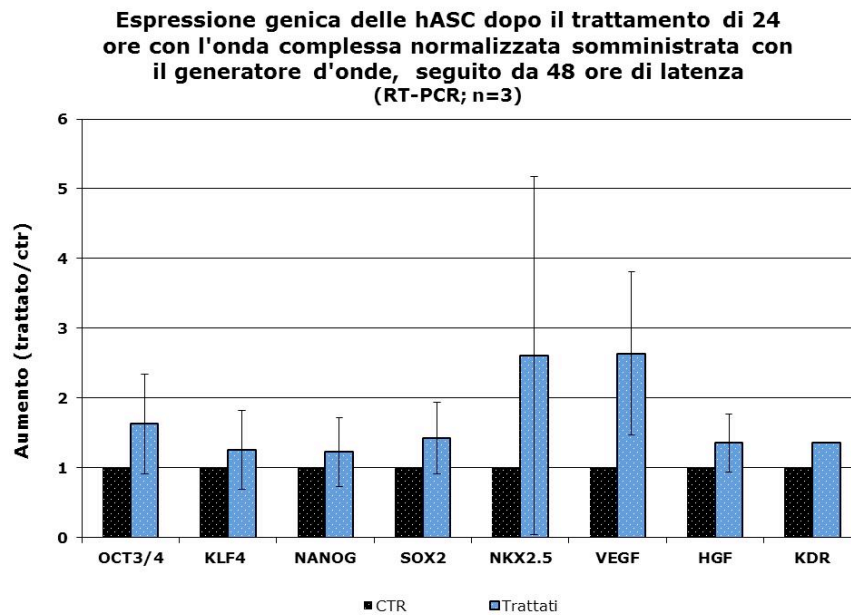
Effetti su conta cellulare e vitalità dei trattamenti con le onde complesse.

A. Conta cellulare di controlli e trattati e relative DS.

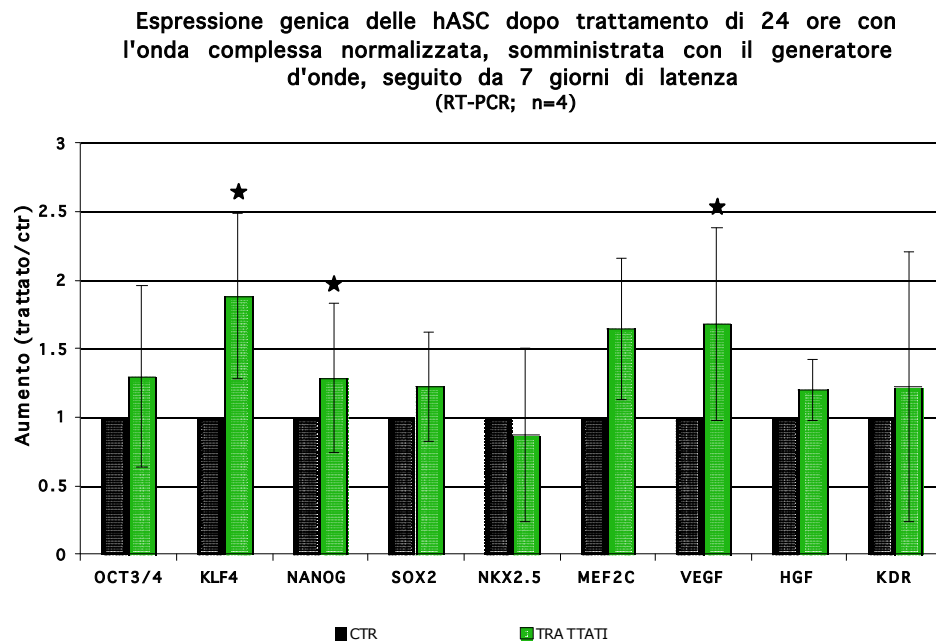
B. Vitalità cellulare di controlli e trattati e relative DS.

Figura 11.

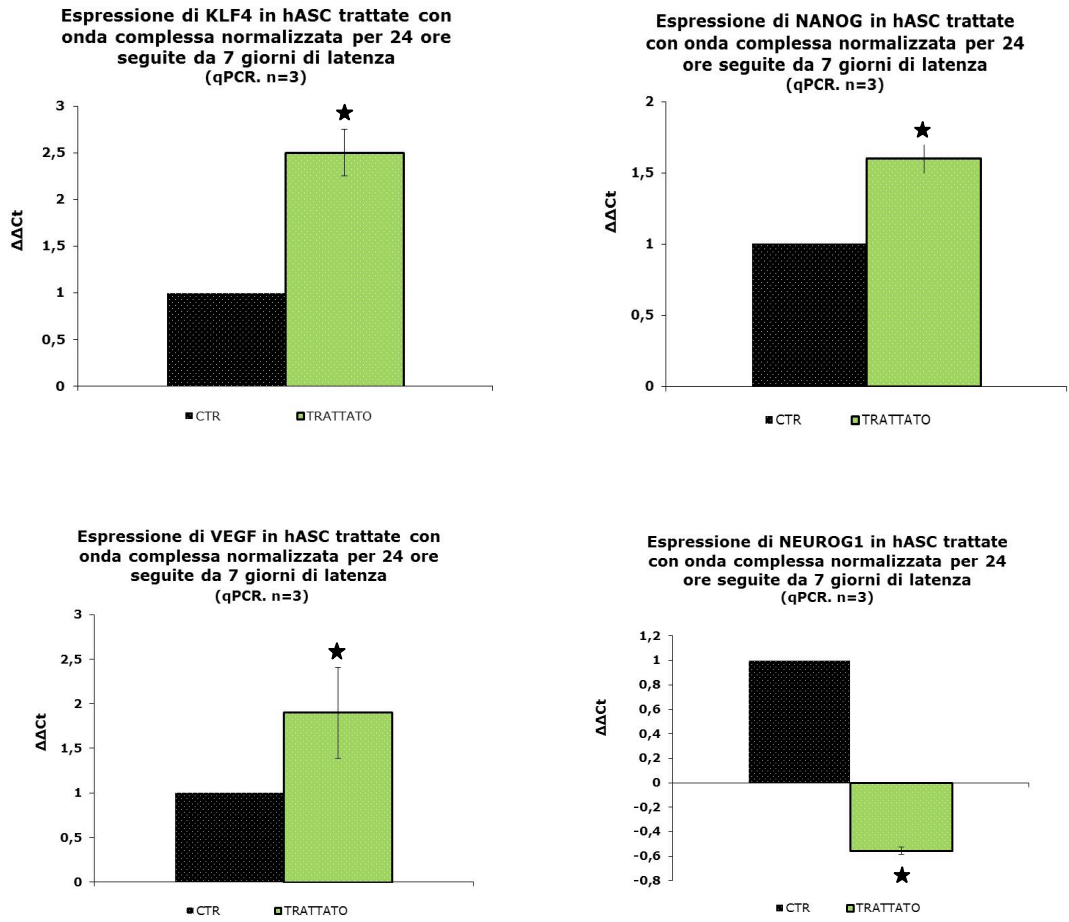
A



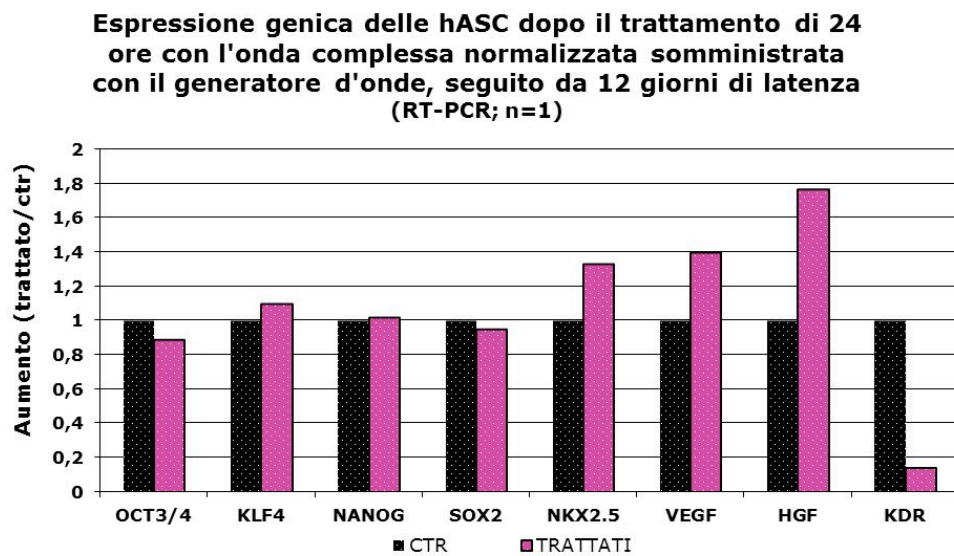
B



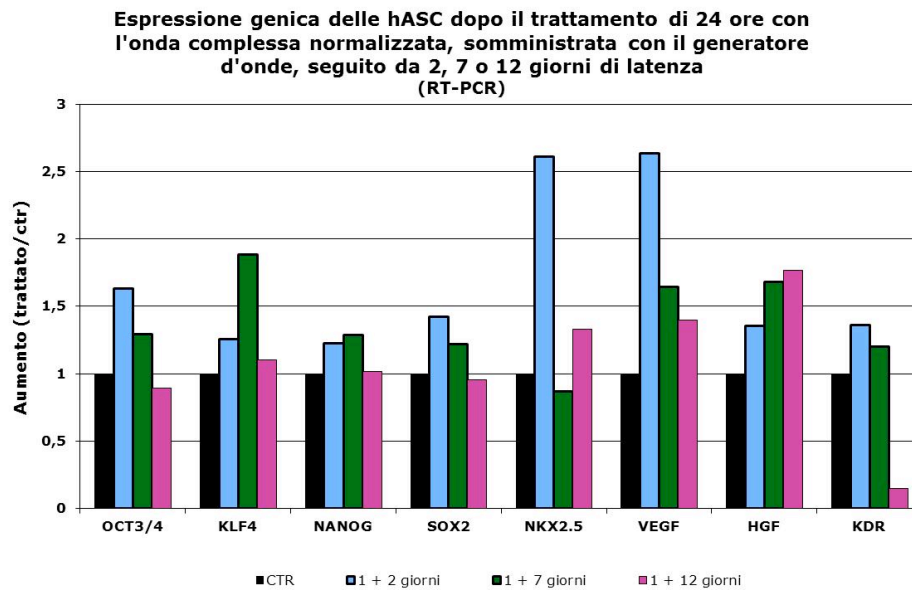
C



D



E



L'espressione genica delle hASC sottoposte a trattamento di 24 ore con l'onda complessa normalizzata seguita da diversi tempi di latenza utilizzando il generatore di onde meccaniche.

A. Espressione genica analizzata in RT-PCR quantitativa relativa dopo trattamento di 24 ore seguito da 48 ore di latenza (n=3).

B. Espressione genica analizzata in RT-PCR quantitativa relativa dopo trattamento di 24 ore seguito da 7 giorni di latenza (n=4).

C. Espressione genica analizzata in qPCR dopo trattamento di 24 ore seguito da 7 giorni di latenza (n=3).

D. Espressione genica analizzata in RT-PCR quantitativa relativa dopo trattamento di 24 ore seguito da 12 giorni di latenza (n=1).

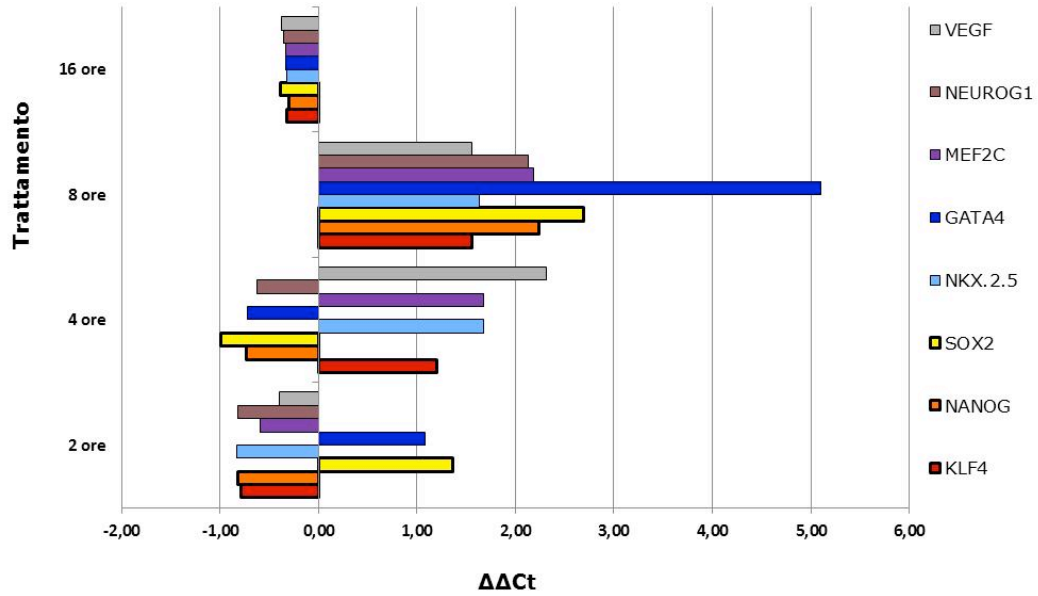
E. Confronto degli effetti dei tre tempi di latenza sulle hASC trattate per 24 ore.

★ Significatività statistica, $p < 0.05$

Figura 12.

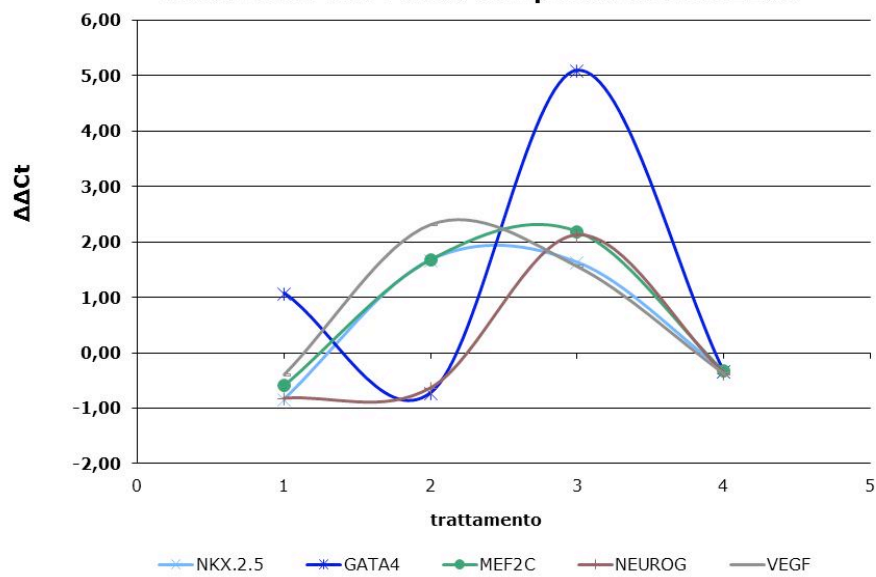
A

Andamento dell'espressione genica delle hASC dopo 2, 4, 8 e 16 ore di trattamento con l'onda complessa normalizzata mediante il generatore d'onde meccaniche (qPCR. n=1)



B

Oscillazione dell'espressione dei marcatori di differenziamento in funzione della durata dei trattamenti con l'onda complessa normalizzata



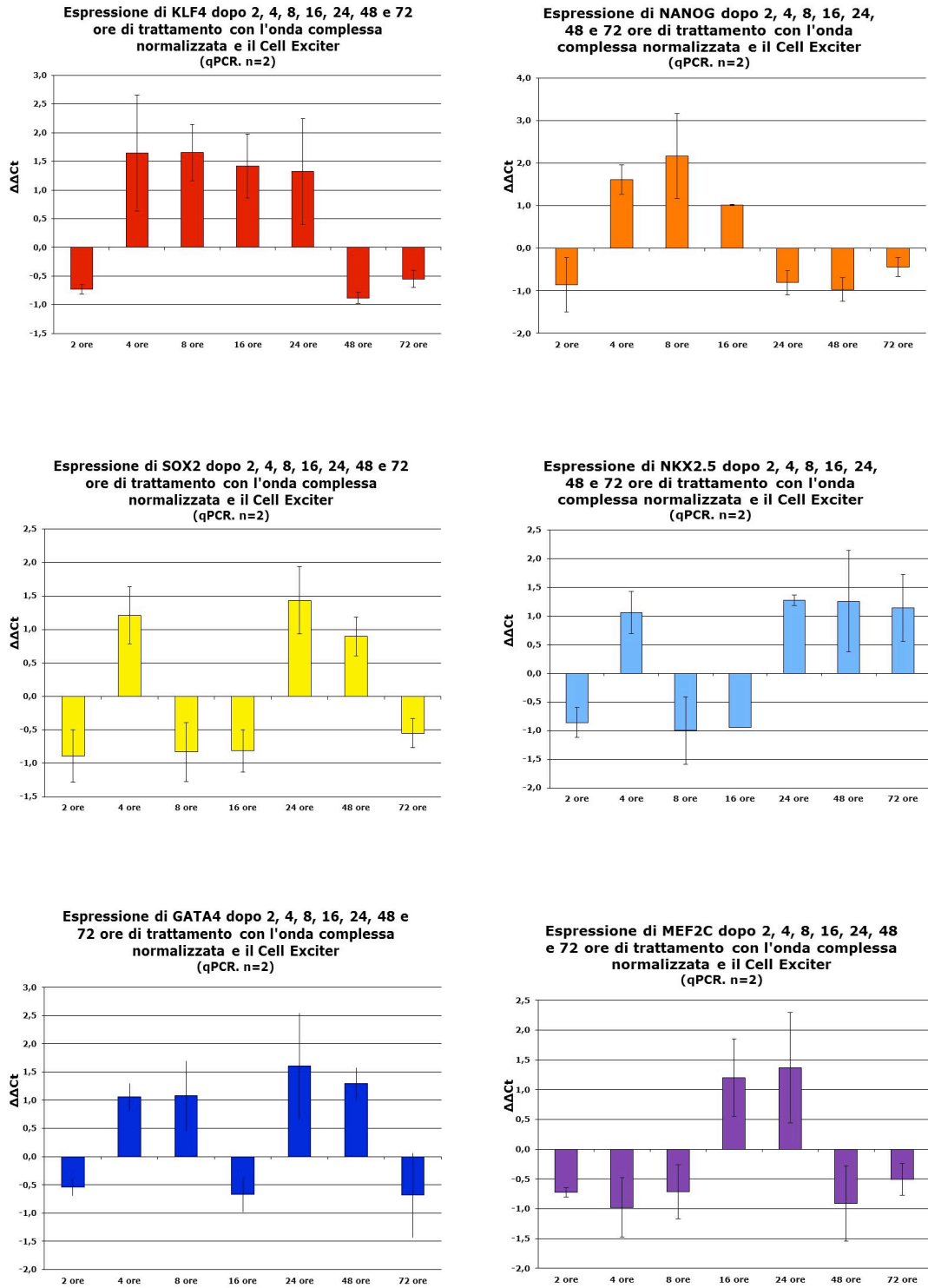
Espressione genica relativa agli esperimenti con l'onda complessa normalizzata somministrata con il generatore di vibrazioni meccaniche per 2, 4, 8 e 16 ore e saggiata in qPCR. I valori di $\Delta\Delta Ct$ minori di 1 sono espressi come valori negativi.

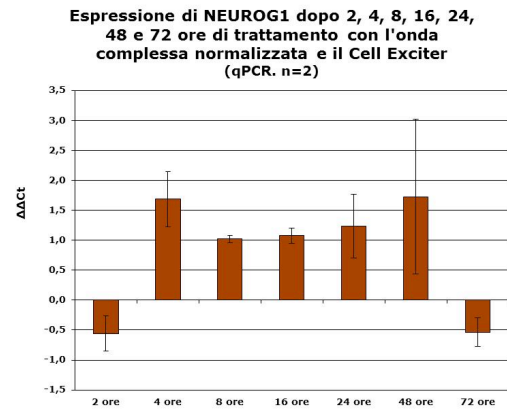
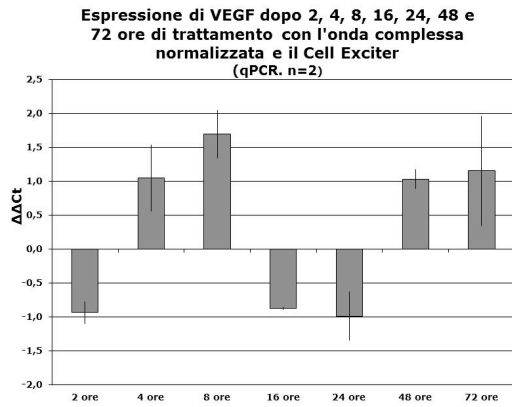
A. Rappresentazione globale dell'espressione genica delle hASC sottoposte a trattamenti di 2, 4, 8 e 16 ore con l'onda complessa normalizzata.

B. Rappresentazione dell'oscillazione dell'espressione dei marcatori dei principali destini differenziativi nelle hASC sottoposte a trattamenti di 2, 4, 8 e 16 ore con l'onda complessa normalizzata. Sull'asse delle ascisse, sono rappresentati i trattamenti. 1 per il trattamento di 2 ore, 2 per il trattamento di 4 ore, 3 per il trattamento di 8 ore e 4 per il trattamento di 16 ore.

Figura 13.

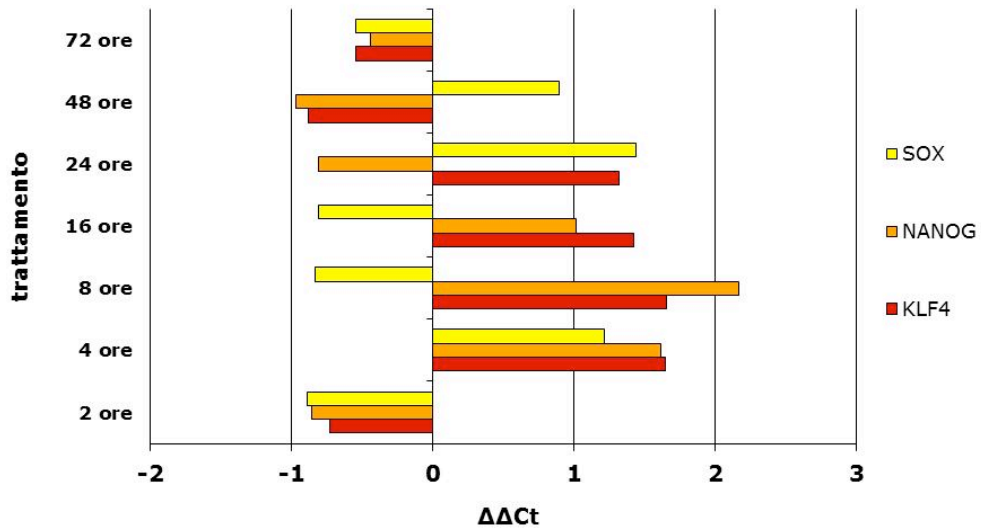
A





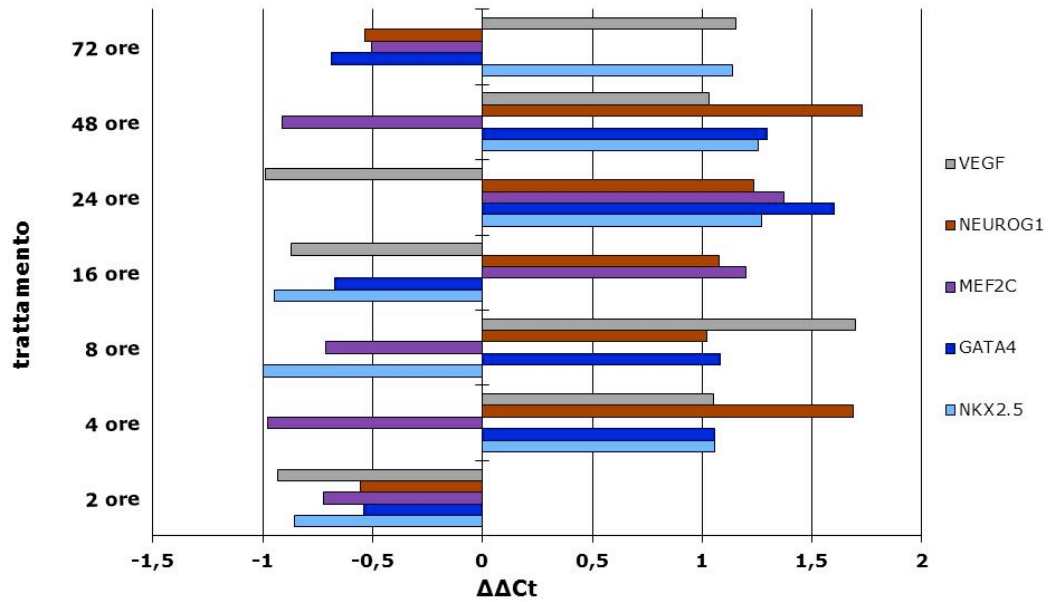
B

Andamento dell'espressione dei geni della staminalità dopo 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore di trattamento (qPCR, n=2)



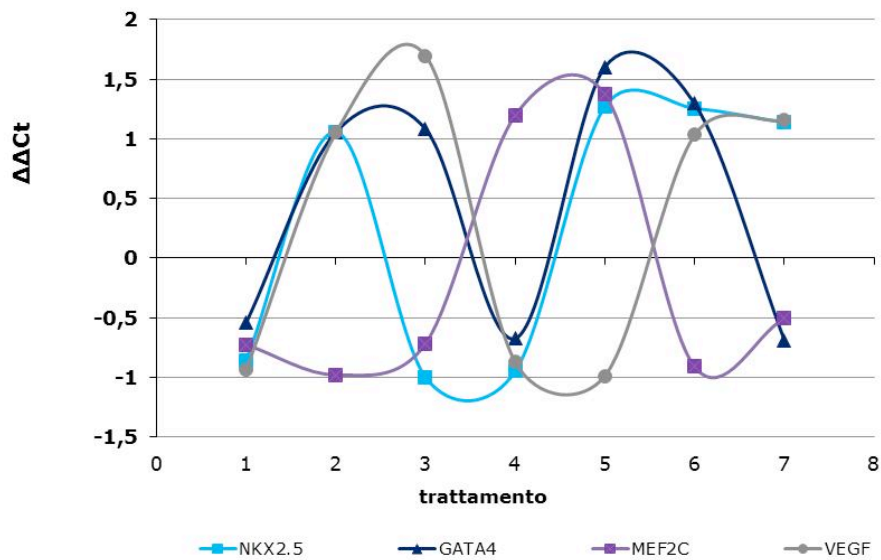
C

Andamento dell'espressione dei geni dei differenziamenti dopo 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore di trattamento (qPCR. n=2)



D

Oscillazione dei marcatori dei differenziamenti dopo 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore di trattamento



Analisi dell'espressione genica, mediante qPCR, di hASC sottoposte a trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 ore con onda complessa normalizzata mediante l'utilizzo del Cell Exciter.

I valori di $\Delta\Delta Ct$ minori di 1 sono espressi come valori negativi.

A. Espressione di *KLF4*, *NANOG*, *SOX2*, *NKX2.5*, *GATA4*, *MEF2C*, *VEGF* e *NEUROG1* dopo 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore di trattamento.

B. Andamento dell'espressione dei geni della staminalità in hASC dopo 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore di trattamento.

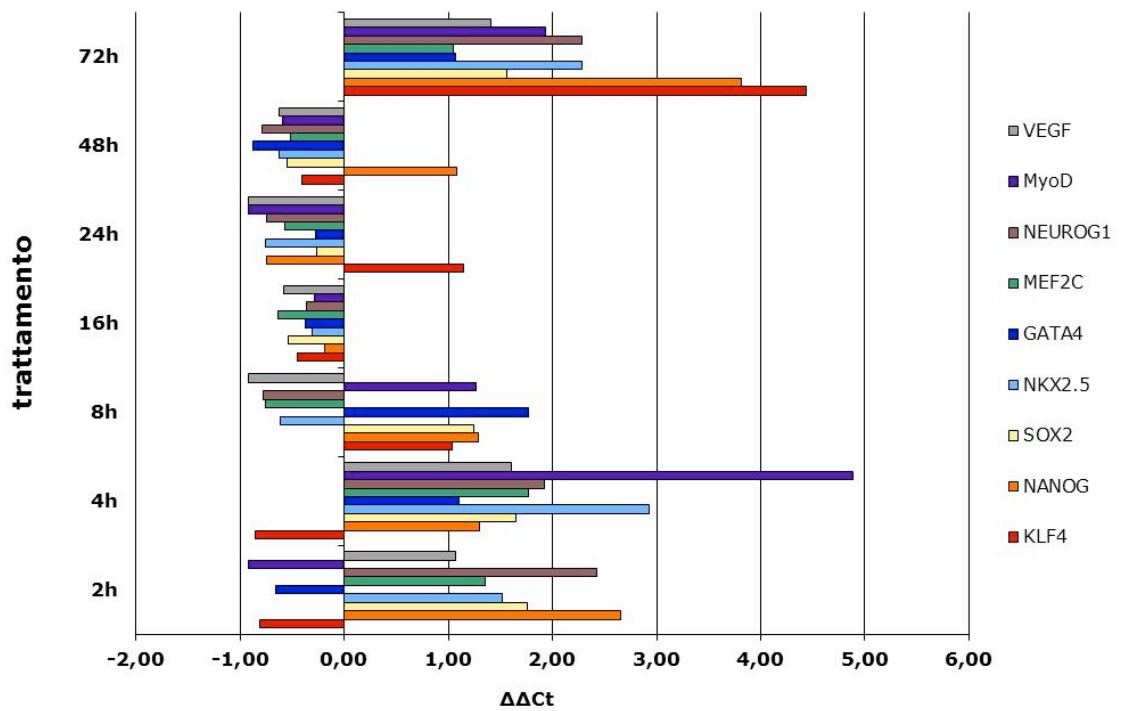
C. Andamento dell'espressione dei marcatori dei principali destini differenziativi in hASC dopo 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore di trattamento.

D. Oscillazione dell'espressione genica dei marcatori dei principali destini differenziativi. In ascissa sono riportati i tempi sperimentali (1 per 2 ore di trattamento, 2 per le 4 ore, 3 per le 8 ore, 4 per le 16 ore, 5 per le 24 ore, 6 per le 48 ore e 7 per le 72 ore). Le morfologie delle curve relative a *NKX2.5* (celeste), *GATA4* (blu) e *MEF2C* (viola) risultano essere simili.

Figura 14.

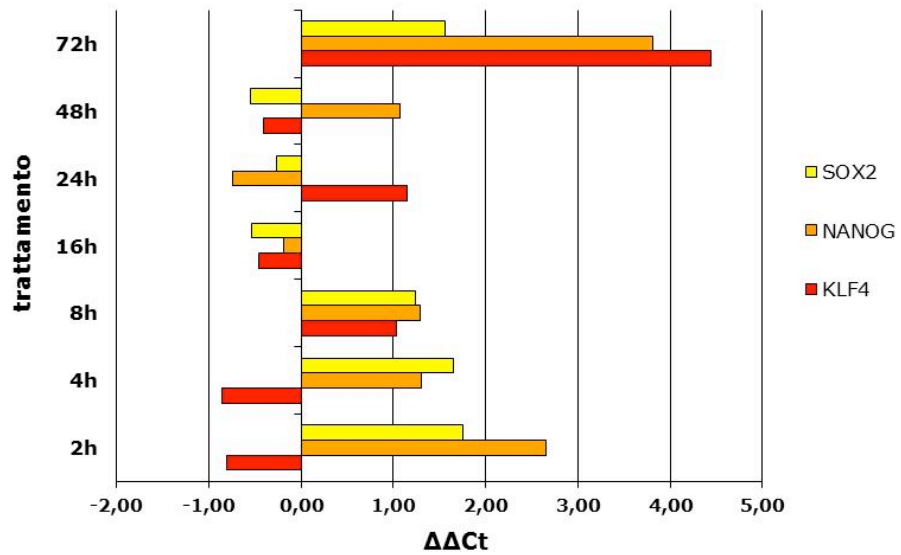
A

Andamento globale dell'espressione genica nelle hASC dopo i trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore con la melodia (qPCR. n=1)



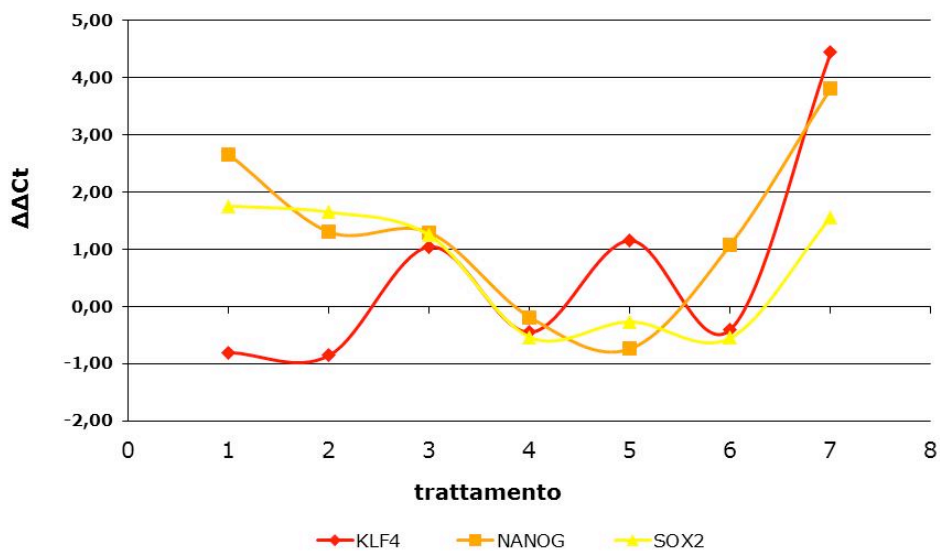
B

Andamento dell'espressione dei geni della staminalità dopo i trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore con la melodia
(qPCR. n=1)



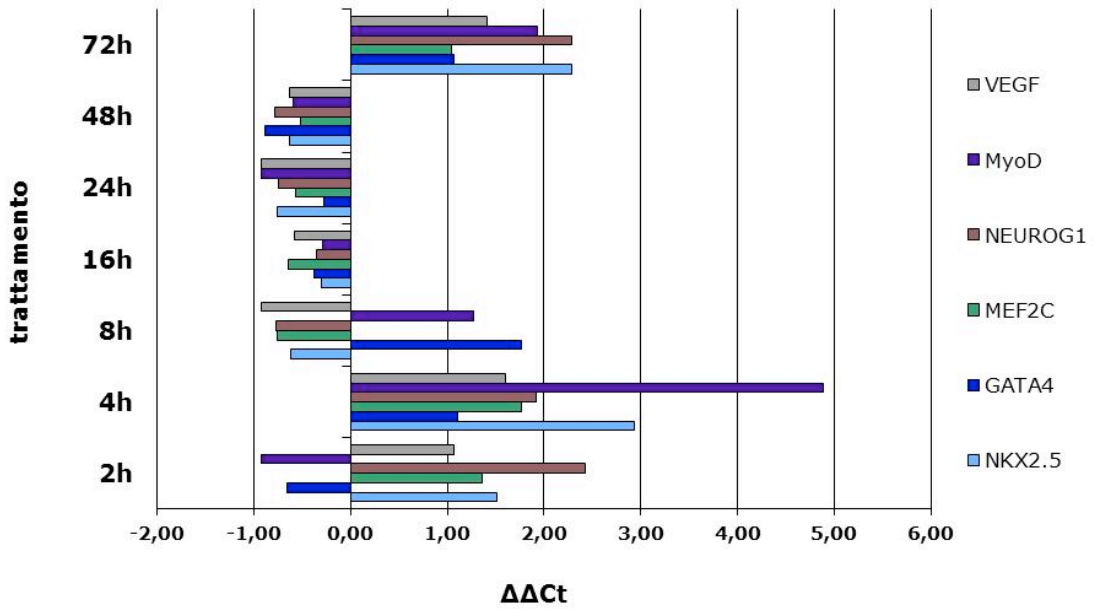
C

Oscillazione dell'espressione dei geni della staminalità dopo i trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore con la melodia



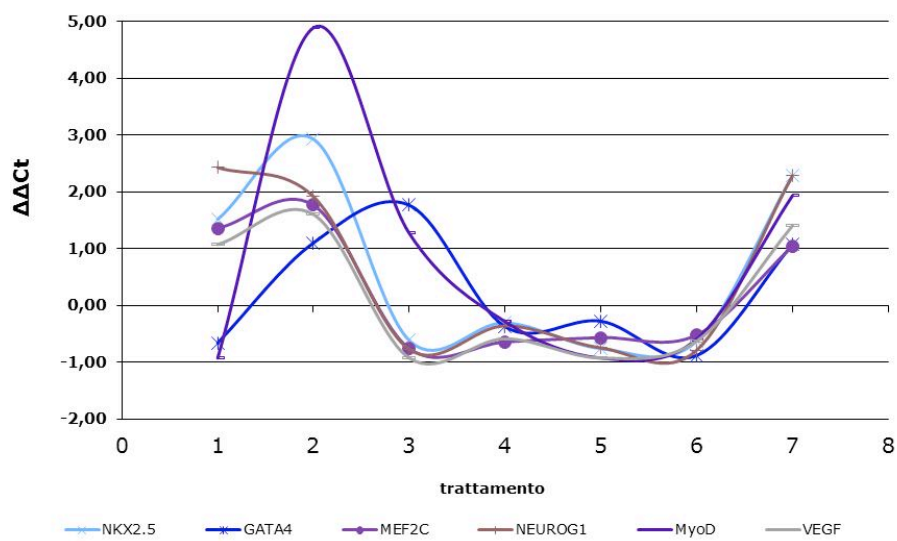
D

Andamento dell'espressione dei marcatori del differenziamento dopo i trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore con la melodia (qPCR; n=1)



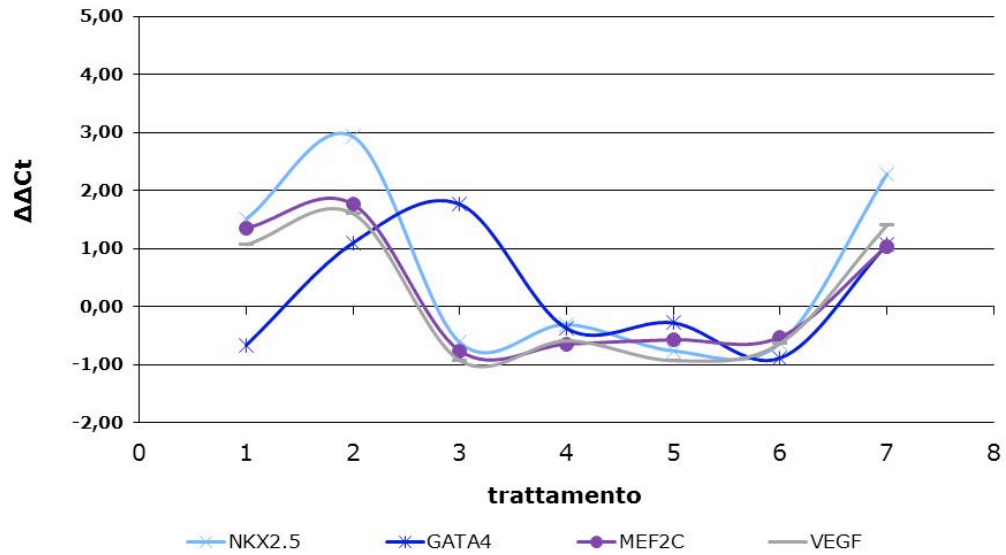
E

Oscillazione dell'espressione dei marcatori dei differenziamenti dopo i trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore con la melodia



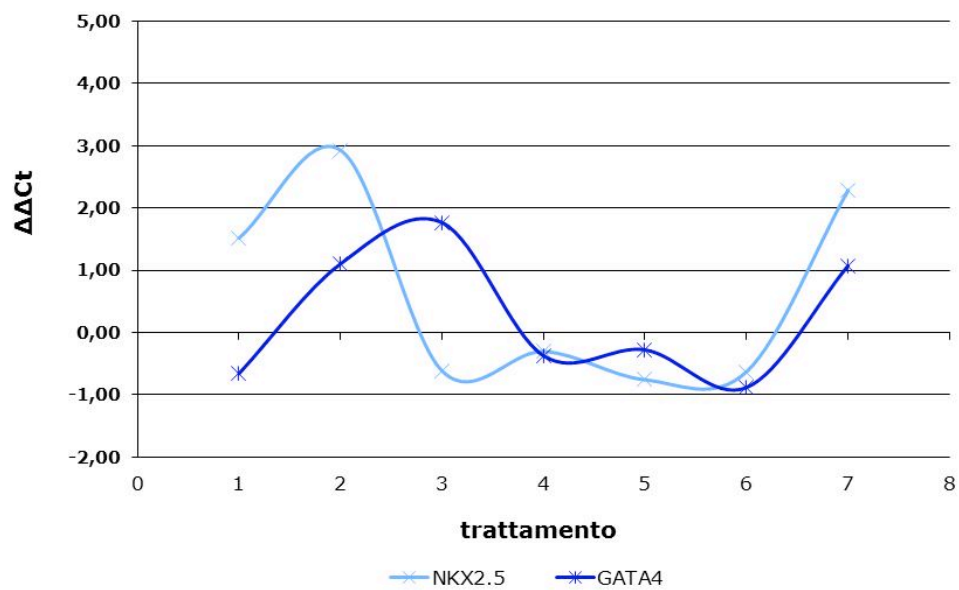
F

Oscillazione dell'espressione di NKX2.5, GATA4, MEF2C e VEGF dopo i trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore con la melodia



G

Oscillazione dell'espressione di NKX2.5 e GATA4 dopo i trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72 ore con la melodia



Analisi dell'espressione genica di hASC sottoposte a trattamenti di 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 ore con la melodia mediante l'utilizzo del Cell Exciter.

I valori di $\Delta\Delta Ct$ minori di 1 sono espressi come valori negativi.

Per i grafici relativi alle oscillazioni (C, E, F, G) in ascissa sono riportati i tempi sperimentali (1 per 2 ore di trattamento, 2 per le 4 ore, 3 per le 8 ore, 4 per le 16 ore, 5 per le 24 ore, 6 per le 48 ore e 7 per le 72 ore).

A. Espressione genica globale delle hASC dopo trattamenti 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 ore.

B. Espressione dei marcatori della staminalità dopo trattamenti 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 ore.

C. Oscillazione dell'espressione genica dei marcatori della staminalità.

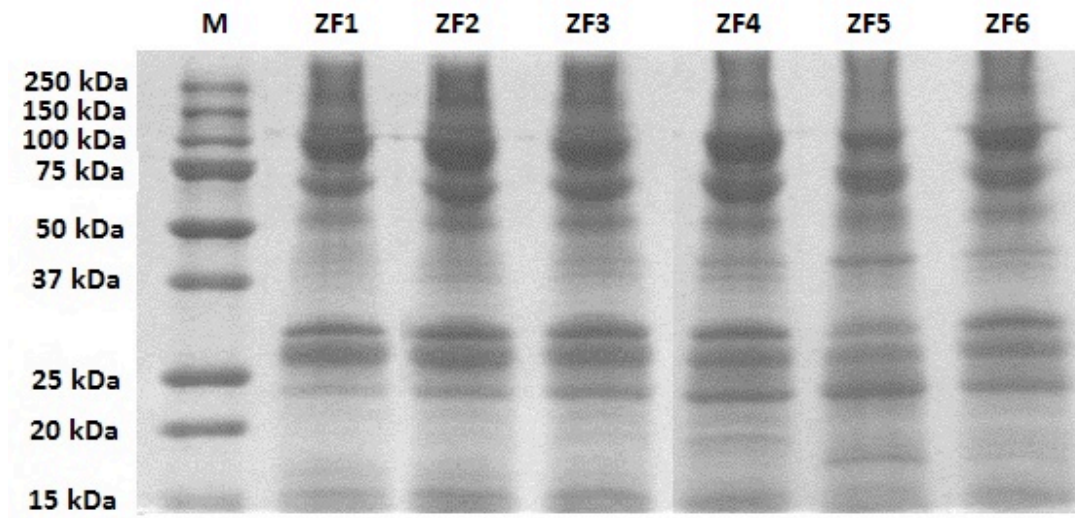
D. Espressione dei marcatori dei principali destini differenziativi dopo trattamenti 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 ore.

E. Oscillazione dell'espressione genica dei marcatori dei principali destini differenziativi.

F. Oscillazione dell'espressione di *NKX2.5*, *GATA4*, *MEF2C* e *VEGF*.

G. Oscillazione dell'espressione di *NKX2.5* e *GATA4*; le morfologie delle due curve risultano essere sovrapponibili.

Figura 15.

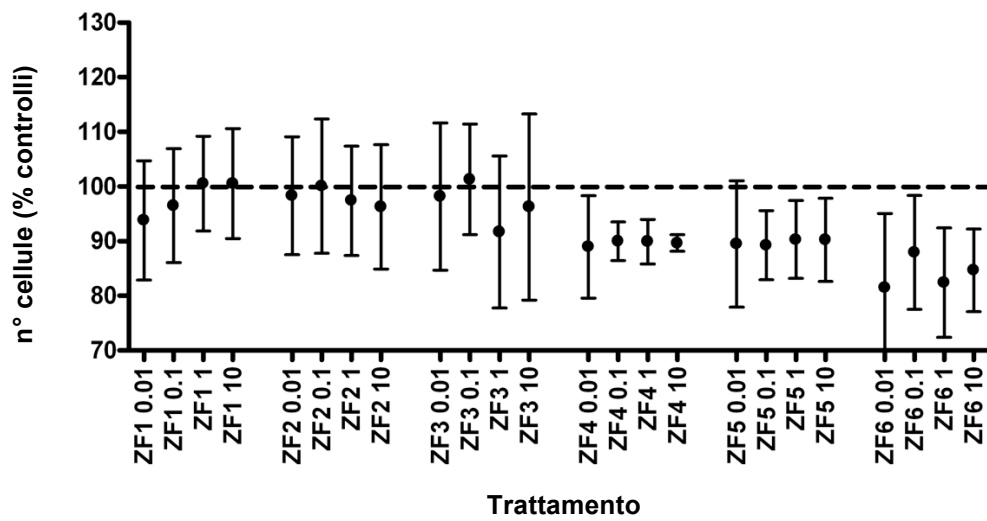


SDS-Page degli estratti di Zebrafish.

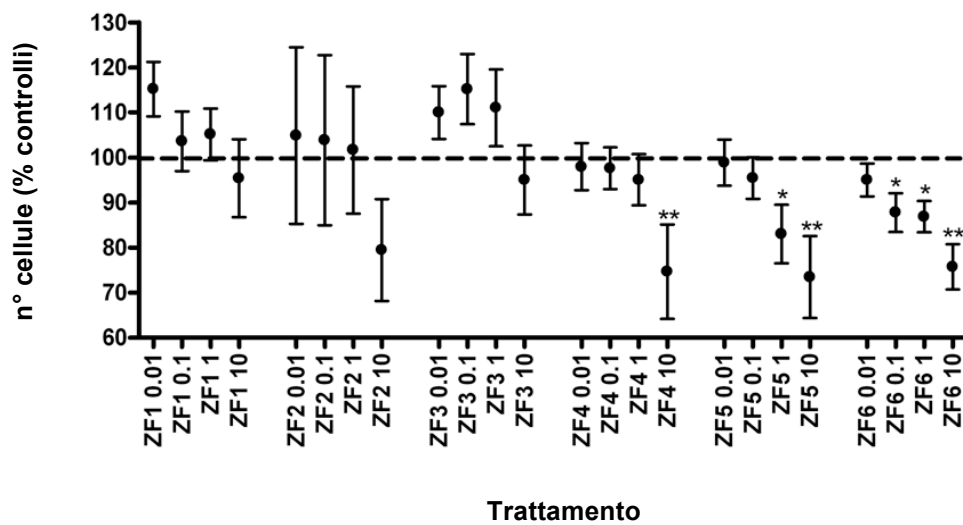
M, marker; ZF1-6, gli estratti.

Figura 16.

A



B



I risultati del saggio di proliferazione condotto su hASC dopo 24 e 72 ore dai trattamenti con i 6 estratti di Zebrafish a 4 diverse concentrazioni, pari a 10 - 1 - 0.1 - 0.01 µg/ml.

A. Proliferazione delle hASC alle 24 ore dalla somministrazione.

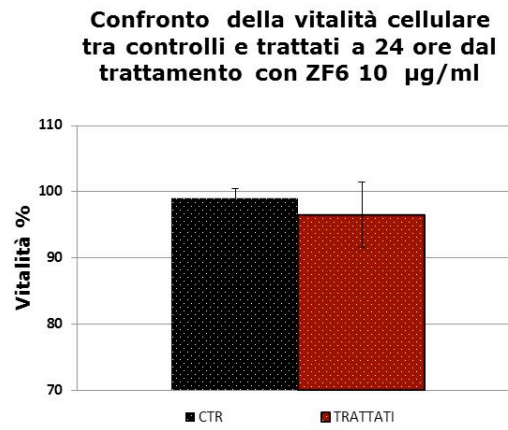
B. Proliferazione delle hASC alle 72 ore dalla somministrazione.

* p<0.05

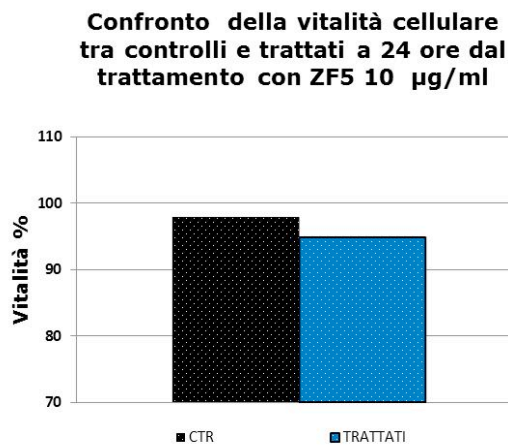
**p<0.01

Figura 17.

A



B



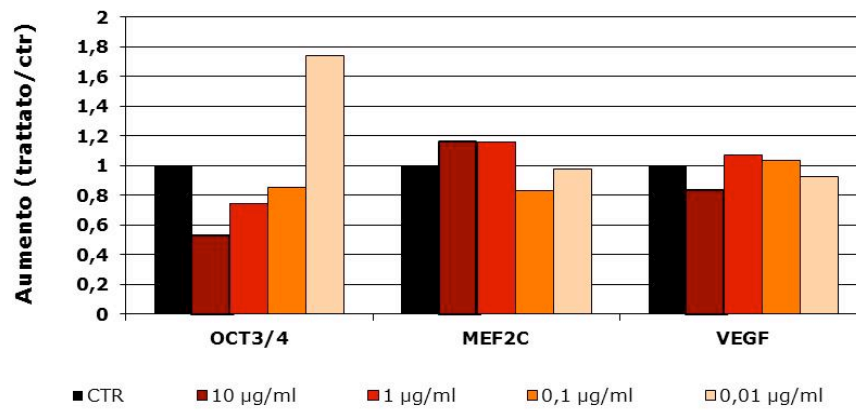
Stima della vitalità cellulare in controlli e trattati delle hASC, relativa alle 24 ore dal trattamento con ZF6 (A) e ZF5 (B) 10 µg/ml.

Per le altre concentrazioni e gli altri tempi sperimentali, non sono state rilevate differenze.

Figura 18.

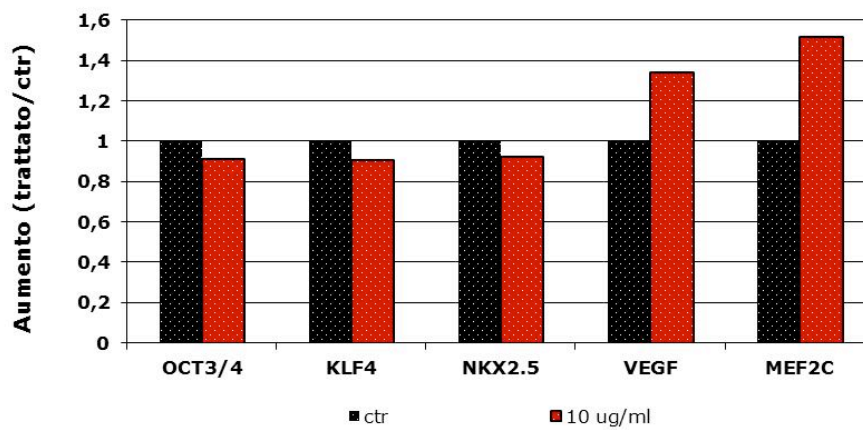
A

Espressione genica di hASC dopo 24 ore dal trattamento con 4 concentrazioni diverse di ZF6 (RT-PCR; n=1)



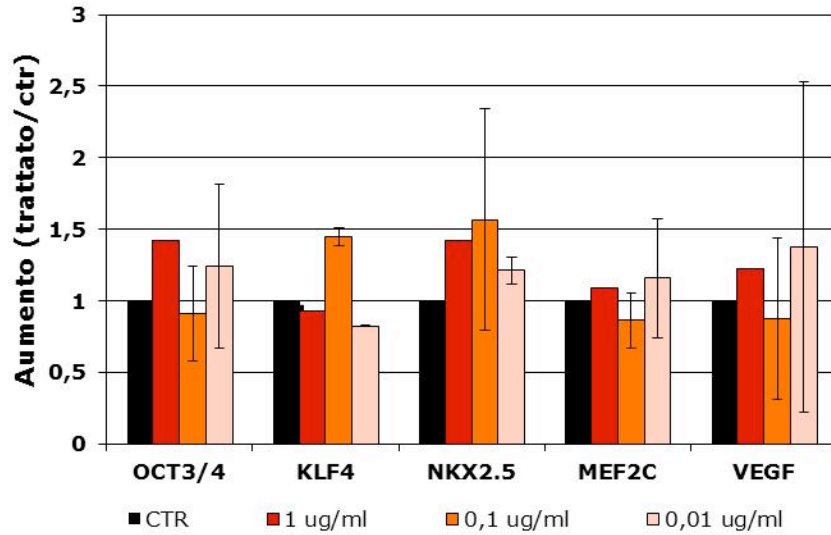
B

Espressione genica di hASC a 72 ore dal trattamento con ZF6 10 µg/ml (RT-PCR; n=1)



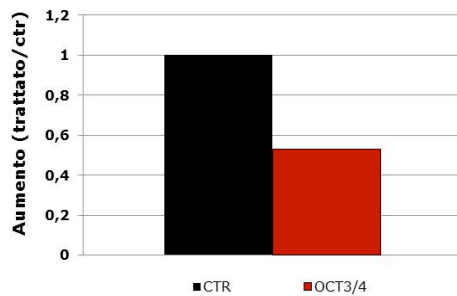
C

Espressione genica delle hASC a 7 giorni dopo trattamento con ZF6 (RT-PCR)

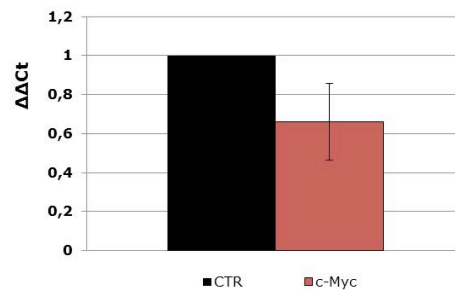


D

Espressione di OCT3/4 dopo 24 ore dal trattamento con ZF6 10 µg/ml (RT-PCR, n=1)

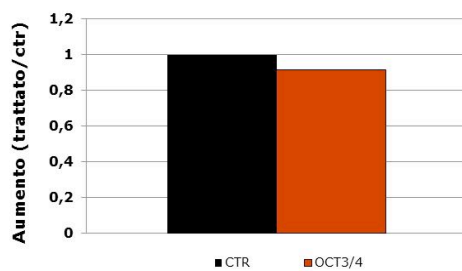


Espressione di c-Myc dopo 24 ore dal trattamento con ZF6 10 µg/ml (qPCR, n=2)

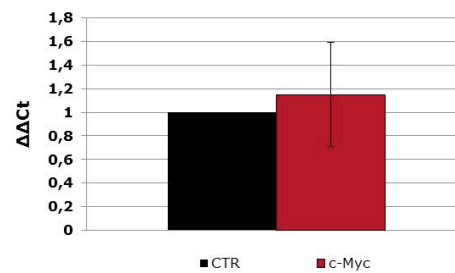


E

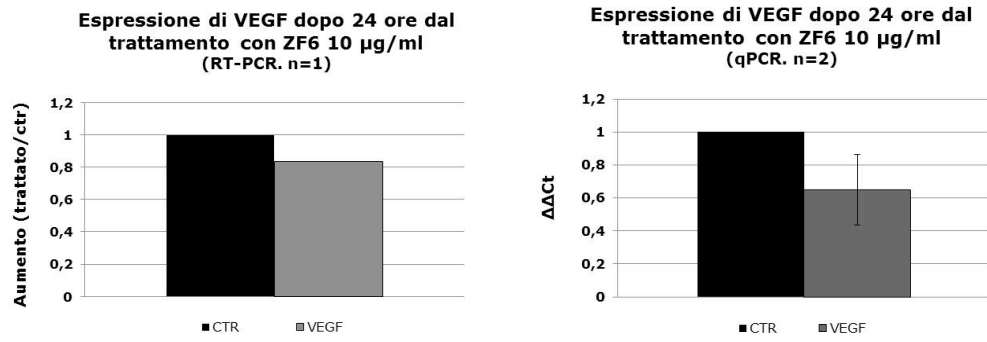
Espressione di OCT3/4 dopo 72 ore dal trattamento con ZF6 10 µg/ml (RT-PCR, n=1)



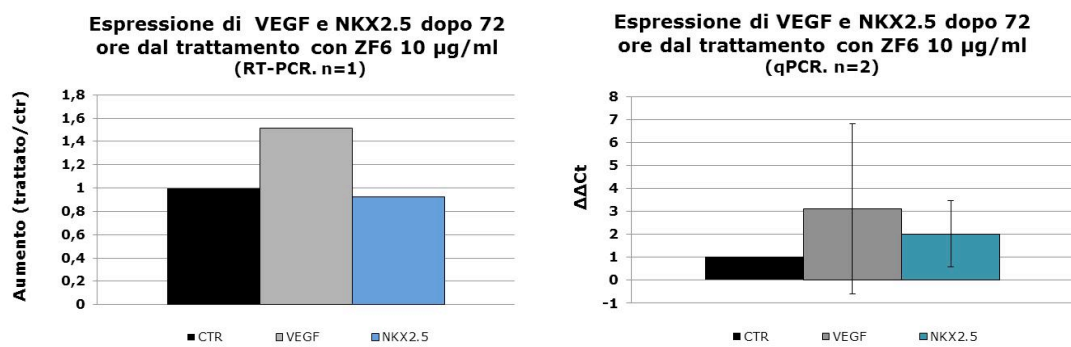
Espressione di c-Myc dopo 72 ore dal trattamento con ZF6 10 µg/ml (qPCR, n=2)



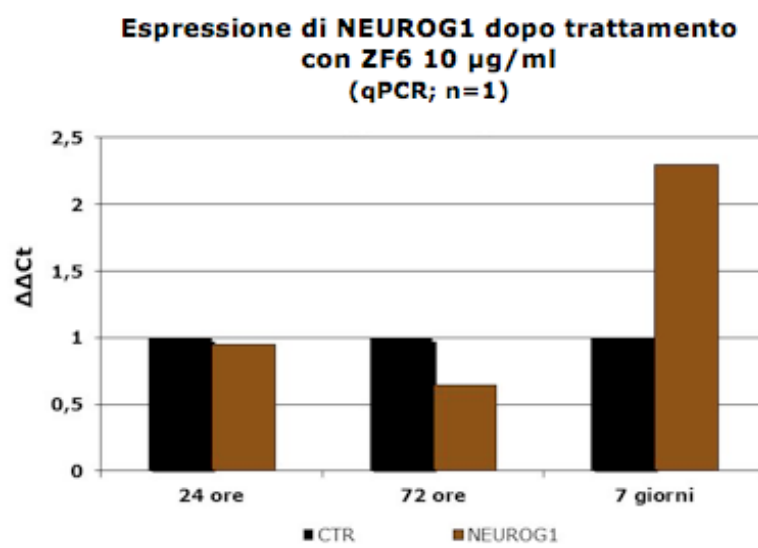
F



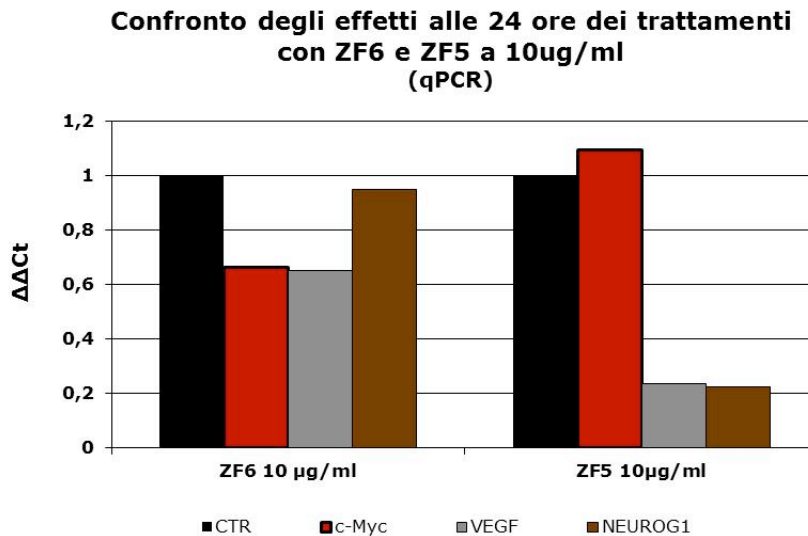
G



H



I



L'espressione genica delle hASC dopo i trattamenti con gli estratti embrionali di Zebrafish (ZF) in RT-PCR quantitativa relativa e qPCR.

- A. Espressione genica delle hASC a 24 ore dopo trattamenti con ZF6 alle concentrazioni di 10 - 1 - 0.1 - 0.01 µg/ml (RT-PCR quantitativa relativa).
- B. Espressione genica delle hASC a 72 ore dal trattamento con ZF6 10 µg/ml (RT-PCR quantitativa relativa).
- C. Espressione genica delle hASC a 7 giorni dal trattamento con ZF6 alle concentrazioni di 1 - 0.1 - 0.01 µg/ml (RT-PCR quantitativa relativa).
- D. L'espressione di *OCT3/4*, studiata in RT-PCR quantitativa relativa, e di *c-Myc*, in qPCR, alle 24 ore dopo trattamento con ZF6 di 10 µg/ml.
- E. L'espressione di *OCT3/4*, studiata in RT-PCR quantitativa relativa, e di *c-Myc*, in qPCR, alle 72 ore dopo trattamento con ZF6 10 µg/ml in RT-PCR (grafico a sinistra) e qPCR (grafico a destra).
- F. Confronto tra l'espressione di *VEGF* studiata in RT-PCR (grafico a sinistra) e qPCR (grafico a destra) alle 24 ore dopo trattamento con ZF6 10 µg/ml.
- G. Confronto tra l'espressione di *VEGF* e *NKX2.5* studiata in RT-PCR quantitativa relativa e qPCR alle 72 ore dopo trattamento con ZF6 10 µg/ml.
- H. Espressione in qPCR di *NEUROG1* alle 24 e 72 ore e 7 giorni dopo trattamento con ZF6 10 µg/ml.
- I. Confronto tra l'espressione in qPCR di *c-Myc*, *VEGF* e *NEUROG1* alle 24 ore dopo trattamento con ZF6 10 µg/ml trattamento con ZF5 10 µg/ml.

Tabelle e legende presenti lungo la tesi

Tabella 1.

A

Onda	Trattamento	Latenza	n	Strumento	Tecnica di analisi
Quadratica	24 ore		1	Generatore con isolamento	RT-PCR
Quadratica	24 ore	24 ore	1	Generatore con isolamento	RT-PCR
Quadratica	24 ore	48 ore	1	Generatore con isolamento	RT-PCR

B

Onda	Trattamento	Latenza	n	Strumento	Tecnica di analisi
Complessa	24 ore	24 ore	1	Generatore senza isolamento	RT-PCR
Complessa	24 ore	48 ore	1	Generatore senza isolamento	RT-PCR
Complessa	24 ore	48 ore	3	Generatore con isolamento	RT-PCR
Complessa	24 ore	7 giorni	4	Generatore con isolamento	RT-PCR qPCR
Complessa	24 ore	12 giorni	1	Generatore con isolamento	RT-PCR

Complessa	2 ore	1	Generatore con isolamento	qPCR
Complessa	4 ore	1	Generatore con isolamento	qPCR
Complessa	8 ore	1	Generatore con isolamento	qPCR
Complessa	16 ore	1	Generatore con isolamento	qPCR
Complessa	2 ore	2	Cell Exciter	qPCR
Complessa	4 ore	2	Cell Exciter	qPCR
Complessa	8 ore	2	Cell Exciter	qPCR
Complessa	16 ore	2	Cell Exciter	qPCR
Complessa	24 ore	2	Cell Exciter	qPCR
Complessa	48 ore	2	Cell Exciter	qPCR
Complessa	72 ore	2	Cell Exciter	qPCR
Melodia	2 ore	1	Cell Exciter	qPCR
Melodia	4 ore	1	Cell Exciter	qPCR
Melodia	8 ore	1	Cell Exciter	qPCR
Melodia	16 ore	1	Cell Exciter	qPCR
Melodia	24 ore	1	Cell Exciter	qPCR
Melodia	48 ore	1	Cell Exciter	qPCR

Melodia	72 ore	1	Cell Exciter	qPCR
---------	--------	---	--------------	------

C

Fase	Concentrazione	Trattamento	n	Tecnica di analisi
ZF6	0,01 µg/ml	7 giorni	2	RT-PCR
ZF6	0,1 µg/ml	7 giorni	2	RT-PCR
ZF6	1 µg/ml	7 giorni	1	RT-PCR
ZF6	10 µg/ml	7 giorni	2	qPCR
ZF6	10 µg/ml	72 ore	2	qPCR
ZF6	10 µg/ml	24 ore	2	qPCR
ZF5	10 µg/ml	24 ore	2	qPCR

Schematizzazione degli esperimenti condotti sulle hASC e per i quali sono illustrati i risultati nelle specifiche sezioni del capitolo “Risultati”, sebbene siano stati eseguiti e citati anche altri esperimenti nel testo.

A. Esperimenti con onde singole. Esperimenti definiti per tipo di onda (Onda), durata del trattamento (Trattamento), tempo di latenza alla fine dello stimolo (Latenza), numero di esperimenti effettuati (n), strumento utilizzato per la somministrazione (Strumento) e tecnica di analisi d’espressione genica (Tecnica di analisi). Nella colonna relativa allo strumento utilizzato, “Generatore” è da intendersi come “Generatore di vibrazioni meccaniche”.

B. Esperimenti con onda complessa, normalizzata e melodia. . Esperimenti definiti per tipo di onda (Onda), durata del trattamento (Trattamento), tempo di latenza alla

fine dello stimolo (Latenza), numero di esperimenti effettuati (n), strumento utilizzato per la somministrazione (Strumento) e tecnica di analisi d'espressione genica (Tecnica di analisi). Nella colonna relativa allo strumento utilizzato, "Generatore" è da intendersi come "Generatore di vibrazioni meccaniche".

C. Esperimenti con gli estratti embrionali di Zebrafish. Esperimenti definiti per la fase di sviluppo utilizzata (Fase) (per i dettagli si rimanda al paragrafo "Gli stimoli molecolari: gli estratti embrionali di pesce zebra" nella sezione "Materiali e Metodi"), la concentrazione di tali estratti per il trattamento (Concentrazione), la durata del trattamento (Trattamento), numero di esperimenti effettuati (n), strumento utilizzato per la somministrazione e tecnica di analisi d'espressione genica (Tecnica di analisi).

Tabella 2.

Onda	Frequenza (Hz)	Durata (ms)
F1	53,52	209
F2	40,80	91
F3	95,20	422
F4	104,90	235
F5	51,42	445
F6	51,25	565
F7	50,79	904
F8	53,51	861

Caratterizzazione delle frequenze che compongono l'onda complessa sia normalizzata (overlaid) che melodia.

Tabella 3.

ID	5'	Sequenza del primer (5'-3')	Ta (°C)	Prodotto e n° cicli
GAPDH NM_002046	F: 314 R: 952	GAAATCCCATCACCATCTTCCAG AGGAGACCACCTGGTGCTCAGTGTAGC	61	† 639 bp 20cy
	F: 528 R: 633	CAGCCTCAAGATCATCAGCA TGTGGTCATGAGTCCTTCCA	60	§ 106 bp 45cy
KLF4 NM_004235	F: 346 R: 1064	CCCGGCCACCGGACCTACTT CCGCCCCGGATCGGATAGG T	61	† 719 bp 35cy
	F: 1629 R: 1755	GCCCAATTACCCATCCTTCCT CGATCGTCTTCCCCTCTTTG	62	§ 127 bp 45cy
SOX2 NM_003106	F: 1027 R: 1603	TGCACCGCTACGACGTGAGC GGCATCGCGGTTTTTGCGT	61	† 577 bp 35cy
SOX2 *	F: 1464 R: 1591	GGAGAGTAAGAAACAGCATGGA TTTGCGTGAGTGTGGATGG	62	§ 128 bp 45cy
OCT3/4 NM_00117353.1	F: 370 R: 1133	GGATCACCCCTGGGATATACACAGGC CCCAAACCTCCCCTGCCCCCA	61	† 764 bp 30cy
NANOG NM_024865	F: 445 R: 1014	CCCACTTCTGCAGAGAAGAGTGTGCG GGCAGCCTCCAAGTCACTGGC	61	† 570 bp 35cy
	F: 379 R: 498	CCTTCCTCCATGGATCTGCTT CTTGACCGGGACCTTGTCTTC	64	§ 120 bp 45cy
c-Myc NM_002467.4	F: 1914 R: 2001	TTCTAAGAGAAATGTCCTGAGCAATC TCAAGACTCAGCCAAGGTTGTG	58	§ 88 bp 45cy
NEUROG1 NM_006161.2	F: 656 R: 1209	ACGCTGCGCTTCGCCTACAAC GGAAAGGCCGTCTAGGGG C G	61	† 554 bp 40cy
	F: 268 R: 376	GGCTGCCTGTTGGAGTCTG CCGCCTTGAGACC TGCATC	60	§ 109 bp 45cy

MyoD NM_002478	F: 829 R: 977	CTCCAAGTCTCCGACGGCAT ACAGGCAGTCTAGGCTCGACAC	61	† 149 bp 40cy
NKX2.5 NM_004387	F: 977 R: 1394	TATAACGCCTACCCCGCTATC TAATCGCCGCCACAACTCTCC	61	† 418 bp 35cy
NKX2.5 *	F: 1588 R: 1667	GCACCCACCCGTATTTATGT GGGTCAACGCACTCTCTTTAA	56	§ 80 bp 45cy
GATA4 *	F: 2462 R: 2585	ACC ACA GCA CAG CCT CAT CCAG AGC GGG AAG AGG GAT TT	58	§ 124 bp 45cy
MEF2C NM_002397.4	F: 983 R: 1147	GCCCTGAGTCTGAGGACAAG CCAGAGTGAGCTGACAGGGTT	61	† 165bp 35cy
MEF2C ** QT00053368	E3/E4			§ 81 bp 45cy
VEGF NM_001025366	F: 1128 R: 1271	AGAAGGAGGAGGGCAGAATC ACACAGGATGGCTTGAAGATG	58	†§ 144 bp 25cy
KDR NM_002253.2	F: 3056 R: 3217	CTCCAATTTGGAAACCTGTC GAGCTCTGGCTACTGGTGATG	58	† 162 bp 35cy
HGF NM_000601.4	F: 498 R: 624	ATTTGGCCATGAATTTGACCT ACTCCAGGGCTGACATTTGAT	58	† 127 bp 35cy

Tabella riassuntiva dei primers utilizzati in RT-PCR e/o qPCR.

ID, geni in studio con relativa sequenza di riferimento (NM); 5', la posizione dove le estremità 5' del primer senso (F) ed antisenso (R) trovano corrispondenza sulla NM; Ta, la temperatura di anealing della reazione di PCR; Prodotto e n° cicli, la lunghezza in paia di basi (bp) dell'amplicone e i cicli (cy) utilizzati per amplificare il gene d'interesse.

*, coppia di primers a sequenza nota progettati e validati da PrimerDesign

**, coppia di primers a sequenza ignota progettati ed acquistati da QIAGEN, con relativo codice della compagnia e regione del mRNA dove si appaiano i primers.

†, primer usati in RT-PCR

§, primer usati in qPCR

Tabella 4.

Campione	Descrizione del campione	Concentrazione (mg/ml)
ZF1	50% epibolia	1,5
ZF2	Tail bud	2,4
ZF3	5 somiti	2,7
ZF4	20 somiti	2,6
ZF5	<i>primordia</i>	2,0
ZF6	mix	2,2
Solvente	Glicerolo 60%, alcol etilico 5%	0

Contenuti proteici degli estratti di Zebrafish e del solvente, dosati con BCA assay. Ogni campione è stato misurato a 3 diluizioni diverse e in duplicato.