

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
"SPERIMENTAZIONE TECNOLOGICA, IMMUNOLOGICA ED IMMUNOGENETICA:
SUA APPLICAZIONE NEGLI XENOTRAPIANTI E
NEI PRELIEVI DI ORGANO PER TRAPIANTO UMANO"
XXII CICLO

Dott. Daniele Tibullo

TESI

*Studio in vitro della differenziazione delle cellule
mesenchimali staminali di midollo osseo in epatociti e
valutazione funzionale*

Coordinatore: **Chiar.mo Prof. G. Vadalà**

Tutor: **Chiar.ma Prof.ssa E. Cacciola**

Anno Accademico 2009-2010

Sommario

INTRODUZIONE	3
MATERIALI E METODI.....	5
Colture di cellule staminali mesenchimali umane	5
Differenziazione in Vitro.....	5
Estrazione di RNA e qRT-PCR	8
Analisi dell'albumina in ELISA	9
Produzione dell'UREA	10
Valutazione dei livelli di glicogeno	10
Analisi statistica.....	10
RISULTATI	11
Identificazione delle cellule staminali mesenchimali midollari	11
Differenziamento in vitro delle MSCs in epatociti.....	12
Studio di funzionalità delle cellule epatiche differenziate	16
DISCUSSIONE	19
BIBLIOGRAFIA.....	21

INTRODUZIONE

Il trapianto di fegato è il trattamento di scelta per pazienti con patologia epatica cronica, cirrotica e/o neoplastica. Il limitato numero di donatori, nonché il rigetto e l'uso prolungato di immunosoppressori, ne limitano l'applicazione clinica. Inoltre, la possibilità di ottenere epatociti trapiantabili è ostacolato dal basso potenziale replicativo delle cellule epatiche, dalla loro concomitante perdita di funzionalità in coltura e dal ridotto numero di cellule vitali e funzionali che si ottengono dopo criopreservazione. Le cellule staminali emopoietiche pluripotenti sembrano essere una valida speranza alternativa [1]. Queste tipologie di cellule CD34+ hanno capacità differenziativa "plastica", poiché in grado di dare origine non solo a cellule mature emopoietiche ma anche di altri tessuti, quali quello epatico. Anche le cellule dello stroma midollare hanno la capacità di differenziare in epatociti. In particolare, le cellule staminali mesenchimali (BM-MSCs) possiedono self-renewal e, coltivate in vitro e sotto opportuno condizionamento, possono differenziare in osteoblasti, adipociti, condrociti, miociti, rappresentando un potenziale trapiantologico [2]. Scopo del nostro studio è valutare le

differenze in vitro delle hBM-MSCs in epatociti ed il loro stato funzionale.

MATERIALI E METODI

Colture di cellule staminali mesenchimali umane

Le cellule staminali mesenchimali (h-BM-MSCs) sono state ottenute tramite biopsia osteomidollare di donatori di midollo osseo, volontari adulti sani, dopo consenso informato.

Le h-BM-MSCs sono state isolate su gradiente di densità ficoll piastrate alla densità di circa 10000 cellule/cm² in *low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), con aggiunta di foetal calf serum (CSF) (Biochrom, Cambridge, UK). Le cellule così ottenute non sono immortalizzate e hanno un tempo di crescita indefinito.

La tipizzazione delle cellule MSC come: CD73+, CD90+, CD34-, CD45- viene eseguita valutando l'espressione di markers di superficie mediante citofluorimetria, e sono identificate per la loro capacità fisiologica di differenziarsi in osteoblasti e adipociti, e di formare colonie di fibroblasti (CFU-F).

Differenziazione in Vitro

Differenziazione Osteogenica. Il differenziamento osteogenico delle cellule hBM-MSCS è stato indotto incubando le cellule, che si trovavano ad una confluenza del 70-80%, in un terreno standard (DMEM +10% FCS+ 100u/ml penicillina+ 100 µg/ml streptomicina, SC) con aggiunta di 0,2mM di acido ascorbico (sigma); 0,1 µm di desametasone (Sigma) e 10mM β-glicerolo (terreno osteogenico, OM). Il terreno (SC,OM, con o senza imatinib) cambiato ogni 3-4 giorni.

- **Acido ascorbico** (vitamina C): funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di tutti i tipi di collagene; induce l'attività della fosfatasi alcalina della membrana plasmatica degli osteoprogenitori.
- **B glicerofosfato:** I fosfati organici promuovono la mineralizzazione dal momento che il fosfato viene incorporato nei cristalli di idrossiapatite della matrice.
- **Desametasone:** promuove il differenziamento poichè è un agonista dei glucocorticoidi; esso agisce sui promotori responsivi dei fattori di trascrizione necessari per l'immissione delle MSCs nel lineage osteogenico; promuove la calcificazione in vitro.

Differenziazione Adipogenica. La differenziazione adipogenica è stata eseguita mediante l'aggiunta nel terreno di coltura per 28 giorni di 0,5 mM di IBMX, 0,1 mM di indometacina e 10% di siero bovino.

Per valutare l'avvenuta adipogenesi, le cellule sono state colorate con Oil Red O.

Differenziazione epatogenica. Le cellule di BM-MSCs sono state per due giorni private di FBS con l'aggiunta dei fattori di crescita quali 20 ng/ml di EGF (Epidermal growth factor) e 10 ng/ml di FGF (Fibroblast growth factor). La differenziazione è stata condotta attraverso due step successivi. Durante il primo step le cellule sono state incubate per 7 giorni con 20 ng/ml di HGF (Hepatocyte growth factor), 10 ng/ml di FGF e 0,6g/l di nicotinammide. Dopo 7 giorni si è passati al secondo step che prevedeva l'incubazione delle cellule con 20ng/ml di oncostatina M (OSM), 1uM di desametasone e 50 mg di ITS+.

Estrazione di RNA e qRT-PCR

RNA totale è stato estratto mediante tryzol e retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit Roche. L'RNA totale (1 µg) è stato poi analizzato in qRT-PCR mediante TaqMan Gene Expression (Applied Biosystem) su piattaforma 7900 fast real time PCR System (Applied Biosystem). L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il calcolo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (RQ), normalizzando il valore di espressione ottenuto per singolo campione con quello di un gene costitutivamente espresso usato come controllo interno di riferimento, la beta-Actina (Applied Biosystem).

I geni analizzati sono stati i seguenti, alfa fetoproteina (AFP), Albumina, citokeratina 18 (CK-18), citocromo P450 2B6 (CYP2B6). In Tab.1 sono riportati gli assay ID (Applied Biosystem) per ciascun gene studiato.

Nome Gene	ASSAY ID (Applied Biosystems)
Alfa fetoproteina (AFP)	Hs01040597_m1
Albumina (ALB)	Hs99999922_s1
Citocromo P450 2B6 (CYP2B6)	Hs03044636_m1
Citocheratina-18 (CK-18)	Hs01941416_g1
Beta Actina (ACTB)	Hs99999903_m1

Tab.1

Analisi dell'albumina in ELISA

La valutazione della produzione di albumina è stata condotta mediante tecnica ELISA, il protocollo eseguito è in accordo con le direttive imposte dal kit “Human albumin ELISA kit” (Bethyl Laboratories, Inc).

Produzione dell'UREA

I livelli di urea sono stati valutati mediante saggio colorimetrico (640-1, Sigma) in accordo con il protocollo consigliato dall'azienda fornitrice.

Valutazione dei livelli di glicogeno

Le BM-MSCs differenziate sono state omogeneizzate e risospese in acqua, successivamente la soluzione è stata portata all'ebollizione per 5 minuti e centrifugata a 13000 x g. Il surnatante è stato raccolto per effettuare la lettura in colorimetria secondo le indicazioni riportate dal kit (Glycogen assay kit, Biovision, CA, USA).

Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm S.D., la significatività dei dati è stata calcolata mediante ANOVA. Le differenze tra i dati ottenuti sono state considerate significative ad un valore convenzionale di $p < 0.05$.

RISULTATI

Identificazione delle cellule staminali mesenchimali midollari

Per confermare e provare la natura mesenchimale delle cellule studiate, esse sono state incubate in medium osteogenico per 3 settimane ottenendo il loro differenziamento in osteoblasti confermato morfologicamente, dopo colorazione con alizarina red, anche per la presenza di noduli di mineralizzazione ossea. Le stesse cellule sono state differenziate anche in adipociti dopo incubazione con medium adipogenico per 3 settimane risultando positive alla colorazione con Oil Red O (Fig.1), e formando dopo 28 giorni di trattamento gocce lipidiche. La caratterizzazione delle MSCs è stata effettuata in citofluorimetria; le cellule erano negative per CD13, CD34, CD45 e CD133, ma positive per CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 (dati non mostrati). Le MSCs sono state caratterizzate in citofluorimetria e risultavano: CD13⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻, e CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺, e CD105⁺ (dati non mostrati).

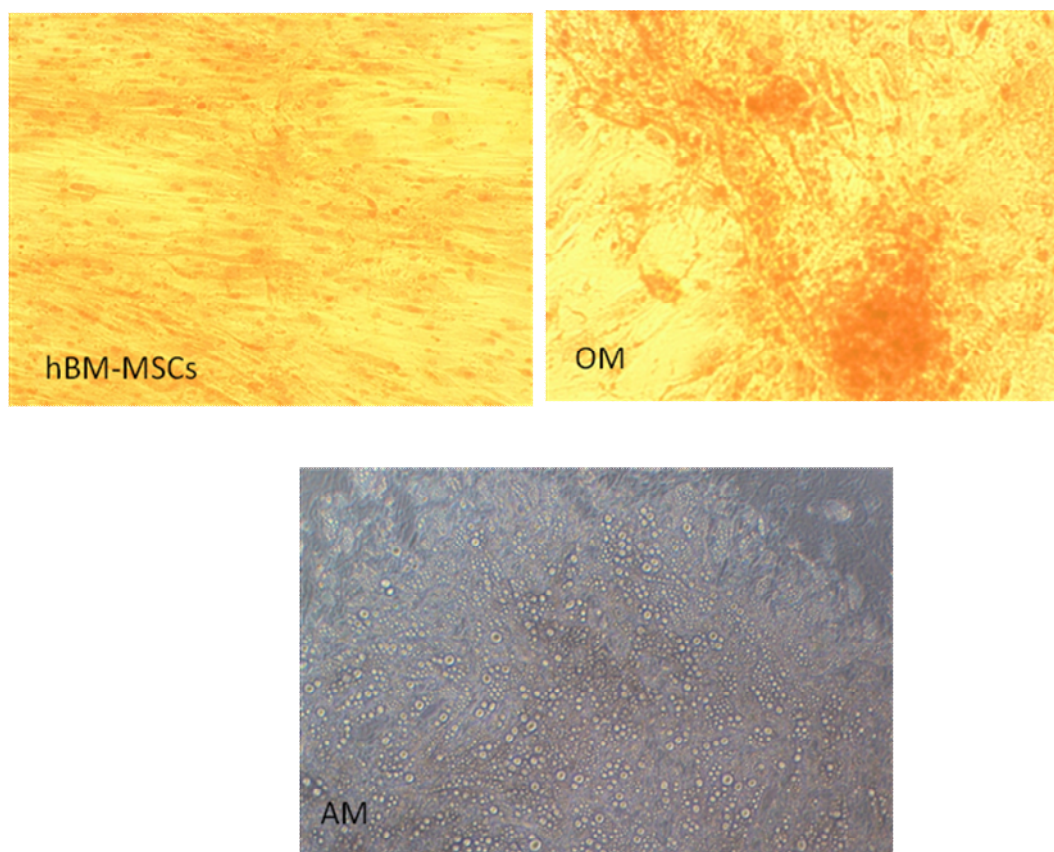


Fig. 1

Differenziamento in vitro delle MSCs in epatociti

Le MSCs sono state differenziate in epatociti in presenza di HGF, bFGF e VEGF e perdevano la morfologia fibroblastica, assumendo forma cuboidale e acquisendo granuli citoplasmatici (Fig. 2).

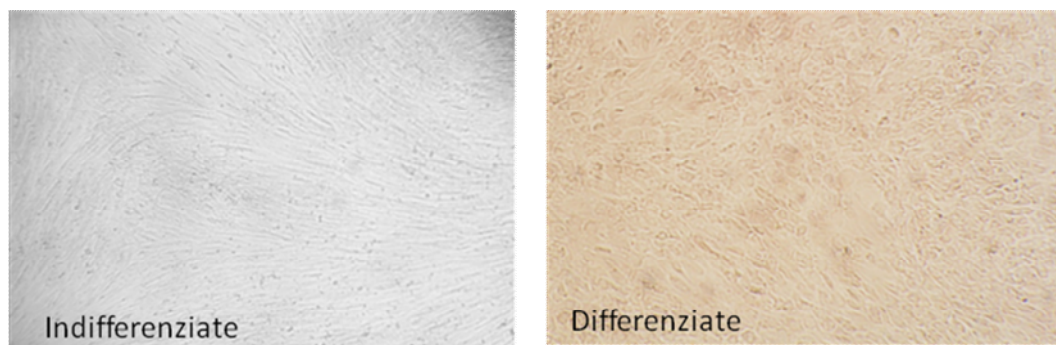
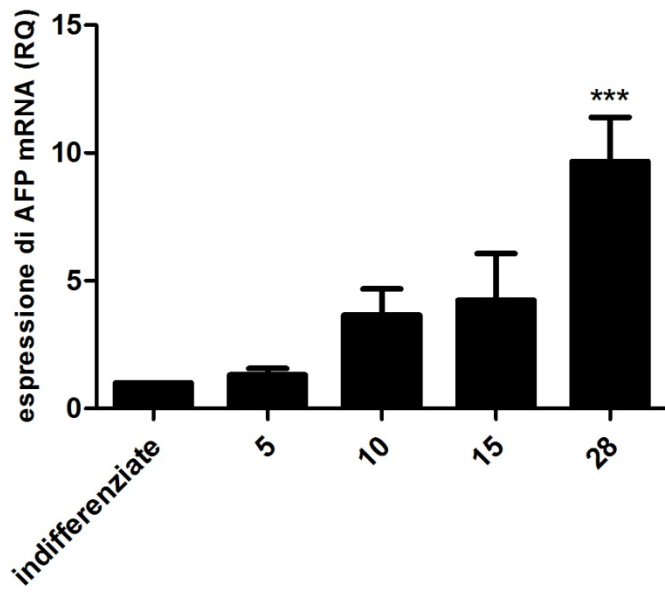
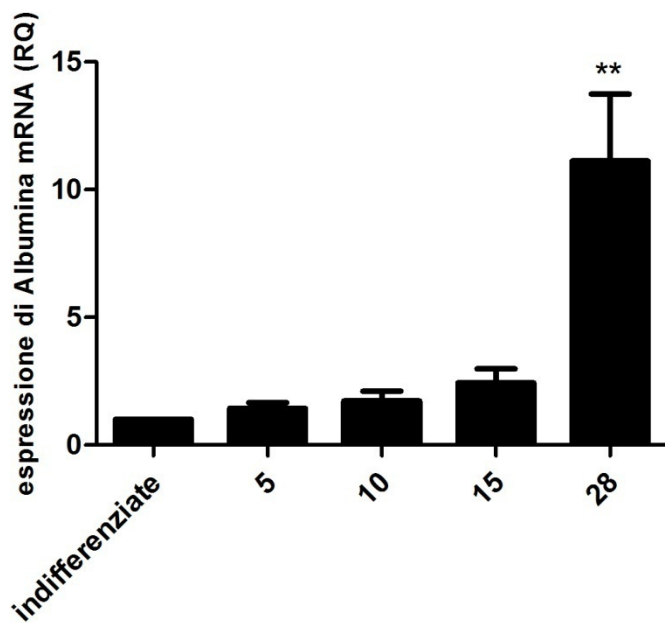


Fig.2

L'espressione dei markers di differenziamento epatico è stata analizzata a 5, 10, 15 e 28 giorni post differenziamento mediante qRT-PCR. L' α -fetoproteina era espressa già dal decimo giorno, gli altri markers genici cominciavano la loro espressione dal quindicesimo giorno, raggiungendo al ventottesimo giorno un significativo ed ascendente incremento della espressione della citocheratina-18, dell'albumina e del citocromo P450 2B6, differentemente da quelle indifferenziate che non esprimevano l' α -fetoproteina, ed avevano bassi livelli di albumina e citocheratina-18 e del citocromo p450 2B6 (Fig. 3).



Giorni di differenziamento



Giorni di differenziamento

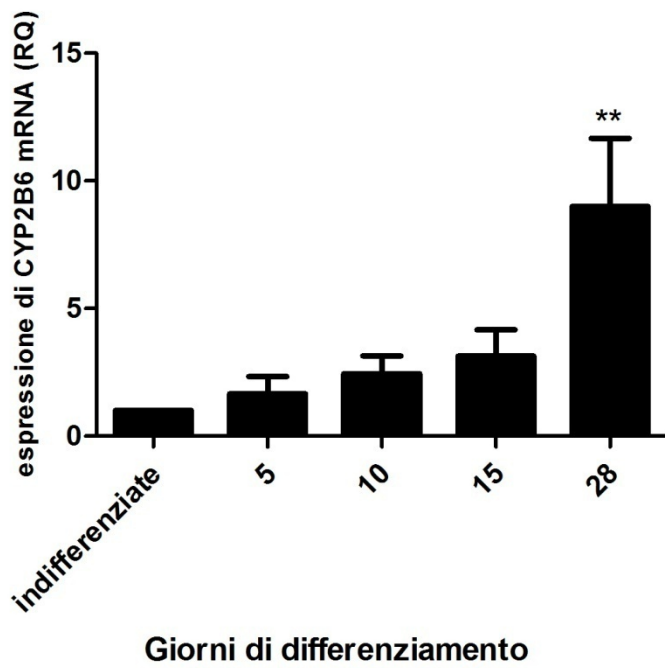
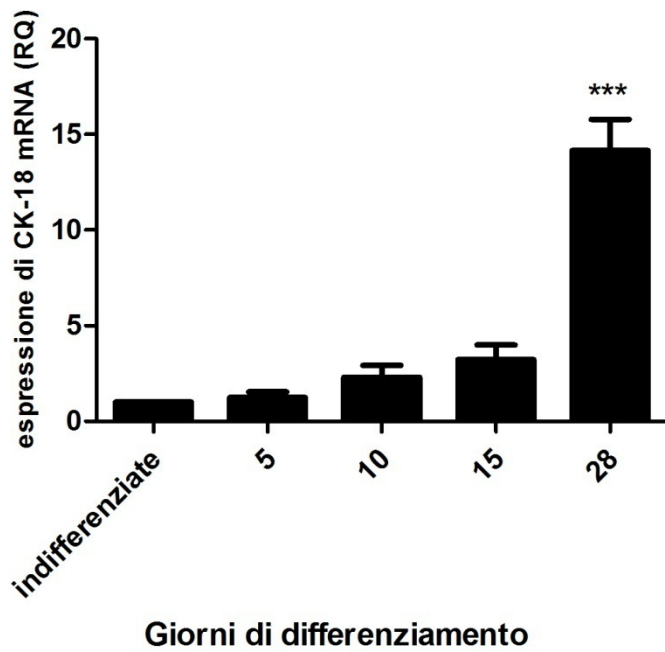


Fig. 3

Studio di funzionalità delle cellule epatiche differenziate

Per la valutazione in vitro della funzionalità degli epatociti ottenuti dal differenziamento delle hBM-MSCs sono stati determinati nei surnatanti di colture i livelli Albumina (metodica ELISA). Mentre il controllo risultava negativo per l'albumina (Fig. 4), le cellule differenziate mostravano un incremento della produzione di albumina dal decimo giorno raggiungendo un livello massimo e significativo al ventottesimo rispetto al controllo ($P < 0,0001$). Il controllo era rappresentato da cellule coltivate in condizioni standard.

Lo stato funzionale epatocitario era anche misurato con i livelli di Urea e di glicogeno depositato.

La produzione di urea incrementava, in modo tempo-dipendente, a partire dal quinto giorno dall'induzione del differenziamento, e risultava significativo dal quindicesimo giorno in poi (Fig. 5) rispetto al controllo.

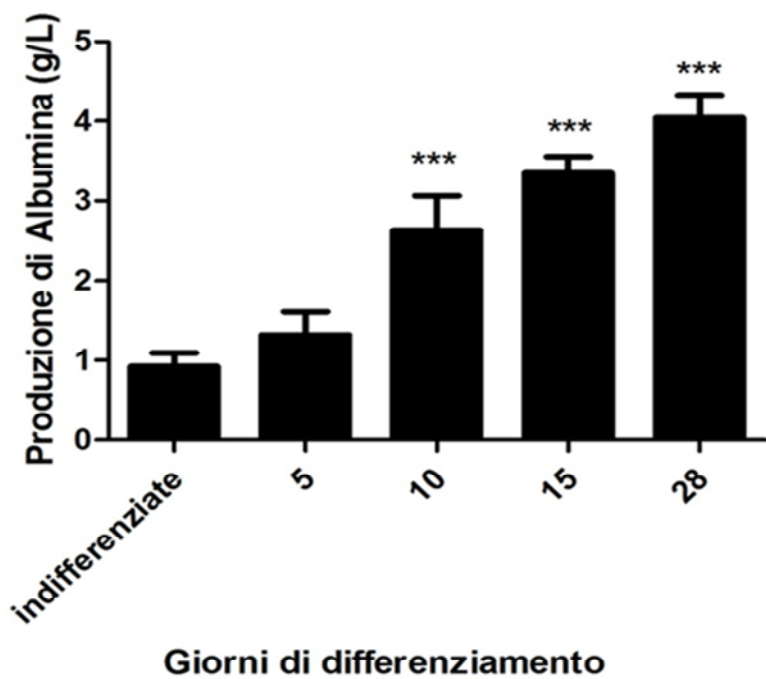


Fig. 4

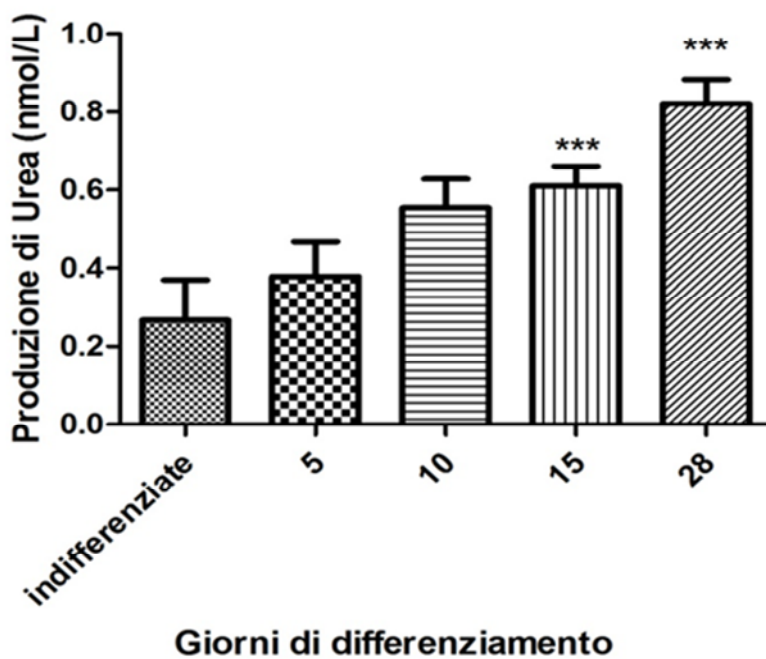


Fig. 5

La quantità di glicogeno prodotto è stata determinata mediante saggio colorimetrico ed è stata trovata incrementata significativamente ($P < 0.001$) dopo 28 giorni indicando che queste cellule erano capaci di accumulare glicogeno (Fig. 6).

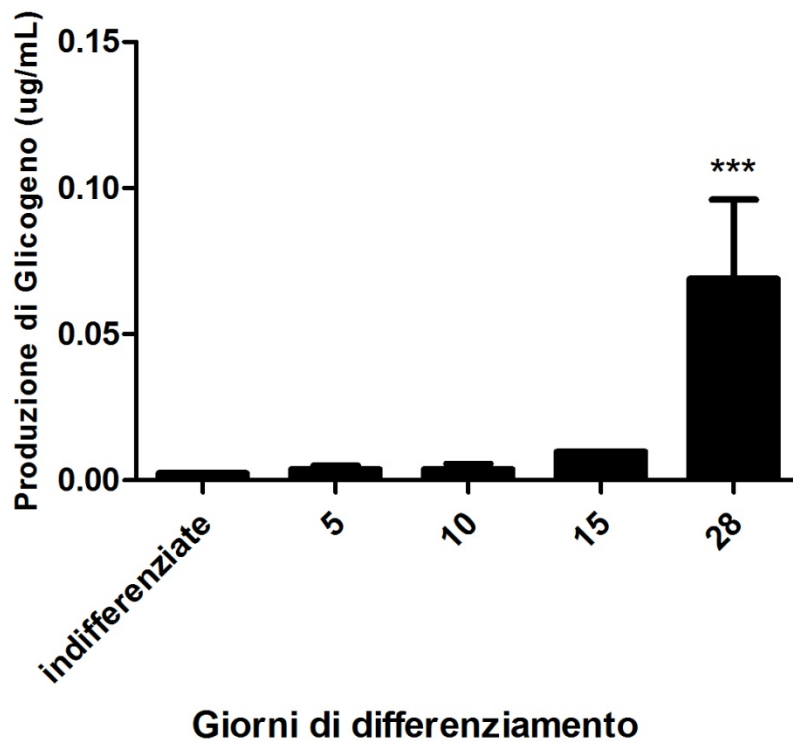


Fig. 6

DISCUSSIONE

Il midollo osseo è una fonte di cellule staminali e/o stromali plastiche cioè dotate di differenti capacità differenziative tessutali con importanti potenziali terapeutici [18, 19]. Il nostro studio evidenzia la capacità delle hBM-MSCs di differenziare in epatociti funzionalmente attivi.

Durante lo sviluppo embrionale fattori di crescita quali HGF e FGF sono indispensabili per lo sviluppo dell'endoderma, in particolar modo nello sviluppo del fegato [20, 21]. Il primo evento dopo una epatectomia è un significativo aumento dei livelli sierici di HGF [22], questo suggerisce che l'HGF gioca un ruolo chiave nell'epatogenesi. Anche l'oncostatina M, membro della famiglia delle interleuchine 6, riveste un ruolo importante nello sviluppo del fegato. In particolare, la proteina stimola la progressione della maturazione degli epatociti [23]. Il nostro protocollo di studio ha quindi previsto l'incubazione delle hBM-MSCs con i fattori di crescita HGF e FGF; e successivamente con l'oncostatina M, induttore di maturazione.

I primi segni della differenziazione sono stati morfologici, da spindle-shape, caratteristico delle BM-MSCs, ad una forma più cuboidale, pavimentosa, seguiti dalla espressione di markers epatocitari, quali AFP, Albumina, CK-18 e CYP2B6, che dopo 28 giorni dall'inizio del differenziamento risultavano incrementati in modo significativo. La funzionalità delle cellule epatiche differenziate è stata determinata dagli alti livelli di albumina, urea e glicogeno che incrementavano dopo 28 giorni post differenziamento.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che le cellule staminali mesenchimali di midollo osseo sono capaci di differenziare in epatociti funzionali, rappresentando una sorgente di epatociti da utilizzare e nella terapia trapiantologica autologa, in soggetti con epatopatia cronica o acuta, e allogenica, nonché nella terapia bioartificiale.

BIBLIOGRAFIA

1. Kawashita, Y., et al., *Liver repopulation: a new concept of hepatocyte transplantation*. Surg Today, 2005. **35**(9): p. 705-10.
2. Rajvanshi, P., et al., *Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 1092-1102.
3. Lloyd, T.D., et al., *Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking*. Cell Tissue Bank, 2003. **4**(1): p. 3-15.
4. Fox, I.J. and J. Roy-Chowdhury, *Hepatocyte transplantation*. J Hepatol, 2004. **40**(6): p. 878-86.
5. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-47.
6. Alison, M.R., et al., *Hepatic stem cells: from inside and outside the liver?* Cell Prolif, 2004. **37**(1): p. 1-21.
7. Petersen, B.E., et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. Science, 1999. **284**(5417): p. 1168-70.
8. Alison, M.R., et al., *Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 257.
9. Terada, N., et al., *Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 542-5.
10. Vassilopoulos, G., P.R. Wang, and D.W. Russell, *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. Nature, 2003. **422**(6934): p. 901-4.
11. Wang, X., et al., *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes*. Nature, 2003. **422**(6934): p. 897-901.
12. McTaggart, S.J. and K. Atkinson, *Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease*. Nephrology (Carlton), 2007. **12**(1): p. 44-52.
13. El-Badri, N.S., A. Maheshwari, and P.R. Sanberg, *Mesenchymal stem cells in autoimmune disease*. Stem Cells Dev, 2004. **13**(5): p. 463-72.
14. Bunnell, B.A., et al., *Potential application for mesenchymal stem cells in the treatment of cardiovascular diseases*. Can J Physiol Pharmacol, 2005. **83**(7): p. 529-39.
15. Kode, J.A., et al., *Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration*. Cytotherapy, 2009. **11**(4): p. 377-91.
16. Allen, T.D., T.M. Dexter, and P.J. Simmons, *Marrow biology and stem cells*. Immunol Ser, 1990. **49**: p. 1-38.
17. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.

18. Kakinuma, S., et al., *Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells*. *Stem Cells*, 2003. **21**(2): p. 217-27.
19. Oh, S.H., et al., *Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **279**(2): p. 500-4.
20. Jung, J., et al., *Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors*. *Science*, 1999. **284**(5422): p. 1998-2003.
21. Schmidt, C., et al., *Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development*. *Nature*, 1995. **373**(6516): p. 699-702.
22. Lindroos, P.M., R. Zarnegar, and G.K. Michalopoulos, *Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration*. *Hepatology*, 1991. **13**(4): p. 743-50.
23. Miyajima, A., et al., *Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. **11**(3): p. 177-83.