

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
SEZIONE DI ENDOCRINOLOGIA, ANDROLOGIA E
MEDICINA INTERNA
Dottorato di ricerca in Scienze Andrologiche e della Riproduzione Umana
Aspetti Endocrini, Genetici, Molecolari e Clinici
XXII CICLO

Dott.ssa Giulietta Romeo

**Studio degli aspetti bio-molecolari responsabili della
differenziazione di UCB-SC verso cellule insulino secernenti in
diverse condizioni sperimentali.**

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. R. D'Agata

Tutor:

Chiar.mo Prof. S. Travali

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

Indice	Pag. 1
Introduzione	Pag. 2
Cellule staminali e loro classificazione	Pag. 4
Il diabete: generalità	Pag. 7
Il pancreas:	Pag. 13
• Embriologia del pancreas	Pag. 13
• Marcatori bio-molecolari della Cellula	Pag. 14
• Funzione delle cellule pancreatiche	Pag. 18
• L'insulina	Pag. 19
• Regolazione della secrezione di insulina stimolata dal glucosio	Pag. 21
Scopo dello studio	Pag. 23
Materiali e metodi	Pag. 24
• Reclutamento e stoccaggio delle UBSC	Pag. 24
• Stadio 0: Arricchimento di cellule staminali	Pag. 24
• Congelamento e scongelamento delle cellule	Pag. 25
• Valutazione tramite citofluorimetria delle cellule ottenute	Pag. 26
• Colture cellulari e protocolli sperimentali	Pag. 27
• Conta delle cellule vitali	Pag. 32
• Test per la valutazione dell'espressione	Pag. 32
• Estrazione dell'RNA totale	Pag. 33
• Selezione dei primers e verifica della differente espressione genica attraverso RT-PCR.	Pag. 35
• RT-PCR	Pag. 35
• PCR	Pag. 35
• Real time RT- PCR	Pag. 36
• Immunocitochimica	Pag. 40
• Elisa Peptide C	Pag. 42
• Materiali	Pag. 43
Risultati:	Pag. 44
• Valutazione Citofluorimetrica e d'espressione della staminalità	Pag. 46
• Valutazione Microscopica e Conta delle cellule vitali	Pag. 46
• Test per la valutazione dell'espressione	Pag. 48
• verifica della differente espressione genica attraverso RT-PCR	Pag. 48
• La Real-Time RT-PCR	Pag. 52
• Immunocitochimica	Pag. 53
• Elisa Peptide C	Pag. 56
Conclusioni	Pag. 59
Bibliografia	Pag. 63

INTRODUZIONE

Le cellule staminali sono cellule umane neutre, non differenziate, presenti nel midollo osseo, nel cordone ombelicale, nell'embrione, che possiedono la caratteristica di poter essere "istruite" a trasformarsi teoricamente in qualsiasi cellula del corpo umano. La ricerca sulle cellule staminali è concentrata sull'obiettivo di riuscire a controllarne il differenziamento con lo scopo di ottenere cellule differenziate in uno qualsiasi dei tessuti di volta in volta necessario per fini terapeutici. Queste cellule forniscono importanti informazioni sui meccanismi di controllo genetico ed epigenetico dello sviluppo, e possono rendere attuali e reali trattamenti terapeutici per gravi malattie genetiche e per malattie degenerative come il Parkinson (*Brazelton*), il diabete, l'Alzheimer, l'infarto, il cancro.

Nel corso del dottorato la mia ricerca si è focalizzata sull'isolamento di cellule staminali, pluripotenti, recuperate dal sangue del cordone ombelicale per indurne differenziamento endodermico **in cellule *insulino secernenti e ricercare markers di espressione specifici***, segno di avvenuta differenziazione.

La produzione di insulina da parte di cellule staminali di derivazione cordonale o embrionale rappresenta una nuova prospettiva terapeutica efficace per il trattamento dei pazienti diabetici. Nel diabete, malattia cronica molto comune, l'iperglicemia è conseguente, infatti, ad una carente secrezione pancreatica od ad uno scarso effetto dell'insulina sugli organi bersaglio dovuti ad un'insufficiente secrezione di insulina od a un difetto di azione della insulina per cause differenti" (*Wild 2004, Hu 2001*).

CELLULE STAMINALI E LORO

CLASSIFICAZIONE

Una cellula staminale è definita progenitrice in grado di dare vita a cellule mature preposte allo svolgimento di funzioni specifiche all'interno di organi e tessuti del corpo umano. E' quella cellula che ha la capacità di proliferare indefinitamente mantenendosi in uno stato indifferenziato: può affrontare numerose duplicazioni senza dare segno di differenziamento o invecchiamento. Questa proprietà va sotto il nome di *self-renewal* o auto-rinnovamento (capacità di generare cellule con le medesime caratteristiche della cellula madre ad ogni duplicazione cellulare). Le cellule staminali sono da considerarsi una sorta di “sistema riparo” poichè possono teoricamente dividersi senza limiti per sostituire cellule danneggiate: in condizioni opportune e sotto segnali appropriati possiedono la potenzialità di *differenziarsi* in cellule mature di vari tessuti con funzioni, forme e caratteristiche specializzate. Per tale motivo potremmo così ottenere in laboratorio tutte le cellule del nostro organismo e sviluppare strategie di terapia sostitutiva per ricostruire tessuti danneggiati in maniera irreversibile da meccanismi patogenetici. Le cellule staminali in base alla loro **plasticità differenziativa** si distinguono in:

Pluripotenti, cellule in grado di dare luogo a tutti i tessuti di un individuo ma non agli annessi embrionali. Sono pluripotenti le cellule della massa interna della blastocisti, rivestita dal trofoblasto, dette anche *Cellule Staminali Embrionali*.

Multipotenti, cellule maggiormente differenziate rispetto alle precedenti, sono in grado di dare luogo a tutti i tipi cellulari del tessuto di appartenenza. Tipicamente vengono considerate multipotenti le cellule staminali dell'adulto.

Possono classificarsi in base al loro **grado di differenziazione o alla loro origine** in (*Denner 2007*):

Embrionali: totipotenti quindi capaci di dare origine a qualsiasi tipo di cellula. Esse possono essere isolate, estratte e coltivate in vitro; da poche decine di cellule, si possono ottenere linee di centinaia di milioni di staminali intatte. L'estrazione di queste cellule richiede la soppressione dell'embrione, che non supera mai i 14 gg dalla sua fecondazione (*Amit 2000, Bo Sun 2007*). Presentano un'elevata espressione del fattore trascrizionale Oct-4, dimostrato essere cruciale per il mantenimento proprio della "staminalità".

Di cordone ombelicale e della placenta: pluripotenti e vengono prelevate al momento del parto. Recenti lavori hanno dimostrato che l'umbilical cord blood (UCB) contiene in piccolissima percentuale anche cellule cordonali simil-embriionali (**UC-ES**) capaci di differenziarsi verso qualunque foglietto embrionario (*Zhao 2006, McGukin 2004, Denner 2007*). In Italia la crioconservazione delle cellule del cordone ombelicale per uso personale è vietata, sono presenti però banche del cordone a scopo di trapianto per malattie ematologiche maligne e non, dalle leucemie ai linfomi, alle anemie congenite come la talassemia.

Adulte: pluripotenti, presenti in molti e probabilmente in tutti gli organi dei mammiferi, anche se il loro numero si riduce con l'età. In passato si riteneva che soltanto i tessuti soggetti a continuo ricambio (sangue ed epiteli)

possedessero cellule staminali, necessarie per sostituire le cellule perse durante tutta la vita dell'individuo. Ciò spiegava come questi tessuti fossero soggetti principalmente a patologie di tipo proliferativo (tumori). Al contrario, i tessuti le cui cellule non si rinnovano (o si rinnovano con estrema lentezza) nella vita adulta (muscolo scheletrico e cardiaco, tessuto nervoso) erano ritenuti privi di cellule staminali e quindi prevalentemente soggetti a patologie di tipo degenerativo. E' ormai dimostrato che il sistema nervoso centrale e quello periferico contengono cellule staminali neurali, capaci di proliferare indefinitamente o quasi nelle opportune condizioni sperimentali e di generare i principali tipi cellulari del sistema nervoso quali neuroni e glia. Inoltre, anche il cuore, finora ritenuto incapace di rigenerazione, probabilmente contiene cellule staminali, capaci di generare nuovi cardiociti e forse anche cellule muscolari lisce ed endoteliali

Le cellule totipotenti hanno una spiccata capacità di moltiplicarsi e si differenziano facilmente nei vari tessuti e organi. Le cellule pluripotenti hanno una capacità di differenziazione più limitata ma il loro impiego non crea problemi di carattere etico (*Lakey 2002*). Infatti il dibattito non solo a livello nazionale ma anche internazionale si incentra soprattutto sulla liceità di produrre embrioni per ottenere cellule staminali da utilizzare a scopi terapeutici e sulla liceità di utilizzare embrioni già esistenti-prodotti per la fecondazione artificiale, e destinati a non essere trasferiti. Una alternativa alle opzioni sopra citate è quindi l'utilizzo delle cellule staminali pluripotenti contenute nel sangue del cordone ombelicale; tali cellule che sono predecessori di tutte le cellule ematopoietiche adulte (CD34+/CD38-) non prospettano alcun problema di tipo etico, sono cellule immediatamente disponibili (nessun tipo di

procedura chirurgica complessa per ottenerle), possiedono una grande versatilità; la loro immaturità immunologica diminuisce i problemi di rigetto (rispetto a fonti staminali quali il midollo osseo o il sangue periferico) .

DIABETE

GENERALITA'

In Italia i dati riportati nell'annuario statistico ISTAT 2009 indicano che è diabetico il 4,8% degli italiani (5% delle donne e 4,6% degli uomini), pari a circa 2.900.000 persone. Numeri che segnano un aumento rispetto all'indagine multiscopo del 1999-2000, secondo cui era diabetico il 3,7% degli italiani (4% le donne e 3,5% gli uomini). La prevalenza del diabete aumenta con l'età fino ad arrivare al 18,9% nelle persone con età uguale o superiore ai 75 anni. Per quanto riguarda la distribuzione geografica, la prevalenza è più alta nel Sud e nelle Isole, con un valore del 5,5%. Seguono il Centro con il 4,9% e il Nord con il 4,2%. Dal 1997 l'Associazione Diabetica AMERICANA (ADA) ha rivisto la classificazione precedente, in uso dal 1979, eliminando i termini insulino e insulinodipendente e i relativi acronimi *IDDM* (diabete mellito insulino.dipendente) e *NIDDM* (diabete mellito non insulino-dipendente), al loro posto vengono mantenuti i termini diabete di tipo 1 e diabete di tipo 2. Attualmente interessa circa 200 milioni di persone in tutto il mondo e si stima che possa aumentare fino a raggiungere i 350 milioni di persone affette nel 2025, secondo proiezioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (**OMS**).

Diabete di tipo 1: è condizionato da fattori genetici, che conferiscono una predisposizione a sviluppare la malattia, ma che, per provocarla, devono essere associati a fattori esogeni, soprattutto alcuni tipi di infezioni virali. Il diabete di tipo 1 è una malattia autoimmune, cioè che comporta la distruzione delle cellule del pancreas deputate alla produzione di insulina, da parte dello stesso

sistema immunitario del soggetto. La patologia è innescata dalla presenza di anticorpi chiamati self, definiti anticorpi anti-insulae pancreatiche che provocano l'attivazione di altre cellule del sistema immunitario, responsabili della distruzione delle insulae pancreatiche. Lo sviluppo dell'autoimmunità è favorito da un fattore scatenante, come può essere un'infezione virale.

Diabete primario di tipo 2: i fattori genetici svolgono un ruolo chiave nella sua insorgenza. Non esiste alcuna relazione tra diabete di tipo 2 e disregolazione del sistema immunitario. Si è visto che in questa malattia la prima alterazione riconoscibile è una resistenza del tessuto muscolare all'azione dell'insulina, che comporta un'iperglicemia e, di conseguenza, uno stimolo ad un'aumentata produzione di insulina (che contrasta l'aumento dei livelli glicemici). Tuttavia, in questo tipo di diabete, la funzione delle insulae pancreatiche non è normale e declina con il tempo. Questo declino inizia circa 10 anni prima che venga diagnosticato il diabete, il che avviene quando la funzione delle cellule è ridotta intorno al 30% del normale. La secrezione insulinica non può più compensare la resistenza a tale ormone e la malattia metabolica diviene evidente. L'insorgenza del diabete di tipo 2, è dovuta a: resistenza del tessuto muscolare all'insulina, che si trova ad essere iperstimolata, ed al declino con il tempo della funzione delle cellule pancreatiche. Hanno grande importanza anche l'aumento di peso corporeo, che comporta una maggiore sintesi di trigliceridi, che si accumulano nelle cellule pancreatiche determinando una diminuita funzione. La perdita di peso e l'esercizio fisico ostacolano l'insorgenza del diabete di tipo 2. Infine, è dimostrato che l'invecchiamento contribuisce a rendere manifesto il difetto genetico alla base del diabete di tipo 2.

Diabete secondario: nelle forme con alterazioni endocrine l'iperglicemia è dipendente dalla eccessiva produzione di ormoni ad attività controinsulare: cortisolo (o corticosteroidi di altro tipo somministrati a fini terapeutici), GH, ormoni tiroidei, adrenalina.

Il diabete è la sesta causa di morte nei paesi sviluppati e questo fa sì che sia necessario un enorme impiego di risorse economiche per poter ottenere una cura definitiva. Attualmente il trattamento per il diabete di tipo 1 consiste nella somministrazione di insulina, e anche se questa terapia diminuisce e ritarda la comparsa delle complicanze, ci sono svantaggi come la necessità di un frequente controllo della glicemia, iniezioni continue, episodi di ipoglicemia e complicanze a lungo termine dovute alla mancanza di precisione del controllo dei livelli di glucosio ematico. Per questa ragione c'è la necessità di trovare una nuova terapia alternativa per il trattamento del diabete mellito. Il trattamento del diabete mellito di tipo 1 (DM1) suppone la somministrazione di insulina esogena per rimpiazzare la perdita di insulina nella circolazione sanguigna, e prevenire lo sviluppo di una potenziale chetoacidosi letale (*Faich 1983, Martin 1998*). Oltre al trattamento con somministrazioni giornaliere di insulina, nel corso degli anni si è cercato di trovare nuove soluzioni per la cura ed il trattamento del diabete, soprattutto che potessero servire da soluzione definitiva. Il trapianto di pancreas viene attualmente eseguito in pazienti diabetici insulino dipendenti, allo scopo di rendere disponibile al paziente un organo che sia in grado di rilasciare insulina in base ai livelli glicemici. Questa "regolazione" della secrezione insulinica costituisce il vantaggio principale del trapianto di pancreas rispetto alla terapia insulinica tradizionale. Il trapianto di insulae pancreatiche, Protocollo di Edmonton, entrato nella sperimentazione

clinica all'inizio degli anni 90 (*Shapiro*), usando un trattamento immunosoppressivo senza glucocorticoidi, ha dato buoni esiti nella terapia cellulare del diabete, ottenendo la normalizzazione dei livelli di glucosio ematico per un periodo di un anno. Un nuovo metodo per estrarre le cellule che producono insulina è stato messo a punto dal Prof. Camillo Ricordi, e consente di trapiantare solo le insulae del pancreas e non l'intero organo. Il "metodo Ricordi" è una tecnica di purificazione delle cellule del pancreas che producono insulina: un intervento meno invasivo rispetto al trapianto di pancreas, che permette ai pazienti che soffrono di una grave forma di diabete di ritornare ad una buona qualità della vita. Il principale inconveniente di questi tipi di trattamento è la mancanza di organi disponibili, giacché tali organi derivano da donatori cadaveri, e per ottenere un numero sufficiente di isole di Langerhans da trapiantare, sono necessari almeno due donatori per paziente, e quindi il numero dei donatori è nettamente inferiore a quello dei riceventi. Un altro inconveniente di queste terapie è dato dalla necessità di un trattamento immunosoppressore per la prevenzione del rigetto. E' indispensabile allora trovare un modo per avere a disposizione la "materia prima" delle isole pancreatiche in modo sufficiente a coprire quello che potrà essere il loro effettivo fabbisogno (*Beattie 1999, Butler 2007, Choi 2004*). Una delle vie possibili da seguire è quella delle cellule da animali, ma ancora comporta il problema del rigetto. Una via più promettente è quella di poter ricavare cellule dalle cellule staminali.

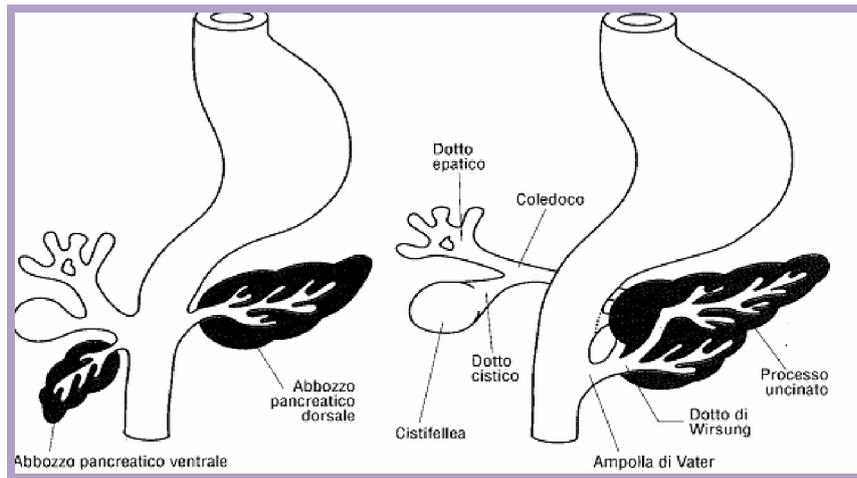
Tab.1 :Classificazione del Diabete

<p>Tipo 1</p>	<p>Caratterizzato dalla distruzione delle betacellule, di solito porta ad una insulino-deficienza assoluta. ha due forme:</p> <p>Diabete Mellito Immuno-Mediato (Immune-Mediated Diabetes Mellitus): Risulta da una distruzione mediata autoimmune delle beta cellule del pancreas.</p> <p>Diabete Mellito Idiopatico (Idiopathic Diabetes Mellitus): Riferito a forme della malattia che non hanno eziologia conosciuta.</p>
<p>Tipo 2</p>	<p>Disturbo di insulino resistenza che usualmente ha una relativa (anziché assoluta) insulino-deficienza.</p> <p>Può variare da un'insulinorestenza predominante con una insulino-deficienza relativa ad una insulino-deficienza predominante con qualche insulino resistenza.</p>
<p>Alterata Omeostasi Glicemica (IGH)</p>	<p>Stato metabolico intermedio tra omeostasi glicemica normale e diabete. Fattore di rischio per il diabete e malattie cardiovascolari.</p> <p>Alterata Glicemia a Digiuno (IFG: Impaired Fasting Glucose) Glicemia a digiuno superiore alla norma, ma non patologica.</p> <p>Alterata Tolleranza al Glucosio (IGT: Impaired Glucose Tolerance) Glicemia superiore alla norma, ma non patologica, a seguito della somministrazioni di 75grammi di glucosio.</p>
<p>Diabete Mellito Gestazionale (GDM)</p>	<p>Intolleranza al glucosio in gravidanza.</p> <p>La definizione è rimasta invariata rispetto a prima.</p>
<p>Altri tipi specifici</p>	<p>Diabete causato da altre eziologie identificabili.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Difetti genetici della funzione delle cellule beta (p.e., MODY 1, 2, 3) 2. Difetti genetici dell'azione dell'insulina 3. Disturbi del pancreas esocrino (p.e., cancro del pancreas, cisti fibrosa, pancreatite) 4. Endocrinopatie (p.e., di Cushing) 5. Indotto da farmaci o agenti chimici (p.e., steroidi) 6. Infezione (p.e., rubella, Cocksackie, CMV) 7. Forme non comuni di diabete immuno-correlato 8. Altre sindromi genetiche

PANCREAS

Embriologia del pancreas

Il pancreas maturo nasce dalla fusione di due abbozzi ghiandolari embrionari, chiamati pancreas ventrale e pancreas dorsale dalla loro posizione rispetto al duodeno primitivo (Fig.1) (*Edlund 2001; Wilson 2003*). Le gemme pancreatiche dorsali e ventrali si fondono e alcune cellule si differenziano verso un fenotipo esocrino formando i dotti ramificati e gli acini. Al 3° mese di gravidanza è possibile distinguere istologicamente gli acini e i dotti pancreatici; i precursori delle cellule endocrine migrano a partire da tale epitelio e si aggregano formando clusters interstiziali nel mesenchima adiacente l'epitelio duttale. In questa fase dello sviluppo pancreatico le neoisole di Langerhans in formazione non presentano ancora l'architettura tipica di un isolotto pancreatico maturo e non contengono ancora tutti i tipi cellulari tipici di questo orfanello endocrino in quanto mancano ancora le cellule PP, le quali appaiono poco prima della nascita. Nei giorni successivi le cellule si separano dalla matrice esocrina, aumentano di numero e si organizzano per formare gli isolotti maturi. La distribuzione caratteristica delle cellule nella parte centrale dell'isolotto e della cellula che non esprime insulina nella periferia, si stabilisce solo alla fine della gestazione (*Herrera*). Dopo la nascita il pancreas sviluppa la capacità di essere sensibile al glucosio e di regolare la secrezione di insulina in base ai livelli di quest'ultimo (*Boschero 1993*).



(Fig.1)

Marcatori bio-molecolari della Cellula

Numerosi fattori di trascrizione implicati nella proliferazione dei progenitori endocrini pancreatici (**Tab 2**) sono stati oggetto di studi che hanno portato alla caratterizzazione dei precursori cellulari endocrini e allo stato di sviluppo delle cellule durante la loro differenziazione (**Fig.2;tab1**).

PDX-1/IPF-1: Segnali provenienti dalla notocorda agiscono, sulla gemma dorsale inducendo l'inibizione di sonic hedgehog (shh), un regolatore negativo di PDX-1, fattore di trascrizione chiave dello sviluppo pancreatico (*Hebrok 2000*). Gioca un ruolo doppio durante l'organogenesi del pancreas:

- in uno stadio precoce è essenziale per lo sviluppo del pancreas ed in seguito la sua espressione si restringe alle cellule che sono destinate a divenire mature.
- è coinvolto anche nell'espressione dell'insulina e della somatostatina (*Hui 2002, Itkin-Ansari 2000*), oltre che in un gran

numero di geni della cellula differenziata, come ad esempio: glut-2; glucochinasi e il polipeptide amiloide dell'isolotto.

Si è visto che topo e uomo che non esprimono Pdx-1 non sviluppano il pancreas, indicando che questo è un fattore chiave per lo sviluppo pancreatico (*Offield 1996*). Studi di inattivazione genica specifica del tessuto hanno dimostrato che è necessario per le fasi successive della differenziazione pancreatico e nel mantenimento della funzione dell'isolotto pancreatico maturo (*Ahlgren, 1998*). Il PDX-1 è un marcatore per la linea pancreatico in generale.

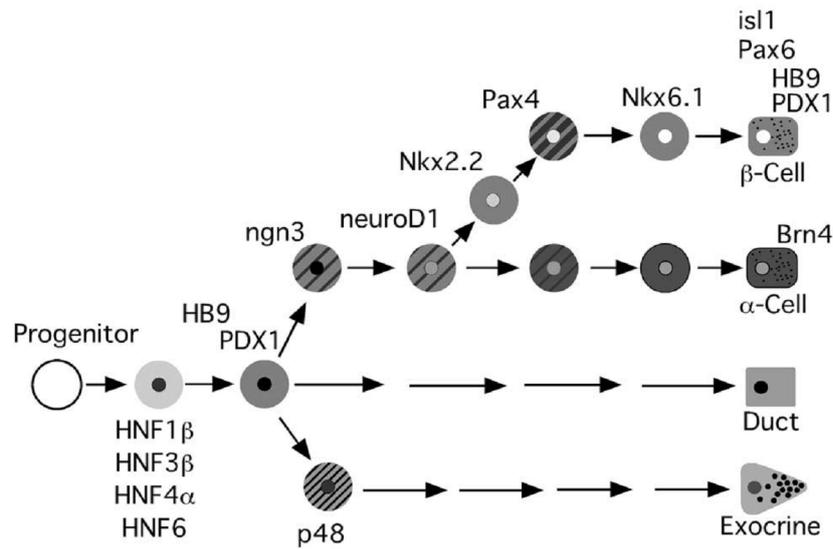
Isl-1 e Hlxb9:delezione di questi geni hanno messo in evidenza che lo sviluppo delle gemme pancreatiche dorsali e ventrali sono indipendenti, e richiedono gruppi differenti di fattori di trascrizione. Mutazioni in ognuno di questi geni blocca lo sviluppo della gemma dorsale, ma non la crescita della gemma ventrale, dato questo che fornisce marcatori utili per seguire lo sviluppo della gemma dorsale (*Li 1999, Ahlgren 1998*).

Ngn-3:L'espressione di Ngn-3, indotta da Hnf6, serve da marcatore dei precursori cellulari endocrini. Topi knockout per Ngn-3 non generano nessuna cellula endocrina pancreatico e muoiono dopo la nascita per diabete (*Jacquemin 2000*). Ngn-3 non si riscontra in cellule dell'isolotto maturo, tuttavia è co-espresso con altri fattori dell'isolotto come **Nkx2.2 o Nkx6.1**, suggerendo che la sua espressione è limitata a cellule pancreatiche endocrine immature (*Sevita 2004, Gu 2002*).

Pax-6: fattore di trascrizione che si esprime in un sottogruppo di cellule endocrine durante lo sviluppo pancreatico precoce così come nel pancreas endocrino maturo. Topi knockout per Pax-6 non possiedono cellule β , suggerendo che questo fattore è essenziale per la differenziazione di questo fenotipo cellulare (*Boyer 2005*).

Pax-4: è espresso esclusivamente nelle isole in fase di sviluppo e non si evidenzia negli isolotti pancreatici adulti (*Dohrmann 2000*). Topi deficienti per Pax-4 sviluppano diabete severo alla nascita poiché gli isolotti presentano una deficienza di cellule β e δ , congiuntamente ad un incremento della popolazione di cellule α (*Sosa-Pineta 1997*).

Nkx-6.1 – Nkx-2.2: geni che codificano per proteine dell'omeodominio NK, Nkx-6.1 ed Nkx-2.2, che giocano un ruolo nella differenziazione endocrina. Dagli studi genetici effettuati su questi fattori di trascrizione espressi in momenti definiti dello sviluppo del pancreas e della sua differenziazione in pancreas endocrino, hanno permesso di evidenziare importanti marcatori genetici utili al fine di definire lo stato di differenziazione dei precursori pancreatici. Malgrado ciò si sa che l'espressione di questi marcatori non è sempre specifica dei precursori pancreatici precoci, giacché sono presenti anche a livello del sistema nervoso centrale maturo (*Butler 2007*).



(Fig.2)

Tab.1: Principali fattori di trascrizione coinvolti nello sviluppo pancreatico

Fattori di trascrizione	Pancreas adulto
HNF-3β	Tutte le cellule
HNF-3a	Cellule endocrine
HLxb9	Cellule β
PDX-1/IPF-1	Cellule β
HNF6	Tutte le cellule
Pax4	Bassa nelle isole
Pax6	Cellule endocrine
Isl-1	Isole
Nkx2.2	Cellule δ, β, PP
Nkx6.1	Cellule β
Ngn3	Non espresso
β ₂ /neuroD	Isole
HNF-1	Cellule β

**modificata da V. Sordì et al. "Le cellule staminali nella terapia del diabete".*

Tab: 2 Espressione genica durante l'embriogenesi pancreatica

	Early pancreatic development	Endocrine cells precursors	Transition to B-cell	B-cell
Nestina	+	+	+	+
Pdx-1	+	-	-	+
Ngn-3	-	+	+	-
Isl-1	-	+	+	-
Pax-6	-	+	-	-
Pax-4	-	-	+	-
B2/neuroD	-	-	+	-
Nkx2	-	-	-	+
Nkx6	-	-	-	+
Glut2	-	-	-	+

“In vitro differentiation of pancreatic beta cells into insulin producing cells “ Soria 2001

Funzione delle cellule pancreatiche

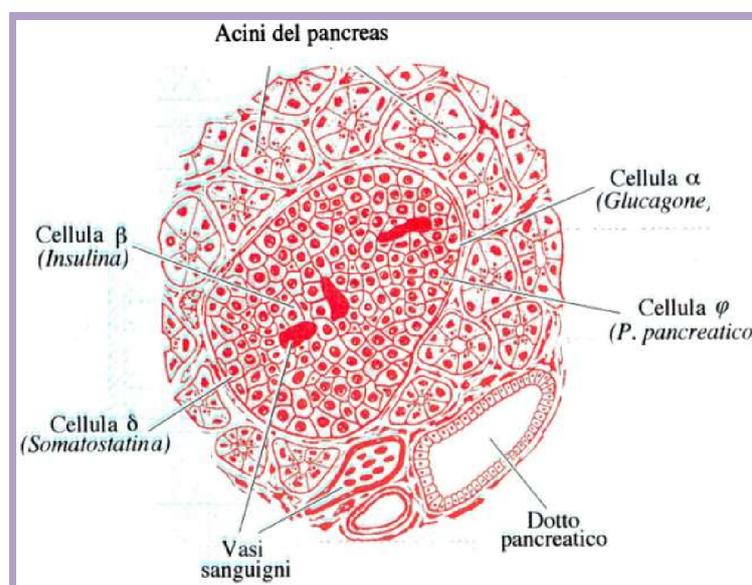


Fig.3

Il pancreas adulto è composto da tre tipi di tessuto: le cellule esocrine, i dotti e le isole pancreatiche composte a cellule insulino-secerneti (cellule), glucagone (cellule), somatostatina (cellule) e il polipeptide pancreatico (PP) (Fig.3).

Le cellule secernenti insulina costituiscono il 60-70% della popolazione cellulare delle isole di Langerhans e sono situate al centro dell'isolotto pancreatico;

Le cellule α , produttrici di glucagone (15% della massa dell'islotto) sono situate nella periferia dell'islotto. Le cellule δ , produttrici di somatostatina (5%), sono localizzate congiuntamente con le cellule produttrici del polipeptide pancreatico (10%), sono situate tra le cellule α e β (*Soria 2001*). La prima funzione della cellula beta è quella di secernere quantità appropriate di insulina in risposta a nutrienti, ormoni e stimoli nervosi (*Martin 1998, Pertusa 1999*) per mantenere livelli di glucosio nel plasma in un intervallo fisiologico preciso per consentire un funzionamento ottimale di tutti i tessuti del corpo.

L'insulina

Il gene dell'insulina umana è situato nella regione p15.5 del braccio corto del cromosoma 11 (*Orci 1992*), consta di 3 esoni e 2 introni. A differenza della maggior parte dei mammiferi, topi e ratti esprimono due geni non allelici che codificano per la proinsulina I e II (*Soares 1995*). Da analisi mutazionali di varie regioni del promotore del gene per l'insulina, si identificarono vari elementi potenziatori di trascrizione (enhancers) (A,E,C1 e Z) che operano in *cis* e che sono necessari per l'espressione del gene dell'insulina. Questi elementi enhancers, ai quali si uniscono i fattori di trascrizione (*Melloul 2002*), sono altamente conservati in varie specie, suggerendo, la presenza di un meccanismo regolatore comune che controlla l'espressione del gene dell'insulina.

L'insulina è un ormone proteico costituita da due catene polipeptidiche, chiamate A e B connesse da ponti disolfuro, che nella maggior parte dei vertebrati contiene 21 e 30 amminoacidi rispettivamente, un terzo ponte è presente nella catena A. La trascrizione del gene dell'insulina è regolato da

elementi “cis” multipli che sono localizzati in una regione relativamente vicina, a monte rispetto al sito di inizio della trascrizione. Il metabolismo del glucosio e il calcio intracellulare modulano l’attività di unione di numerosi fattori di trascrizione al DNA, che riconoscono differenti elementi della regione del promotore dell’insulina (*Ahlgren 1998*).

La proteina è sintetizzata come precursore, la preproinsulina, altamente conservata nelle differenti specie animali. Staccato il peptide di segnale (24aa) rimane la proinsulina, costituita da una singola catena di 86aa formata dalle catene A e B dell’insulina e da un segmento di connessione di 35 aa che viene successivamente staccato nell’apparato di Golgi dove si formano i granuli di secrezione. In questo processo il peptide perde 2 aminoacidi basici a ciascun sito di clivaggio dando origine a una molecola di 31 aa denominata peptide C, biologicamente inattiva. Questo processo richiede presenza di ATP e l’azione di due endopeptidasi specifiche, la proconvertasi, PC1/3 e PC2, che sono localizzati dentro due granuli di secrezione. Il granulo di secrezione migra verso la membrana plasmatica e si fonderà con questa attraverso un processo mediato da un gruppo di proteine altamente conservate che formano parte del macchinario di esocitosi, conosciute come SNAREs (*Martin 1998*). Al termine del processo di esocitosi il contenuto delle vescicole di secrezione viene liberato nello spazio extracellulare in maniera finemente regolata, in risposta a stimoli specifici. I granuli di secrezione maturi contengono Insulina e peptide C in concentrazione equimolare e piccole quantità di proinsulina che entrano in circolo (*Faglia 1997*). La determinazione del C-peptide può essere interessante poiché la relazione insulina/C-peptide è costante e la sua vita media è maggiore.

Regolazione della secrezione di insulina stimolata dal glucosio

Le cellule pancreatiche sono l'unico tipo di cellula che collega il metabolismo dei nutrienti con l'attività elettrica e la sintesi e la liberazione di insulina. L'aumento nel sangue dei livelli di glucosio e di altri nutrienti, come amminoacidi e acidi grassi, ha effetto sull'attività secernente della cellula (*Roche 2003, Pertusa 1999*). A questa catena di eventi si dà il nome di "accoppiamento stimolo-secrezione". Gli ormoni ed i neurotrasmettitori agiscono sulla cellula modulando la risposta secretoria indotta dai nutrienti. L'efficacia della cellula come sensore del glucosio è dovuta al trasportatore di glucosio di tipo 2 (Glut-2), ed a un enzima, la glucochinasi (GK). La cellula attraverso la membrana plasmatica può trasportare grandi quantità di glucosio mediante il trasportatore **GLUT-2**. Una delle caratteristiche più importanti di questo trasportatore è la sua elevata K_m , cioè funziona efficientemente soltanto quando i livelli del glucosio sono elevati, il che permette un rapido equilibrio tra la concentrazione di glucosio extracellulare e quella citosolica. Per poter connettere questo meccanismo di entrata del glucosio con il metabolismo, l'enzima GK fosforica il glucosio, permettendo la sua entrata nel ciclo della glicolisi. Seguendo la fosforilazione il meccanismo enzimatico della cellula metabolizza il glucosio per mezzo della via ossidativa, portando ad un aumento della produzione di ATP mitocondriale. L'incremento del rapporto ATP/ADP e della diadenosina polifosfato nella cellula, provoca la chiusura del canale del potassio ATP dipendente (*Martin 1998*). Questo canale presente nella membrana plasmatica della cellula è formato da una proteina che crea un poro (**Kir-6.2**) e una subunità regolatrice, la proteina accettrice di sulfonilurea (**Sur-**

1). Questo complesso gioca un ruolo molto importante nella risposta di secrezione, giacché la chiusura del canale, inibendo il flusso di potassio, provoca la depolarizzazione della membrana e l'attivazione dei canali del Ca^{2+} a voltaggio dipendenti permettendo così l'entrata di calcio extracellulare all'interno della cellula, il quale provocherà l'esocitosi delle vescicole contenenti insulina (*Pertusa 1999, Soria 2001*). I segnali derivati dal metabolismo del glucosio e dal cambio nella concentrazione intracellulare di Ca^{2+} sono cruciali per le distinte funzioni della cellula :

- 1) regolazione della trascrizione del gene dell'insulina;
- 2) processamento verso l'insulina matura;
- 3) stimolo dell'esocitosi;
- 4) regolazione della risposta secretoria ad altri stimoli della cellula (*Leibowitz 2003*).

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del progetto di ricerca è stato quello di individuare un protocollo sperimentale che, utilizzando cellule staminali di facile reperibilità quali quelle prelevate dal cordone ombelicale UCB-SC (Umbilical Cord Blood Stem Cell), poste in coltura con fattori di crescita essenziali, favorisca lo sviluppo delle cellule beta pancreatiche.

Ottenere cellule beta pancreatiche risulta essere una tappa di fondamentale importanza per le future terapie del Diabete.

Nel nostro studio abbiamo valutato gli aspetti bio-molecolari responsabili della differenziazione verso cellule insulino secernenti in diverse condizioni sperimentali. Il protocollo da noi messo a punto precedentemente è stato modificato al fine di individuare il “microambiente” ideale per la loro differenziazione.

MATERIALI E METODI

Reclutamento e stoccaggio delle UBSC: Con la collaborazione delle unità di ginecologia degli ospedali Vittorio Emanuele e Cannizzaro, previo consenso informato delle pazienti, si è proceduto alla raccolta del sangue cordonale. Sono state escluse le donne HCV, HBV o HIV positive. Il contenuto della sacca, entro massimo 12 ore, è stato processato utilizzando il metodo della separazione linfocitaria a gradiente con Ficoll Hypach (soluzione contenente destrano a bassa viscosità che permette la separazione dei linfociti in base alla diversa densità sia rispetto al Ficoll, che rispetto agli eritrociti ed ai granulociti). Il sangue, viene lentamente stratificato sulla soluzione di Ficoll posta all'interno di una provetta e successivamente centrifugato per un breve periodo di tempo. A causa della loro densità, i linfociti si localizzano nell'interfaccia tra il plasma ed il Ficoll, assieme alle cellule di nostro interesse: linfociti, piastrine, monociti e *cellule staminali progenitrici* (Fig 4). I linfociti vengono poi recuperati dall'interfaccia e trattati per eliminare ogni residuo di piastrine, Ficoll e plasma eventualmente rimasti nella soluzione.

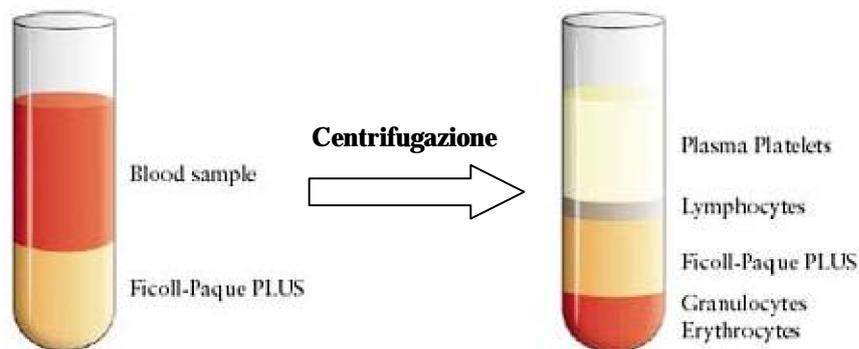


Figura 4. Formazione dei diversi strati di cellule dopo la centrifugazione con Ficoll.

Il protocollo è stato così standardizzato: 18 ml di sangue di cordone precedentemente trasferito in apposite falcon da 50 ml vengono stratificati lentamente su 9 ml di Ficoll presente sul fondo di una provetta falcon da 50 ml (tenendo la provetta in posizione quasi orizzontale): in questo modo si favorisce una separazione ottimale dei linfociti dalle altre cellule del sangue.

Le provette vengono centrifugate per 700 x g x 30 minuti: con questa centrifugazione si ottiene la separazione dei linfociti, con la formazione di un anello biancastro nell'interfaccia tra il plasma ed il Ficoll. Si preleva con cura l'anello dei linfociti. Raccogliere i linfociti recuperati in una nuova falcon e aggiungere un volume di PBS necessari per lavare i linfociti. Centrifugare 10 minuti a 1400 rpm. Eliminare il supernatante perché i linfociti sono sedimentati sul fondo. Le cellule così recuperate possono essere utilizzate per la fase di recupero delle sole cellule staminali.

Stadio 0: Arricchimento di cellule staminali: Dopo aver processato la sacca si procede all'isolamento delle cellule staminali progenitrici dal rimanente pool cellulare tramite separazione di tipo immunomagnetico "Negative lineage" (*Forraz 2004*). Tale procedura prevede il passaggio delle cellule su una colonna, durante l'eluizione le cellule più differenziate si legano grazie ad una reazione immunologica agli anticorpi magnetizzati presenti nella colonna (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66 e glicoforina A) cosicché le cellule della linea matura restano attaccate alla stessa mentre le cellule staminali progenitrici possono essere recuperate per eluizione poiché non possiedono gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi coniugati ai magneti fissati alla matrice metallica. Alla fine dell'eluizione da colonna la

popolazione cellulare è prevalentemente costituita da cellule staminali progenitrici.

Congelamento e scongelamento delle cellule:

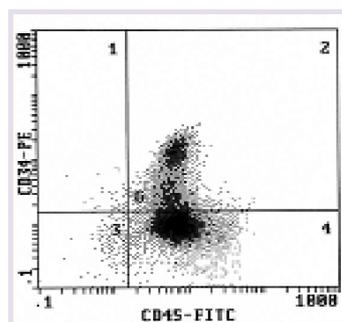
La sospensione cellulare ottenuta viene centrifugata a 1000rpm x 5 minuti, si elimina il surnatante ed il pellet cellulare viene risospeso nel medium di congelamento (RPMI 40% ,FBS 50% e DMSO 10%) in modo da ottenere 10^6 cellule/ml. Le cellule risospese nel medium di congelamento vengono quindi trasferite in criovials e quindi poste a -80°C per un periodo non superiore a tre mesi o in azoto liquido.

Le cellule sono scongelate in bagno termostato a 37°C , il più rapidamente possibile. Le cellule vengono piastrate in 12 multi wells con medium idoneo per l'esperimento da eseguire.

Valutazione tramite citofluorimetria delle cellule ottenute:

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette di visualizzare la quantità di cellule esprimenti positività per alcuni antigeni di superficie, quali il **CD34 marker di staminalità**: L'antigene CD34 è una fosfoglicoproteina monomerica di membrana di circa 110 kDa, il cui tratto extracellulare contiene due distinte regioni. La regione prossimale alla membrana, di circa 110 aminoacidi, verosimilmente acquisisce una conformazione globulare. La regione NH₂-terminale, di circa 140 aminoacidi, è intensamente glicosilata con due glicani legati entrambi al radicale N- e con i carboidrati sialilderivati sul radicale O-, e probabilmente espone una struttura simile ad una asta estesa tipica delle glicoproteine mucino-simile. L'antigene CD34 si ritrova sulle cellule progenitrici ematopoietiche di tutte le linee così come la maggior parte delle cellule staminali primitive totipotenti. L'antigene CD34 ha la sua massima espressione sulla maggior parte delle cellule staminali primitive e viene gradualmente perso quando le cellule progenitrici predestinate della linea si differenziano. (Instrumentation Laboratory CD34 181422). **(Fig. 5)** Nel citofluorimetro le cellule in sospensione passano in singola fila attraverso un volume illuminato dove esse riflettono/rifrattono la luce ed emettono fluorescenza che viene raccolta, filtrata e convertita ad un valore digitale che viene inviato al computer. Il citofluorimetro a flusso è costituito da una componente fluidica, una ottica e una elettronica. Il pool di cellule atte a differenziarsi è stato quindi esaminato dopo l'eluzione su colonna con i risultati riassunti in tabella **(tab. 3)** e in figura:

Fig. 5



Tab 4: Valutazione al Citofluorimetro	CD	PERCENTUALE
G1	+ CD34/-CD45	0.8
G2	+ CD34/ + CD45	31.7
G3	- CD34/ - CD45	1.31
G4	- CD34/ +CD45	66.1

(tab. 3)

Culture cellulari e protocolli sperimentali

Sono state avviate dalla stesso pool di cellule staminali progenitrici diverse colture:

- **UCB-SC senza Fattori di Crescita:** le cellule sono mantenute in coltura con solo Stem Span medium (SS).
- **UCB-SC con Fattori di Crescita :** le cellule sono mantenute in coltura nelle condizioni e nei tempi riportati in tabella (tab.3) .
- **UCB-SC con Fattori di Crescita + Acido Retinoico:** le cellule sono mantenute in coltura nelle condizioni e nei tempi riportati in tabella (tab.3) a partire dallo Stage II. Nell'embriologia del pancreas svolge un ruolo cruciale nel definire quale porzione dell'endoderma si trasformerà in pancreas. E' stato utilizzato ad una concentrazione di 2 μ M.

- **UCB-SC con Fattori di Crescita + DMSO:** le cellule sono mantenute in coltura nelle condizioni e nei tempi riportati in tabella (tab.3) a partire dallo Stage II. Rappresentano il controllo negativo delle cellule trattate con l'acido retinoico in quanto disciolto in esso.
- **UCB-SC con Fattori di Crescita + ECM (matrice extracellulare):** le cellule sono mantenute in coltura nelle condizioni e nei tempi riportati in tabella (tab.3) a partire dallo Stage II. ECM gel (Sigma- Aldrich). La maggior parte delle molecole che regolano lo sviluppo e le funzioni cellulari sono rappresentate da fattori di differenziazione, di crescita, molecole di adesione e componenti della matrice extracellulare. In biologia, la matrice extracellulare costituisce ciascuna parte di un tessuto che non sia il componente di una cellula. La matrice extracellulare è, in particolare, l'elemento distintivo del tessuto connettivo. I maggiori costituenti dell'ECM sono collagene, proteoglicani e glicoproteine non collagene. Dati riportati in letteratura dimostrano che questa matrice favorisce la formazione di cluster di cellule maggiormente differenziate rispetto alle cellule trattate senza ECM (*Chinese Medical Journal 2008*, GAO Feng, WU De-quan, HU Yan-hua and JIN Guang-xin).
- **UCB-SC con Fattori di Crescita + cellule del Sertoli microincapsulate in sferule di alginato:** le cellule sono mantenute in coltura nelle condizioni e nei tempi riportati in tabella (tab.3) a partire dallo Stage II. Le microsferule in alginato del Sertoli (sono principali costituenti della barriera emato-testicolare, costituiscono un interessantissima popolazione cellulare in grado di sintetizzare

numerosi fattori di crescita (*GDNF*, *VEGF*, *PDGF*, *IGF-1*, *IGF-2*, *TGF- β*), maturativi (*activina*, *c-kit ligand*), e immunomodulatori (*IL-6*, *Transferrina*, *Clusterina*, *TGF- β*) (Basta 2004, Yue 2006). La loro co-presenza nel medium, dovrebbe, quindi, indurre un incremento significativo dell'attività mitotica, con conseguente espansione del patrimonio cellulare e accelerare di fatto il processo di maturazione/differenziazione delle cellule cordonali, valutabile in base alla espressione e produzione di insulina. Tale lavoro deriva dalla collaborazione con il gruppo di ricerca del prof Calafiore dell'Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Interna, Laboratorio per i trapianti cellulari endocrini, che da anni si occupa di xenotrapianti di strutture insulari microincapsulate in alginato in topi NOD con diabete spontaneo (Luca 2005). Recentemente hanno avviato uno studio pilota per validare i trapianti di strutture insulari micro-incapsulate in alginato in riceventi diabetici non immunosoppressi, progetto approvato sia dall'Istituto Superiore di Sanità nonché dal comitato etico regionale dell'Umbria.

<p><i>Stage I : Proliferazione (8-10 days)</i> Stem Span medium (SS) SCF (25ng/ml) Flt-3 (25ng/ml) FGF-4 (50ng/ml) LDL (10ng/ml) Heparin (50ng/ml) FBS 10%</p>	<p><i>Stage II : Differenziazione pancreatica (8 days)</i> *HGF (50ng/ml) *EGF (25ng/ml) Activ-A (20ng/ml) ITS-supplement (10ml/IL) SS medium FBS 10%</p>
<p><i>Stage III : (7-8 days)</i> SS medium Nicotinamide (10mM) B27 (20μl/ml) FBS 5%</p>	<p><i>Stage IV : (8-9 days)</i> SS medium Nicotinamide (10mM) B27 (20μl/ml) Exend-4 (10nM) GLP-1 (10ng/ml) FBS 5%</p>

tab.3

Stage I (8-10gg): Le SC sono piastrate in piastre multi-well da 12 alla concentrazione di 100.000 cellule/ml e sono mantenute ad una temperatura di 37°C al 5% di CO₂. La prima settimana di incubazione induce semplicemente una **proliferazione (self-renewal)** delle cellule UCB- Lin^{neg} piastrate (1x 10⁵ cell/ml in StemSpan medium). Per la loro coltura richiedono terreno StemSpan contenente Iscove's MDM, 1% BSA, 10 µg/ml di insulina, 200 µg/ml di transferrina umana, 10⁻⁴M 2-mercaptoetanolo e 2 mM L-glutamina. Il terreno viene arricchito CON 25ng/ml di SCF, 25ng/ml di ligando Flt-3 e 50 ng/ml di epirina, 50 ng/ml di fattore di crescita dei fibroblasti-4 (rappresenta uno dei fattori di crescita dei fibroblasti con maggiore attività mitogenica delle cellule), 10 µg/ml di LDL (*Piper 2002, Lumelsky 2001*).

Le cellule rimangono fluttuanti nel mezzo di coltura espandendosi per almeno 20-30 volte. Tutte mostrano un aspetto tondeggiano e traslucido.

Stage II (8gg): La seconda settimana **Predifferenziazione:** ha lo scopo di selezionare le cellule che hanno cominciato ad avviarsi verso la linea cellulare pancreatica. Le UCBSC sono state fatte crescere per 8 giorni in StemSpan Medium contenente il 5% di FBS, EGF 25ng/ml, ITS supplement-A, aggiunto al medium alla concentrazione di 10 ml/l, Activina-A 20 ng/ml (membro della superfamiglia del TGF, è un fattore critico per la formazione durante la gastrulazione del mesoderma e dell'endoderma). In alcuni pozzetti, come già precedentemente spiegato sono stati applicati protocolli diversi; ad esempio in alcune well sono state aggiunte le microsferule del Sertoli alla concentrazione di 15x10³/ml (**fig. 6**). Inoltre parte delle cellule di tutte le colture sono state piastrate su vetrini (*chamber slides*) divisi in otto sezioni alla concentrazione di

3×10^5 cellule per singolo pozzetto per poi poter effettuare gli studi immunohistochimici.

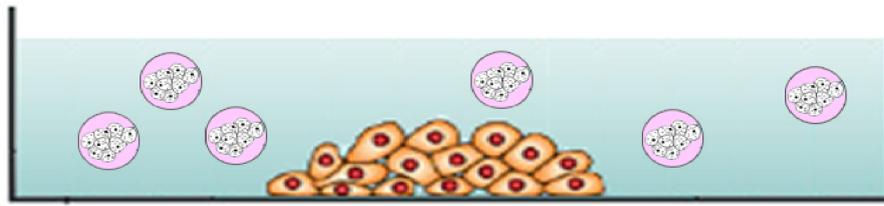


Fig 6

Stage III (7-8gg): La terza incubazione chiamata di **Espansione** ha lo scopo di aumentare il volume delle cellule che hanno preso la via della differenziazione in senso pancreatico. Le UCBSC sono state fatte crescere per 7 giorni in StemSpam Medium contenente il 5% di FBS, N2 supplement A 10 μ l/ml, B27 10 μ l/ml, GLP-1 10ng/ml .

Stage IV (8-9gg): Infine queste cellule vengono incubate in un quarto tipo di medium per la fase di **Differenziazione** contenente il 5% di FBS, N2 supplement A 10 μ l/ml, B27 20 μ l/ml, Nicotinamide 10mM (Vitamina B3 fattore necessario a preservare la funzionalità e la capacità di rigenerazione delle cellule beta), Exendin-4 10nM, e GLP-1 10ng/ml (i due fattori insieme aumentano la massa delle cellule beta inducendo differenziazione e neogenesi delle cellule progenitrici duttali nelle cellule delle isole endocrine)(*Meier 2005*). Durante questa ultima fase il 70% delle cellule è attaccato al substrato e le forme che le cellule hanno assunto varia molto: possiamo distinguere cellule multilobate, stellate, simili ai fibroblasti, allungate e alcune di queste formano piccoli gruppetti simili a clusters. Possiamo osservare una morfologia simile nelle chambers slides. In ognuno dei vari stage differenziativi , il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 48 ore.

Conta delle cellule vitali

Per il conteggio delle cellule vitali si è utilizzato il metodo del trypan blue. Questo metodo consiste nel mescolare 10 microlitri di sospensione cellulare con 90 microlitri di una soluzione di trypan blue allo 0,2% in PBS 1X. Una volta miscelate si procede con il conteggio delle cellule vitali in duplicato utilizzando una camera di **Burker**. Si considerano cellule vitali quelle che si presentano di forma circolare, con bordo regolare e che non risultino colorate nel loro citoplasma da trypan blue; le cellule morte appaiono colorate poiché incapaci di eliminare il colorante.

Abbiamo effettuato la conta delle cellule prima dell'eluzione su colonna, e post per valutare il numero e la qualità di cellule staminali progenitrici prima dell'avvio della cultura. Alla fine di ogni stage abbiamo poi effettuato la conta per valutare la potenzialità replicativa (I stage) e per mantenere in ogni pozzetto la stessa percentuale di cellule.

Test per la valutazione dell'espressione

Le diverse fasi maturative della cellula sono state caratterizzate tramite studi di espressione dei principali geni coinvolti nell'embriogenesi pancreatica. Abbiamo valutato l'espressione di tali geni nei differenti stage differenziativi utilizzando l'RT-PCR al fine di monitorare il grado di specializzazione funzionale che le cellule hanno raggiunto, fino ad arrivare alla funzione di Beta cellule secernente insulina. Le Cellule alla fine di ogni settimana stadio di differenziazione sono state recuperate e risospese in soluzione per l'estrazione dell'RNA in particolare abbiamo effettuato l'estrazione in ognuno degli stadi della seguente tabella (tab.4):

Settimana	Stadio
Post- Colonna	0
I settimana	Proliferazione
II Settimana	Predifferenziamento
III Settimana	Espansione
IV/ VI Settimane	Differenziazione

Tab.4

Estrazione dell'RNA totale

RNA totale è stato estratto da 5×10^6 cellule utilizzando Trizol-invitrogen.

Le cellule raccolte per centrifugazione sono state immediatamente lisate in 500 μ l di soluzione Trizol.

Sono stati quindi aggiunti 100 μ l di cloroformio.

Dopo aver incubato a RT per 5 minuti i campioni sono stati centrifugati a 12000xg per 15 minuti a 4°C .

Alla fase acquosa, trasferita in una nuova eppendorf, è stata aggiunto un volume di isopropanolo.

I campioni sono stati incubati a -20°C per 10 min successivamente centrifugati a 12000xg a 4°C per 10 minuti.

Al pellet così ottenuto è stato aggiunto etanolo al 70% centrifugato per 10 minuti a 12000xg e decantato.

L'RNA precipitato è stato risospeso in 20 μ l di acqua sterile trattata con di-etil-pirocarbonato (DEPC) Nuclease free water.

La concentrazione di ciascun RNA è stata valutata allo spettrofotometro nanodrop alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Selezione dei primers e verifica della differente espressione genica attraverso RT-PCR.

Gene Bank access	GENE	Sequenza dei primers	bp	T° A	FUNZIONE GENE
NM_022454	SOX 17	FW: TGGACCGCACGGAATTTGAACA RW: TGTGTAACACTGCTTCTGGCCT	221	68°	ENDODERMA
NM_021784	FOXA2	FW: TTGCTGGTCTGTTTGTGGCT RW: TTCATGTTGCTCACGGAGGAGT	153	68°	ENDODERMA
NM_000209	PDX1	FW: TACTGGATTGGCGTTGTTTGTGGC RW: AGGGAGCCTTCCAATGTGTATGGT	233	68°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_002509	NKX2	FW: CGGACAATGACAAGGAGACCCCG RW: CGCTCACCAAGTCCACTGCTGCTGG	492	68°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_000207	INSULINA	FW: TTTGTGAACCAACCTGTGCG RW: TTGTTCCACAATGCCACGCTTC	245	68°	ORMONE PANCREATICO
NM_001604	PAX6	FW: CAGTCACAGCGGAGTGAATCAGC RW: GCCATCTTGCGTAGGTTGCCCTG	520	64°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_000525	KIR 6.2	FW: CGCTGGTGGACCTCAAGTGGC RW: CCTCGGGGCTGGTGGTCTTGCG	500	64°/65°	CANALE PANCREATICO
NM_000352	SUR-1	FW: TGCACATCCACCACAGCACATGGCTTC RW: GTGTCTTGAAGAAGATGTATCTCCTCAC	490	64°/65°	CANALE PANCREATICO
NM_001101	ACTINA	FW: GAGCAAGAGAGGCATCCTCA RW: AGTACTTGGCTCAGGAGGA	553	64°	HOUSEKEEPING
NM_006193	PAX4	FW: CACCTCTCTGCCTGAGGACACGGTGAG RW: TGCCTCATTCCAAGCCATACAGTAGTG	490	66°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_000439	PC1/3	FW: TTGGCTGAAAGAGAACGGGATACATCT RW: ACTTCTTTGGTGATTGCTTTGGCGGTG	456	60,5°	ENZIMA PANCREATICO
NM_002594	PC2	FW: GCATCAAGCACAGCTACACTCG RW: GAGACACAACCACCCTTCATCCTTC	314	60,5°	ENZIMA PANCREATICO
NM_006168	NKX6	FW: CTCCTCCTCGTCCTGTCGTCGTC RW: CTTGACCTGACTCTCTGTCATC	300	60,5°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_000162	GK	FW: GACGAGTTCCTGCTGGAGTATGAC RW: GACTCGATGAAGGTGATCTCGCAGCTG	525	60,5°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_002054	GLUCAGONE	FW: CCAGATCATTCTCAGCTTCC RW: GGCAATGTTATTCCTGTTC	180	60,5°	ENZIMA PANCREATICO
NM_002202	ISL1	FW: GTGCGGAGTGTAATCAGTATTTGG RW: GTCATCTTACCAGTTGCTCCTTC	500	55°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_000340	GLUT2	FW: GGTTTGTAACCTTATGCCTTAAG RW: GCCTAGTTATGCATTGCAG	213	55°	RECEITTORE PANCREATICO
NM_002701	OCT4	FW: TGAAGCAGAAGAGGATCACC RW: CTCGTTGTGCATAGTCGCT	253	62°	MARKER DI STAMINALITA'
NM_001048	SOMATOS	FW: CGTCAGTTTCTGCAGAAGTCCCTGGCT RW: CCATAGCCGGGTTTGTAGTTAGCAGATC	160	68°	ORMONE PANCREATICO
NM_020999	NGN3	FW: TAAGAGCGAGTTGGCACTGAGCAA RW: TTTGAGTCAGCGCCAGATGTAGT	200	68°	ENDODERMA PANCREATICO
NM_006516	GLUT1	FW: CCACGAGCATCTTCGAGAA RW: GCACATGCCACAATGAAA	374	64°	RECEITTORE PANCREATICO
NM_002722	PP	FW: CTGCTGCTCCTGTCCACCTGCGTG RW: CTCCGAGAAGGCCAGCGTGTCTCTC	207	65°	ORMONE PANCREATICO

Tab.5

Selezione dei primers e verifica della differente espressione genica attraverso RT-PCR.

GENE	bp	Sequenza dei primers	T° A	FUNZIONE GENE
Musashi	115bp	F-5'GCAGACTACGCAGGAAGG3' R-5'AGTGACGAAGCCGAAACC3'	Ta=55°C	MARKER PRECURSORI NEURONALE INTERMEDIO
Enolase 2	97bp	F-5'ACCACATCAACTCCACCATCG3' R-5'CCATCCAAGTCCAGCATCAGG3'	Ta=54°C	MARKER PRECURSORI NEURONALE TARDIVO
Nestina	220bp	F-5' GCCCTGACCACTCCAGTTTA 3' R-5' GGAGTCCTGGATTTCCTTCC 3'	Ta=55°C	MARKER PRECURSORI NEURONALE PRECOCE
NFL	284bp	F-5' TCCTACTACACCAGCCATGT 3 R-5' TCCCAGCACCTTCAACTTT 3'	Ta=57°C	MARKER GENERICO NEURONE IMMATURO
NFM	227bp	F-5'GGGAAATGGCTCGTCATTG3' R-5'GTGTTGGACCTTAAGCTTGG3'	Ta=57°C	MARKER GENERICO NEURONE INTERMEDIO
NFH	220bp	F-5'AGGTGAACACAGACGCTATG3 R-5'ATCTCCCCTTGGTGTTCCT3'	Ta=57°C	MARKER GENERICO NEURONE MATURO
Synaptophysin	182bp	S-5'CCAACAAGACCGAGAGTG3' AS 5'GGAGTAGAGGAAGGCAAAC3'	Ta=54	MARKER CELLULE NEUROENDOCRINE
TH	159bp	S-5'GGGCTGCTGTCTCCTAC3' AS-5'CTTGTCTTGGCGTCACTG3'	Ta=56	MARKER NEURONI MATURI
VACHT	143bp	S-5'GATGTGCTGCTTGATGAG3' AS-5'GTGTAGTAGTAGTTGTAGTCG3'	Ta=55	MARKER NEURONI MATURI
DBH	153bp	S-5'GGTGATAGAAGGACGAAACG 3' AS-5'TAGCCAGTGAGGATGAAGG3'	Ta=55°C	MARKER NEURONI MATURI

Tab.6

RT-PCR

L'RNA precedentemente estratto e quantizzato mediante nanodrop è stato utilizzato per sintetizzare il cDNA.

Abbiamo utilizzato 100ng di RNA, 1µl OligodT, 1µl dNTPS 10mM, acqua DEPC fino a 12µl,mantenuto la reazione a 65°C per 5 min, successivamente abbiamo aggiunto 4µl di Buffer5x , 2µl di DTT 0,1 M,1µl di RNaseOUT, incubiamo per 2 min a 42°C, infine abbiamo aggiunto 1µl di SuperScript II RT, incubiamo 50 min a 42°C e inattiviamo la reazione a 70°C per 15 min.

PCR

Successivamente 1 µl di cDNA è stato utilizzato per effettuare una prima PCR. Il protocollo prevede l'utilizzo di: 1 µl di cDNA , 5µl di Buffer, 4 µl di dNTPs, 1µl di primer 3', 1µl di primer 5', 0.25µl Taq, 1.5µl MgCl2 , 11,25µl di acqua DEPC . Le condizioni di amplificazione da noi utilizzate per l'amplificazione sono state :

un ciclo a 94°C per 2'; 35 cicli a 92°C per 1', T°Annealing per 1', 72°C per 1'; un ciclo a 72°C per 10'; un ciclo a 4°C per 2'.

I prodotti da noi ottenuti sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%, in presenza di etidio bromuro.

REAL TIME PCR

La Real Time PCR è una tecnica di PCR che permette di monitorare l'andamento della reazione di amplificazione ed effettuare una quantizzazione del frammento amplificato.

La Real Time PCR si può effettuare grazie all'impiego di coloranti intercalanti, come il SYBR green, che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA, oppure con l'utilizzo di sonde ad ibridazione, marcate con molecole fluorescenti, specifiche per il frammento amplificato del gene ricercato. Qualunque sia la chimica scelta per l'analisi in Real-Time essa si basa sulla misura della fluorescenza prodotta durante la fase di amplificazione. La quantità di fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR e dipende dalla quantità di materiale iniziale.

Gli strumenti per Real-Time PCR, oltre a servire da termociclatori, eccitano i fluorocromi presenti nei campioni e convogliano la fluorescenza emessa in risposta fino ad un rilevatore. Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza in una rappresentazione grafica in tempo reale della cinetica di reazione.

Il principio più semplice è basato sul legame al DNA a doppio filamento di un colorante intercalante, per esempio il SYBR Green I. Questo colorante è una molecola fluorescente che si intercala all'interno del doppio filamento di DNA

originatosi ad ogni ciclo di amplificazione: nella fase di denaturazione, il SYBR Green è libero nella miscela di reazione, nella fase di annealing si posiziona in maniera aspecifica nel solco minore del DNA, nella fase di estensione infine, si osserva l'emissione di fluorescenza.

La metodologia però non permette di distinguere la formazione di prodotti di amplificazione specifici da prodotti aspecifici. Pertanto, questo saggio richiede un'accurata ottimizzazione delle condizioni di PCR e una chiara identificazione dei prodotti di amplificazione specifici usando l'analisi della curva di melting. L'osservazione della curva di melting fornisce utili informazioni sulla specificità dell'amplificato e dà conferma del dato ottenuto. La PCR Real-time presenta diversi vantaggi rispetto alla PCR convenzionale, in quanto ha uno spettro di sensibilità più ampio e una più alta precisione. Inoltre, il vantaggio di questo metodo è che non sono richiesti passaggi di analisi post-PCR (elettroforesi su gel, ibridazione del DNA), il che riduce il rischio di cross-contaminazione. Il calcolo della quantità di DNA dei campioni viene effettuato determinando il ciclo della PCR (ciclo soglia, Ct) nel quale viene raggiunto un valore significativo di fluorescenza. Il ciclo soglia viene identificato durante la fase esponenziale della reazione di PCR, momento in cui tutti i reagenti sono presenti nelle quantità ottimali e la reazione è al massimo della sua efficienza.

Nello studio di un grafico di Real Time PCR vengono definiti tre parametri:

-La **linea base** (*baseline*) della fluorescenza. Si calcola durante i primi cicli di amplificazione quando ancora non si è ottenuto un significativo aumento di fluorescenza;

-La **linea soglia**, scelta dall'operatore in maniera da intersecare le curve di tutti

i campioni nella fase esponenziale;

-Il *ciclo soglia* ($Ct = Cycle Threshold$), specifico per ogni campione. Identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia; il ciclo soglia è un indice preciso, in quanto esiste una relazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA (Figura 7).

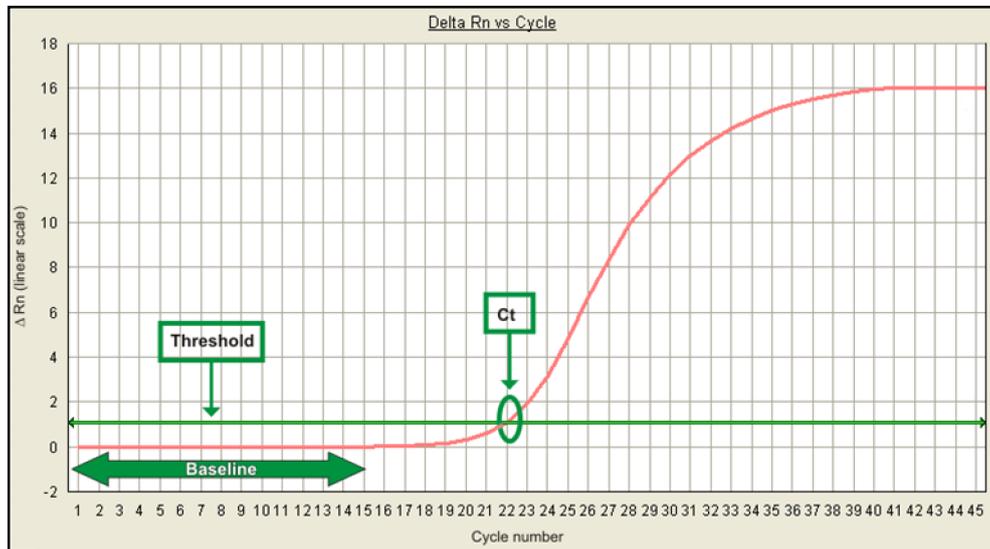


Fig.7 – Grafico Real-Time PCR

La Real-Time RT-PCR permette di valutare i livelli di espressione dei geni di interesse grazie alla determinazione quantitativa del relativo RNA messaggero, dopo che questo è stato retroscritto in cDNA. La retroscrittura in cDNA mantiene inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA, permettendo di misurare l'espressione relativa del gene di interesse.

Per il nostro esperimento l'RNA totale isolato dalle colture cellulari tramite Trizol è stato quantificato e controllato qualitativamente mediante Nanodrop1000 e corso su gel di agarosio all'1% per verificarne l'intergrità. Successivamente la sintesi del cDNA è stata eseguita a partire da 1 ug di RNA totale utilizzando Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in

accordo con le istruzioni fornite dal kit. La PCR real-time è stata eseguita utilizzando la chimica del SYBR Green e lo strumento Real Time 7300 (Applied Biosystems).

La mix finale di reazione conteneva 5 ul di cDNA, 300 nM di ciascun primer (tab.7), H₂O RNAsi-free fino a raggiungere un volume finale di 50 ul. Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato.

Il profilo termico di amplificazione e di analisi di fluorescenza prevedeva uno step di denaturazione e attivazione della Taq, a 95°C per 10 minuti, seguita da 40 cicli a 95°C per 10 secondi, a 60°C per 1 minuto. Al termine della reazione di amplificazione è stato aggiunto un profilo termico per l'analisi della curva di dissociazione (o curva di melting) per valutare la qualità e specificità dei prodotti ottenuti.

Per la quantizzazione dei risultati ottenuti ci siamo avvalsi del metodo comparativo relativo del Ct, che si basa sul confronto tra i cicli soglia di amplificazione del gene in esame, tra il campione ed il suo controllo.

Questo metodo si avvale della normalizzazione dei livelli di espressione dei geni di interesse rispetto ad un gene housekeeping, nel nostro caso la β -actina, il cui trascritto è costitutivamente espresso nelle nostre condizioni sperimentali.

I calcoli prevedono di eseguire una differenza (Ct) tra i valori del ciclo soglia del gene target e del normalizzatore:

$$Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\text{normalizzatore})$$

Questa differenza è calcolata per ogni campione in esame. Successivamente, l'analisi prevede che il Ct di un campione controllo venga utilizzato come campione di riferimento, definito calibratore.

Quindi, viene calcolata la differenza tra il valore soglia del campione e il valore soglia del calibratore :

$$Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\text{calibratore})$$

Il calcolo di trascritto di ciascun campione relativo al calibratore è ottenuto applicando la formula 2^{-Ct} .

Gene Bank access	GENE	Sequenza dei primers	bp	T° A	FUNZIONE GENE
NM_001101	ACTINA	FW: GAGCAAGAGAGGCATCCTCA RW: AGTACTTGCCTCAGGAGGA	553	64°	HOUSEKEEPING
NM_000209	PDX1	FW: TACTGGATTGGCGTTGTTTGTGGC RW: AGGGAGCCTTCCAATGTGTATGGT	233	68°	ENDODERMA PANCREATICO

Tab.7

Immunocitochimica.

La presenza del prodotto genico dell'insulina all'interno delle singole cellule, nell'ultimo stadio di differenziazione è stata valutata mediante immunocitochimica. L'immunocitochimica è una tecnica di identificazione degli antigeni nei campioni citologici mediante anticorpi specifici per gli antigeni stessi. Il legame antigene-anticorpo e di conseguenza il riconoscimento della presenza dello specifico antigene in questioni, nella maggior parte dei casi si ottiene utilizzando un anticorpo secondario (marcato), un enzima ed un substrato cromogeno. La procedura per l'esecuzione di tale tecnica è la seguente: Alla fine del protocollo di differenziazione il medium viene ritirato e si eseguono tre lavaggi da cinque minuti cadauno con PBS 1x per eliminare i resti di medium mantenendo le cellule adese alla piastra di coltura. Dopodichè si esegue un incubazione di 25 minuti a temperatura ambiente in paraformaldeide al 4% in PBS (fissativo utile affinché il preparato non perda per degradazione componente cellulare, soprattutto proteica. Dopo

tale periodo di incubazione si eseguono 3 lavaggi in PBS 1X (15 minuti) per eliminare i resti di paraformaldeide. La successiva fase del protocollo prevede la permeabilizzazione delle cellule con triton-x 100 ad una concentrazione dello 0.5% in PBS 1x per tre ore. Questa tappa serve a creare dei pori nella parete delle cellule affinché gli anticorpi possono penetrare nell'interno e legarsi alla proteina d'interesse. Il giorno successivo è stata eseguita un'equilibratura delle cellule con il buffer nel quale è stato risospeso sia l'anticorpo primario che l'anticorpo secondario per 20 minuti a temperatura ambiente. L'incubazione, dipendendo dall'anticorpo primario (*Mouse anti-human pro-insulin C peptide*), è stata eseguita con un tempo variabile da 30 minuti a overnight a 4°C. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS 1X per eliminare l'eccesso di anticorpo primario e staccare le eventuali interazioni inaspecifiche. L'incubazione con l'anticorpo secondario è stata eseguita per un tempo di 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario (*donkey antimouse IgG affinity purified fluorescein-conjugated*) si eseguono altri tre lavaggi con PBS 1X per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario. Lo step finale di questa tecnica prevede l'uso di DAPI per la colorazione del nucleo delle cellule, la cui incubazione è stata eseguita a temperatura ambiente per un tempo di 5 minuti. Anche dopo l'impiego del DAPI sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS 1X. Le immagini sono state catturate attraverso l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza. Durante il saggio di immunistochemica tre differenti vetrini di controllo, contenenti le nostre cellule differenziate, sono stati allestiti: un vetrino colorato solo con anticorpo primario, un vetrino colorato solo con un anticorpo secondario e un vetrino trattato con BSA 1%. Come controllo

negativo, abbiamo utilizzato cellule staminali cordonali cresciute per 4 settimane in un medium standard Stemspan, il quale mantiene le cellule in proliferazione ma non induce alcun tipo di differenziazione

Elisa Peptide C

Le cellule in VI settimana delle diverse condizioni sperimentali sono sottoposte a stimolazione con Glucosio 25mM e Tolbutamide 100 μ M; il protocollo prevede:

1. Recupero il terreno
2. Lavaggio con 500 μ l di PBS
3. Incubazione 1 h con MEM contenente una concentrazione basale di glucosio di 2,5 mM
4. Aspiro il terreno e congelo a -80 per effettuare ELISA
5. Aggiungo in 2 well terreno contenente 25 mM di Glucosio
6. Aggiungo in 2 well terreno contenente 100 μ M di tolbutamide
7. Incubazione per 1 h
8. Aspiro il terreno e congelo a -80 per effettuare ELISA del Peptide C
9. Pelletto le cellule per eseguire il dosaggio delle Proteine.

Kit C-Peptide é un dosaggio immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa del C-Peptide.

C-peptide è l'abbreviazione per peptide di collegamento, è un peptide di 31 amminoacidi. Il Cpeptide è il C-terminale liberato durante la maturazione della pro-insulina in insulina. La proinsulina viene maturata quando è liberata dal pancreas nel circolo sanguigno – una molecola di Cpeptide per ogni molecola

di insulina. Il C-Peptide è privo di attività biologica ma sembra essere necessario da mantenere l'integrità strutturale dell'insulina.

Materiali

Penicillina/streptomicina (Gibco 15140-122), Glutamina (Gibco 25030-032), Recombinat Human activina A (Sigma- 338-AC/CF), GLP-1 (SIGMA G9416), Epidermal Growth Factor (Sigma E9644), sacche per la raccolta di sangue ombelicale da 300ml (Grifols Italia SPA 48935) Nicotine 25 ml (Sigma-N3876), HGF (Sigma-H1404), SCF (sigma- S7901), LDL (sigma L7914), Activina A (Sigma-A4941), FL3 (sigma-F3422), FGF4 (sigma-F8424), Exendin 4 (sigma E7144), Colonna da 0.6 per gravità (Voden 12.061), Stemsep Human progenitor Cells (Voden 14066), Betamercaptoetanolo (sigma M7522), L-glutamina (Sigma -G7513), RPMI 1640 medium, 500ml (Codisan ECB9006L), Illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (0.2 ml tubes/plate) (Codisan 27-9557-901) Super Script II Reverse Transcriptase (Codisan 18064-014), Subcloning Efficiency™ DH5™ Competent Cells (Codisan 18265-017), TAE 50X (Celbio EMR064006), Proinsulin C peptide-m-Ab-clone; Cpep-01 (Chemicon CBL94), SyberGreen MasterMix (*Applied* Biosystems) Donkey antimouse IgG (FITC) (Chemicon A P192F) D-PBS (Codisan 14190-169) , TRYPSIN 0.05% EDTA (Codisan 25300-054) , Percoll 11 (Codisan 17-0891-01) ISOPROPANOLO 500 ml (Codisan 157300) B27 SERUM-FREE 50X (Codisan 17504-044) Ficoll-paque PLUS 6x500 ml Codisan 17-1440-03, Stemsapan SFEM medium 500ml (Biopsa 09650), Trypan blue 100ml (07050), DMSO (Sigma-D2650), Cryovials 2,0 ml (Invitrogen-4306599), Mercordia Ultrasensitive Peptide C –ELISA (Test medical -101141-01) , Multiwell falcon 12 pozzetti (labfor 353043), Acido Retinoico(sigma), ECM gel (sigma E1270).

RISULTATI

Le cellule progenitrici /staminali ematopoietiche del cordone ombelicale sono state separate dal resto delle cellule contenute nel sangue cordonale e raggruppate attraverso l'uso del sistema a selezione negativa chiamato "Stemsepnegative selection system" attraverso il quale si ottiene una quasi completa rimozione di tutte le cellule "committed" e quindi mature contenute nel cordone ombelicale. Dopo tale primaria selezione le UCBCS sono state poste in colture di piastra contenenti 12 pozzetti ciascuna ad una concentrazione di $1,5 \times 10^6$ cell e lasciate proliferare per 8-10 gg nel medium di proliferazione al fine di incrementare il numero di cellule staminali progenitrici da utilizzare lungo le fasi colturali.

Durante questa prima fase le nostre cellule si espandono e incrementano la loro concentrazione di 20-30 volte rispetto la fase iniziale; tutte rimangono fluttuanti nel mezzo di coltura e mostrano un aspetto tondeggiante, traslucido. Questo ampliamento ci permette di iniziare il protocollo differenziativo verso la linea pancreatica, con un numero congruo di cellule. Nelle fasi iniziali del nostro studio non è stato ritenuto opportuno inserire le microsferule per due motivi fondamentali:

- 1) il primo, di carattere pratico, in quanto, in questa prima fase le cellule si mantengono in sospensione e quindi sarebbe stato difficile mantenere durante il cambio di medium un'adeguata separazione tra microsferule del Sertoli e cellule progenitrici.
- 2) la seconda motivazione è che il primo stadio prevede semplicemente una proliferazione cellulare (*self-renewea*) che poteva essere,

imprevedibilmente, modificata dalla presenza nel medium dei fattori di crescita rilasciati dalla microsferule.

Alla fine del primo step una parte di queste cellule sinora coltivate in piastre da 12 pozzetti ciascuna è stata trasferita in vetrini divisi in otto sezioni attraverso setti di plastica (*chamber slide*). Queste cellule sono poi utilizzate e testate in saggi di immunocistochemica. L'osservazione al microscopio ottico (**Fig.8**) delle cellule coltivate nei pozzetti in plastica durante questo periodo (stage II) mostrava già le prime differenze morfologiche: il numero di cellule adese al substrato risultava maggiore nella co-cultura mentre nei rimanenti pozzetti privi delle microsferule molte cellule erano ancora fluttuanti nel mezzo di coltura. Al contrario nelle cellule piastrate nelle cosiddette "chambers slide" dopo 48h le cellule risultavano in entrambi le culture adese al substrato. Nel terzo stadio abbiamo aggiunto, modificando il protocollo dei precedenti esperimenti, il GLP-1 in quanto recenti lavori in letteratura hanno dimostrato che la presenza in una fase più precoce della coltura migliora la spinta differenziativa in senso pancreatico (*Soria 2001*). In questa fase quasi il 50% delle cellule poste in coltura è adesa al substrato.

Al III stage "fase di espansione" le cellule osservate al microscopio ottico sono tutte adese al substrato e incominciano ad avere aspetto morfologico vario; Nella co-cultura le cellule presentano un aspetto maggiormente arboriforme quasi dendritico (*Harris 2008*) mentre nella coltura priva di microsferule l'aspetto è "fibroblastic-like" (*Pessina 2004, Chase 2007*). Al IV stadio il 70% delle cellule è attaccato al substrato e l'aspetto cellulare è vario, permangono però le differenze morfologiche tra le due colture. Le cellule in co-cultura Le cellule in co-cultura si presentano maggiormente adese e con

aspetto simil dendritico. In alcune zone del pozzetto è possibile osservare un intensa aggregazione cellulare quasi ad isolotto.

Valutazione Citofluorimetrica e d'espressione della staminalità:

Mediante analisi al citofluorimetro alla fine della prima settimana di coltura son stati utilizzati il CD34 e il CD45 per poter valutare lo stato di “staminalità” delle nostre cellule; i risultati sono riportati in tabella (tab.8):

Tab 4: Valutazione al Citofluorimetro	CD	PERCENTUALE
G1	+ CD34/-CD45	97.7
G2	+ CD34/ + CD45	0.00
G3	- CD34/ - CD45	2.26
G4	- CD34/ +CD45	0.00

Tab.8

Sullo stesso pull di cellule alla fine della prima settimana di coltura dall'RNA estratto è stata valutata, mediante RT-PCR, l'espressione del gene OCT4 marker di staminalità.

Valutazione Microscopica e Conta delle cellule vitali:

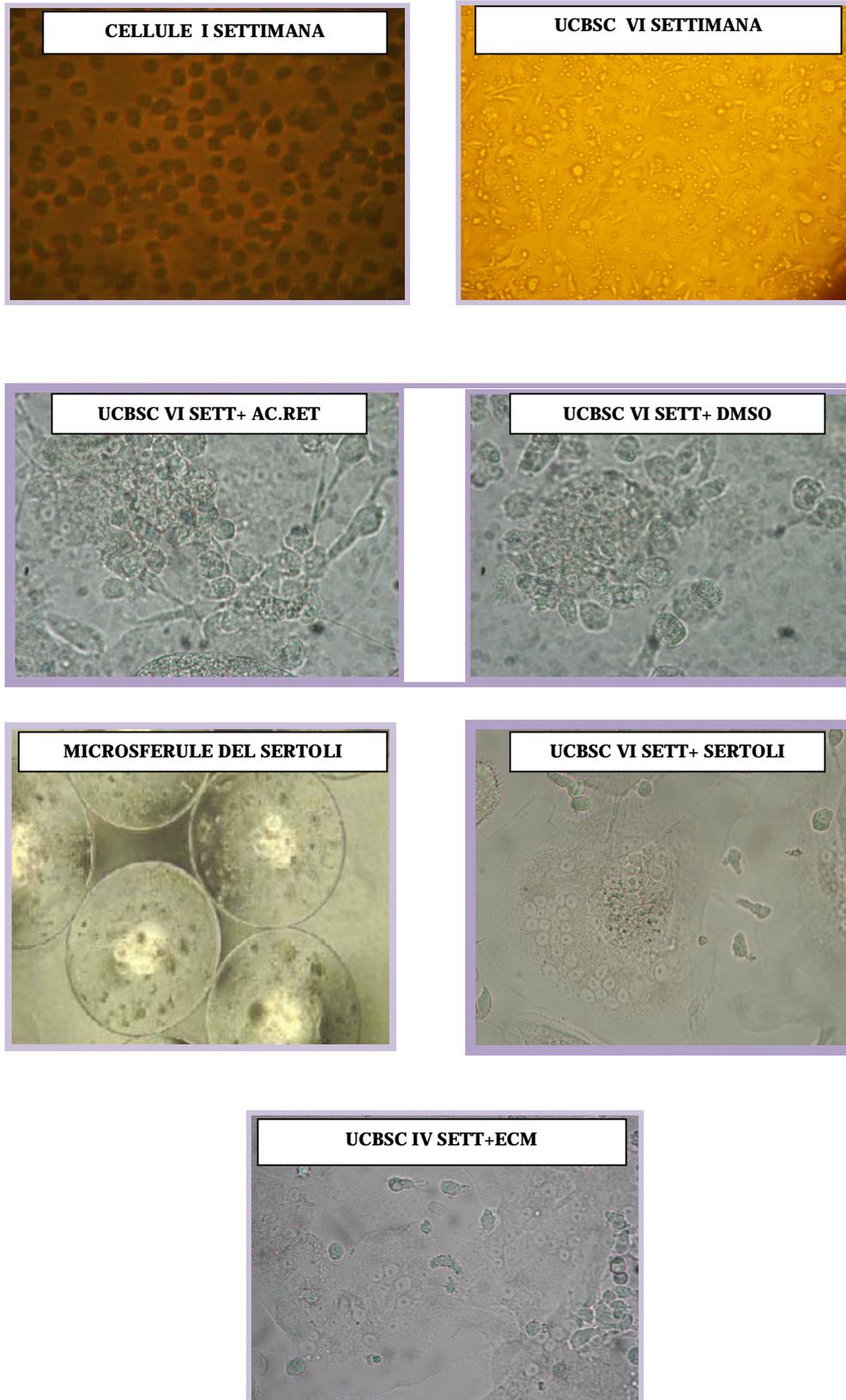


Fig.8

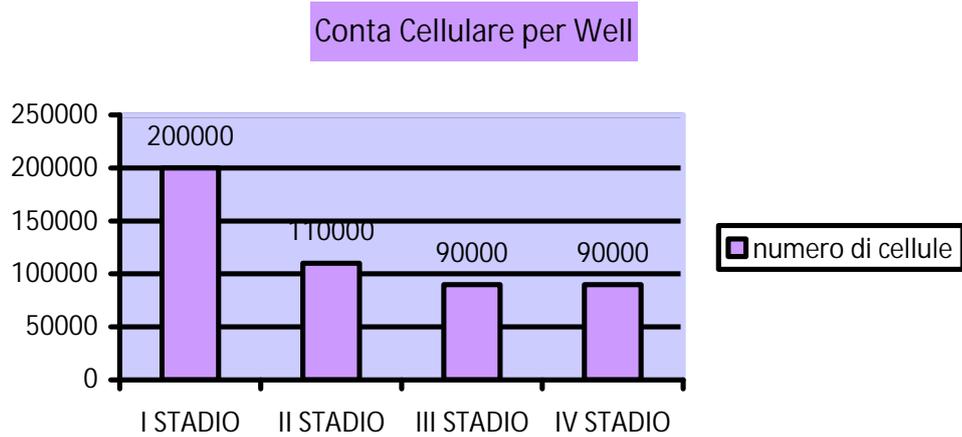


Fig.9

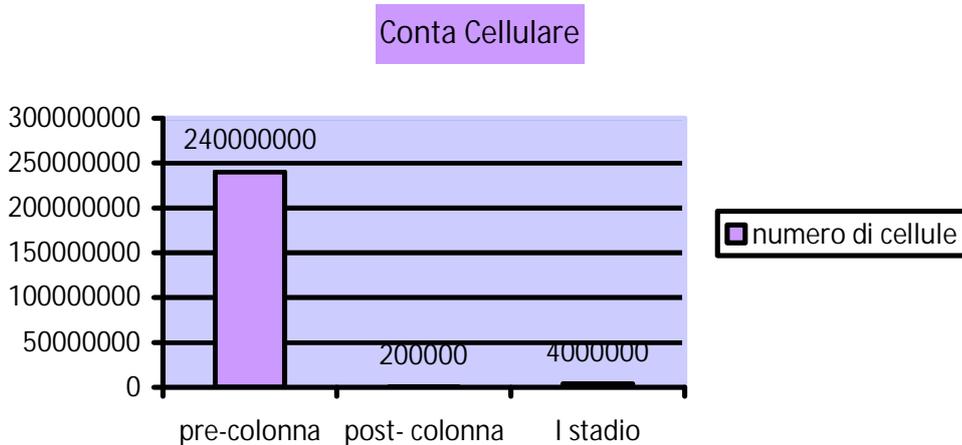


Fig.10

Test per la valutazione dell'espressione:

- **verifica della differente espressione genica attraverso RT-PCR**

Le cellule progenitrici esprimenti Pdx1/Ptf1a nel pancreas embrionale sono in grado di dar vita a tutte le tipologie cellulari pancreatiche. Una sottopopolazione di queste cellule destinate a dare origine al pancreas endocrino esprime in modo transiente il gene per la neurogenina 3 (Ngn3) e le cellule Ngn3+ sono in grado di differenziare in tutte le cellule endocrine dell'isola incluse le cellule beta. Sono già stati descritti nel capitolo

riguardante l'embriogenesi pancreatica, i tempi, le modalità di espressione e il ruolo degli altri geni durante le varie fasi maturative della cellula beta (*Guz 1995*).

Analisi di espressione genica (RT-PCR) è stata effettuata per ogni step differenziativo e i risultati ci mostrano che specifici geni come **PDX-1**, Ngn3, Pax6, Nkx6.1 e Isl1 vengono selettivamente attivati e/o disattivati a seconda del grado di differenziazione raggiunto dalla cellula. Tutti i geni elencati precedentemente in tabella (*vedi materiali e metodi*) sono stati investigati lungo le quattro distinte fasi di differenziazione.

Dato inoltre l'aspetto morfologico, assunto dalle cellule in co-cultura, per cercare di escludere che le UCB-SC si siano trasformate in cellule neuronali abbiamo selezionato alcune coppie di primers (vedi tab.6 *M&M*) neuronali e li abbiamo testati sull'RNA estratto dalle nostre colture. Il risultato di tale prova, è stato negativo. Dai nostri primi dati non sembra ci siano differenze di espressione genica significative tra le diverse colture cellulari.

UCB-SC senza Fattori di Crescita	GENE	FUNZIONE GENE	POST COLONNA	I SETT	II SETT	III SETT	IVSETT	VISETT
	FOXA2	ENDODERMA	-	-	-	-	-	-
	PDX1	ENDODERMA PANCREATICO	-	+	-	-	-	-
	NKX2	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	INSULINA	ORMONE PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	PAX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	ACTINA	HOUSEKEEPING	+	+	+	+	+	+
	NKX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	GK	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	GLUCAGONE	ENZIMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	ISL1	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	GLUT2	RECETTORE PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
OCT4	MARKER DI STAMINALITA'	+	+	-	-	-	-	

Leggenda: +: positivo; -: negativo; /: da testare.

UCB-SC con Fattori di Crescita	GENE	FUNZIONE GENE	POST COLONNA	I SETT	II SETT	III SETT	IVSETT	VISETT
	FOXA2	ENDODERMA	-	-	-	+	+	+
	PDX1	ENDODERMA PANCREATICO	-	+	-	-	+	+
	NKX2	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	INSULINA	ORMONE PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	PAX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	ACTINA	HOUSEKEEPING	+	+	+	+	+	+
	NKX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GK	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	+	+
	GLUCAGONE	ENZIMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	ISL1	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GLUT2	RECETTORE PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	OCT4	MARKER DI STAMINALITA'	+	+	-	-	-	-

Leggenda: +: positivo; -: negativo; /: da testare.

UCB-SC con Fattori di Crescita + Acido Retinoico	GENE	FUNZIONE GENE	POST COLONNA	I SETT	II SETT	III SETT	IVSETT	VISETT
	FOXA2	ENDODERMA	-	-	-	+	+	+
	PDX1	ENDODERMA PANCREATICO	-	+	-	-	+	+
	NKX2	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	INSULINA	ORMONE PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	PAX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	ACTINA	HOUSEKEEPING	+	+	+	+	+	+
	NKX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GK	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	+	+
	GLUCAGONE	ENZIMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	ISL1	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GLUT2	RECETTORE PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	OCT4	MARKER DI STAMINALITA'	+	+	-	-	-	-

Leggenda: +: positivo; -: negativo; /: da testare.

UCB-SC con Fattori di Crescita + DMSO	GENE	FUNZIONE GENE	POST COLONNA	I SETT	II SETT	III SETT	IVSETT	VISETT
	FOXA2	ENDODERMA	-	-	-	+	+	+
	PDX1	ENDODERMA PANCREATICO	-	+	-	-	+	+
	NKX2	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	INSULINA	ORMONE PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	PAX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	ACTINA	HOUSEKEEPING	+	+	+	+	+	+
	NKX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GK	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	+	+
	GLUCAGONE	ENZIMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	ISL1	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GLUT2	RECETTORE PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	OCT4	MARKER DI STAMINALITA'	+	+	-	-	-	-

Leggenda: +: positivo; -: negativo; /: da testare

UCB-SC con Fattori di Crescita + ECM	GENE	FUNZIONE GENE	POST COLONNA	I SETT	II SETT	III SETT	IVSETT	VISETT
	FOXA2	ENDODERMA	-	-	-	+	+	+
	PDX1	ENDODERMA PANCREATICO	-	+	-	-	+	+
	NKX2	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	INSULINA	ORMONE PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	PAX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	ACTINA	HOUSEKEEPING	+	+	+	+	+	+
	NKX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GK	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	+	+
	GLUCAGONE	ENZIMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	ISL1	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GLUT2	RECETTORE PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	OCT4	MARKER DI STAMINALITA'	+	+	-	-	-	-

Leggenda: +: positivo; -: negativo; /: da testare.

UCB-SC con Fattori di Crescita + Sertoli	GENE	FUNZIONE GENE	POST COLONNA	I SETT	II SETT	III SETT	IVSETT	VISETT
	FOXA2	ENDODERMA	-	-	-	+	+	+
	PDX1	ENDODERMA PANCREATICO	-	+	-	-	+	+
	NKX2	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	INSULINA	ORMONE PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	PAX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	ACTINA	HOUSEKEEPING	+	+	+	+	+	+
	NKX6	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GK	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	-	+	+
	GLUCAGONE E	ENZIMA PANCREATICO	-	-	-	-	-	-
	ISL1	ENDODERMA PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	GLUT2	RECETTORE PANCREATICO	-	-	-	+	+	+
	OCT4	MARKER DI STAMINALITA'	+	+	-	-	-	-

Leggenda: +: positivo; -: negativo; /: da testare.

Tab. 9



Fig.11

- **La Real-Time RT-PCR**

La Real-Time RT-PCR ci ha permesso di valutare i livelli di espressione del PDX1 e della Beta Actina alla determinazione quantitativa del relativo RNA messaggero, dopo che questo è stato retrotrascritto in cDNA. La retrotrascrizione in cDNA mantiene inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA, permettendo di misurare l'espressione relativa del gene di interesse. La scelta del gene PDX1 è stata fatta poiché è già stato dimostrato che esso gioca un ruolo doppio durante l'organogenesi del pancreas:

- in uno stadio precoce è essenziale per lo sviluppo del pancreas ed in seguito la sua espressione si restringe alle cellule che sono destinate a divenire mature.
- è coinvolto anche nell'espressione dell'insulina e della somatostatina (*Hui 2002, Itkin-Ansari 2000*), oltre che in un gran numero di geni della cellula differenziata, come ad esempio: glut-2; glucochinasi e il polipeptide amiloide dell'isolotto.

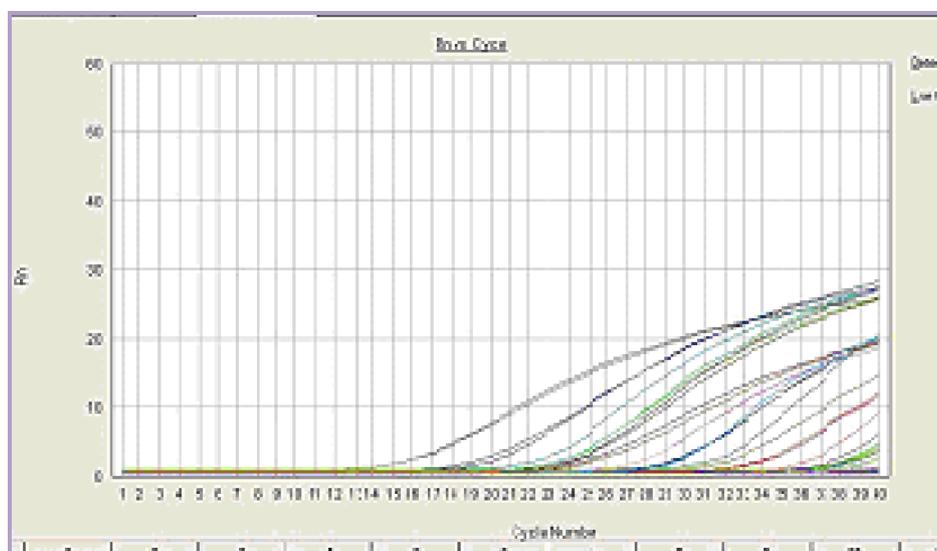


Fig.12

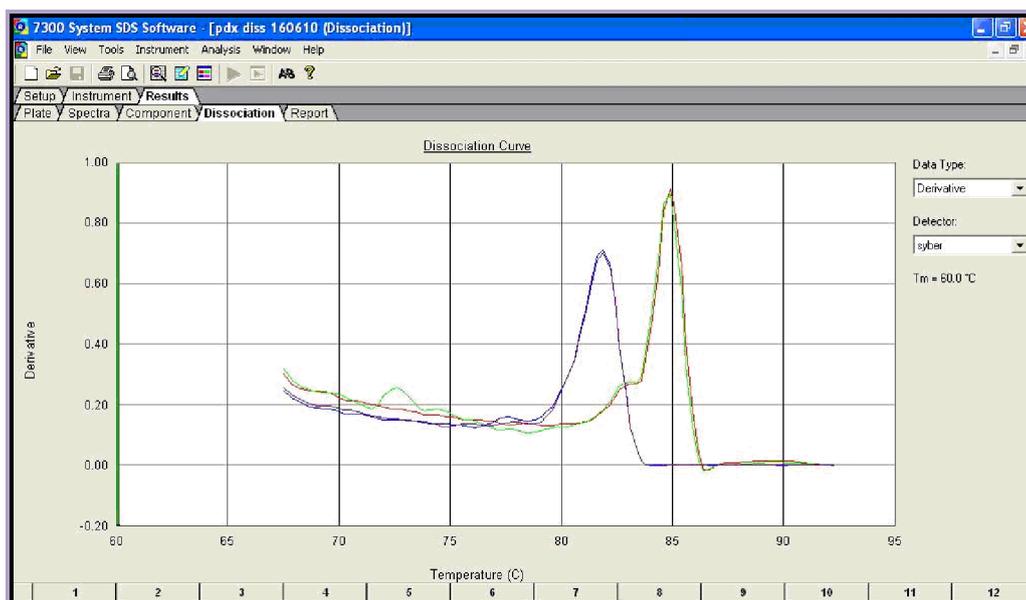


Fig.13

CAMPIONI	CT	2^{-CT}
Ucbsc VI SETT SENZA FATTORI	0	1
Ucbsc IV SETT	-0,5	1,41421
Ucbsc VI SETT	-0,7	1,6245
ucbsc VI SETT + AC. RETINOICO	-1,3	2,46229
ucbsc VI SETT + DMSO	-0,6	1,51572
ucbsc IV SETT + ECM	-0,6	1,51572
ucbsc VI SETT + SERTOLI	-1,7	3,24901
CELLULE BETA PANCREATICHE	-2	0,25

Tab.10 (Livelli d'espressione relativi del gene PDX1 rispetto ai campioni di UCBSA senza fattori di crescita)

Test per la valutazione funzionale:

- **Immunocitochimica**

Abbiamo valutato la presenza del prodotto genico dell'insulina all'interno delle singole cellule, nell'ultimo stadio di differenziazione attraverso saggi di immunocitochimica. L'espressione de novo della molecola di insulina all'interno della cellula è stata rilevata utilizzando un anticorpo specifico contro la molecola del peptide C, usato universalmente come marcatore fenotipico delle cellule pancreatiche.

La scelta dell'anticorpo è fondamentale: noi abbiamo preferito usare un anticorpo che fosse altamente specifico e che non potesse legare in alcun modo la molecola di insulina ricombinante presente nel medium di coltura. Al fine di effettuare tale saggio, le cellule sono state coltivate e poste in chamber slide ad una concentrazione di 3×10^5 cellule per singolo pozzetto e alla fine le cellule sono state colorate con l'anticorpo per il peptide C. La presenza delle molecole di peptide C mostra un prodotto della sintesi *de novo* di insulina, dal momento che tale peptide si trova solo al livello della neo-molecola di insulina e che, in seguito a tagli proteolitici, che portano alla formazione di insulina matura e attiva, tale peptide viene rilasciato e perduto. Come mostrano le figure il segnale della presenza del peptide C dentro la cellula è rilevabile in una colorazione verde dovuta alla presenza del cromoforo FITC; i nuclei colorati in blu ci forniscono un'esatta collocazione di tale peptide nella cellula: la sua presenza è prettamente citoplasmatica e non interna ai nuclei. In tutti gli esperimenti condotti abbiamo ritrovato una positività delle cellule per il peptide C pari al 10%. Un'attenzione particolare meritano i dati immunocistochimici delle chamber slide ottenute dopo co-cultura con le microsferule del Sertoli: emerge, infatti, una maggiore espressione di peptide C con una percentuale compresa tra il **10-15% (fig.14)**.

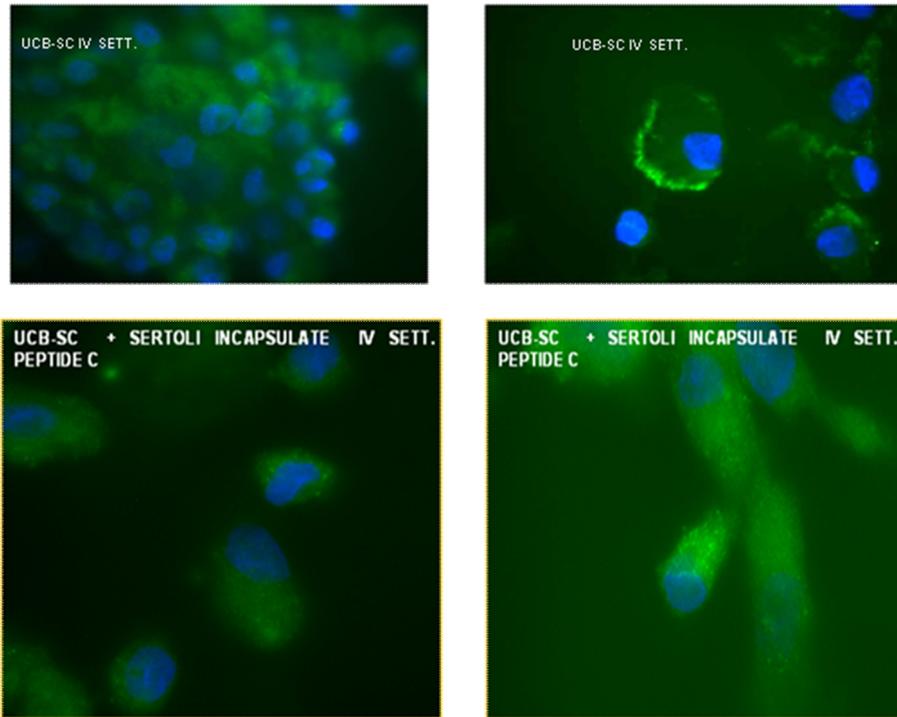


Fig.14

- **Elisa Peptide C**

La valutazione quantitativa e qualitativa della funzione della cellula β pancreatica, non è solo in uso negli studi pre e post diagnostici della storia naturale del diabete melito, ma è anche rilevante nella pratica clinica come una guida per la corretta scelta del trattamento.

I livelli periferici dell'insulina non possono essere usati per valutare la funzione della cellula β a causa di un condotto largo e variabile dalla circolazione portale verso il fegato, e perché i dosaggi dell'insulina non possono distinguere tra endogena e insulina esogena.

All'interno delle cellule β pancreatiche, la proinsulina si scinde in una molecola di C peptide e una molecola d'insulina. La C peptide è ulteriormente compresa nella circolazione in una concentrazione equimolare a quelle dell'insulina. In antitesi all'insulina, la C peptide è solo minimamente estratta dal fegato. Le concentrazioni periferiche di C peptide riflettono perciò la secrezione di cellule β più precisamente dell'insulina. I risultati sono riportati nei grafici riportati di seguito (Fig.15). In particolare, riporto i risultati analizzati mediante il programma d'analisi SigmaPlot delle cellule stimulate con glucosio 25mM e Tolbutamide 100 μ M. Le concentrazioni di tutti i campioni analizzati e verificati in triplicati sono riportati nella tabella. (Tab 11).

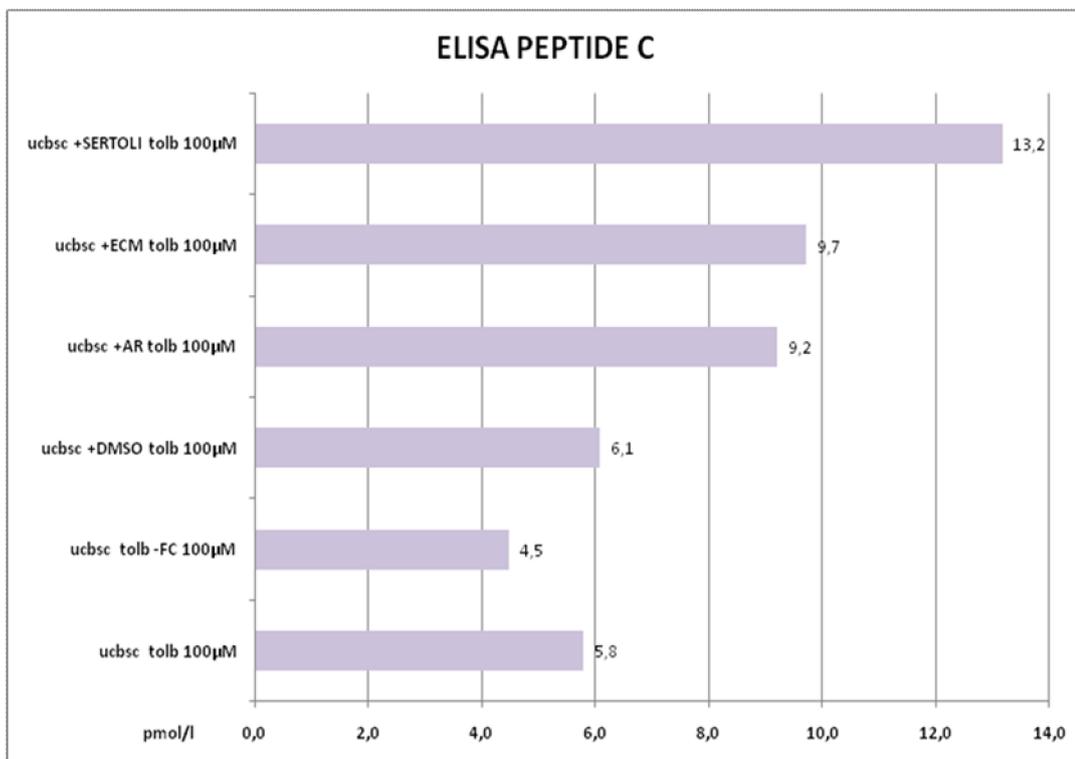
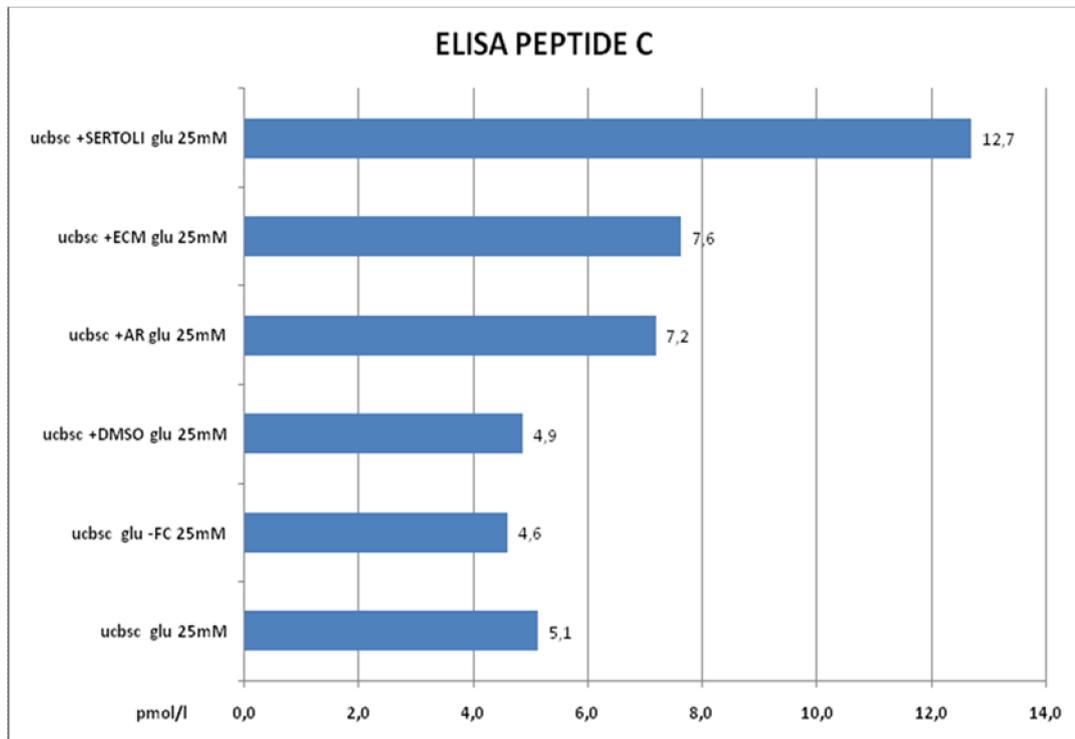


Fig.15

CAMPIONI	pmol/l
ucbsc ct glu	2,1
ucbsc glu 25mM	5,1
ucbsc ct tolb	3,1
ucbsc tolb 100µM	5,8
ucbsc -FC ct glu	3,4
ucbsc glu -FC 25mM	4,6
ucbsc ct -FC tolb	3,4
ucbsc tolb -FC 100µM	4,5
ucbsc +DMSO ct glu	3,5
ucbsc +DMSO glu 25mM	4,9
ucbsc +DMSO ct tolb	2,7
ucbsc +DMSO tolb 100µM	6,1
ucbsc +AR ct glu	3,3
ucbsc +AR glu 25mM	7,2
ucbsc +AR ct tolb	3,1
ucbsc +AR tolb 100µM	9,2
ucbsc +ECM ct glu	3,5
ucbsc +ECM glu 25mM	7,6
ucbsc+ECM ct tolb	3,1
ucbsc +ECM tolb 100µM	9,7
ucbsc ct +SERTOLI glu	3,4
ucbsc +SERTOLI glu 25mM	12,7
ucbsc +SERTOLI ct tolb	3,1
ucbsc +SERTOLI tolb 100µM	13,2

Tab.11

CONCLUSIONI

L' utilizzo delle diverse condizioni sperimentali considerate ha evidenziato durante lo sviluppo dei protocolli, vantaggi e svantaggi per ognuna delle condizioni esaminate (vedi tabella):

CAMPIONI	Vantaggi	Svantaggi
Ucbsc VI SETT SENZA FATTORI	Utile come controllo durante gli esperimenti	Aumentate probabilità di contaminazione
Ucbsc IV SETT	Rappresenta il tempo ideale di coltura	Il tempo di coltura probabilmente non permette una maggiore differenziazione dei precursori endocrini pancreatici
Ucbsc VI SETT	Un tempo di coltura maggiore sembra aumentare la presenza cluster cellulari ben differenziati.	Aumentate probabilità di contaminazione
ucbsc VI SETT + AC. RETINOICO	Aumenta notevolmente la quantità di cellule che aderiscono alla piastra La cotura può essere mantenuta fino a VI settimane	Visto i tempi di coltura così lunghi Aumentano le probabilità di contaminazione
ucbsc IV SETT + ECM	Forma caratteristici Cluster che difficilmente si riscontrano dopo 4 settimane di coltura.	L' ECM può essere utilizzato per tempi di coltura di massimo 3 settimane: dopo tale momento la matrice gel nelle piastre comincia a rompersi.
ucbsc VI SETT + SERTOLI	Aumenta notevolmente la quantità di cellule che aderiscono alla piastra. La cotura può essere mantenuta fino a VI settimane	Risultano cellule difficili da passare; le microsferule devono essere trattate delicatamente poiché facilmente possono rompersi.
CELLULE BETA PANCREATICHE	Utile controllo positivo	Difficile da recuperare

I risultati fin'ora mostrati evidenziano come tutti i modelli sperimentali da noi utilizzati rappresentano un utile mezzo per le future ricerche scientifiche. La possibilità di mettere in coltura cellule di cordone ombelicale selezionate negativamente con cellule con microsferule del sertoli più acido Retinoico e ECM (matrice extracellulare) potrebbero rappresentare il protocollo ideale per la produzione di cellule con caratteristiche funzionali e genetiche delle cellule beta pancreatiche. Di fondamentale utilità si è mostrata l'utilizzo della Real Time RT-PCR poiché in maniera quantitativa ci permette valutare quanto un gene è espresso e quindi è possibile così identificare lo stato maturativo e di espressione delle cellule.

Per la prima abbiamo riportato che le cellule staminali umane derivate dal sangue del cordone ombelicale (UCBSC) in co-coltura con le microsferule del Sertoli hanno la potenzialità di differenziarsi verso un destino pancreatico e nello specifico verso cellule secernenti insulina. Ci proponiamo nel prossimo futuro di trovare la giusta collaborazione di fattori di crescita e differenziativi che riescano a promuovere, con giuste dosi e nei tempi adatti una maggiore differenziazione e quindi la produzione di insulina.

La capacità delle cellule staminali di differenziarsi in tessuti specifici cambia a seconda dell'origine delle cellule e dello stadio di sviluppo dell'organismo dal quale si estraggono. La ricostruzione in laboratorio di organi interi, quali per esempio i reni o il cuore, con i loro sistemi linfatici o sanguigni, e con la loro complessa architettura di tessuti o parti, è considerata una meta ancora lontana per pensare ad applicazioni terapeutiche in modi e tempi realistici. I dati scientifici disponibili prospettano invece la possibilità che la coltura in laboratorio di cellule staminali capaci di riparare il danno a determinati organi possa avvenire rapidamente. In Italia, vi sono validi gruppi di ricercatori che lavorano su questi temi, con diversi orientamenti. E' necessario che essi vengano incoraggiati, vista la rilevanza conoscitiva e pratica di tali ricerche, nel quadro di un impulso generale allo sviluppo delle scienze biomediche che consenta all'Italia di evitare una collocazione subalterna e di acquisire una posizione di rilievo sul piano internazionale. L'impiego delle cellule staminali per generare tessuti ad uso terapeutico solleva sul piano tecnico molti interrogativi tra cui:

- quanto "normale" sia il tessuto che ne risulta in termini di velocità di invecchiamento, di effetti da mutazioni dannose, di contaminazione di tessuti diversi, di tolleranza immunologica
- se sia possibile generare il numero di cellule necessario per un impiego terapeutico;
- quanto e in che dosi sia efficace l'incorporazione di tessuto sano derivato dalle cellule staminali per riparare un tessuto danneggiato.

E' ovvio che a queste fondamentali domande la ricerca sarà in grado di rispondere solo dopo molto lavoro sperimentale e l'adozione preliminare di modelli animali, com'è consuetudine in tutte le sperimentazioni a fini terapeutici. Il Comitato Nazionale per la Bioetica ritiene che la possibilità di coltivare in laboratorio cellule staminali che abbiano la capacità di riprodursi indefinitamente e di specializzarsi nella formazione di qualsivoglia tessuto del corpo umano, costituisca una linea di ricerca di notevole interesse per le applicazioni terapeutiche. L'impiego di tali cellule per riparare tessuti ed in prospettiva organi lesi mediante un trapianto cellulare, apre nuove prospettive per la terapia di un ampio spettro di malattie frequenti tra gli esseri umani, oggi difficilmente curabili e spesso inguaribili. Auspica che tale linea di ricerca persegua l'obiettivo ottimale di "riprogrammare" cellule mature, cioè di poter derivare le cellule staminali capaci di differenziarsi nelle cellule dei tessuti desiderati, direttamente dalle cellule ormai differenziate del paziente di cui si intenda rigenerare il tessuto. Si tratterebbe di autotrapianto cellulare che avrebbe il notevole vantaggio della compatibilità tissutale e perciò destinato verosimilmente a importanti applicazioni terapeutiche. È ben cosciente del

fatto che attualmente le cellule staminali pluripotenti con maggiori potenzialità di differenziarsi nel più ampio spettro di tessuti (nei modelli animali e nei casi osservati anche nell'uomo) sono le cellule staminali derivate dall'embrione allo stadio di blastocisti.

Di fatto è utile continuare a lavorare su tutti i tipi di cellule staminali in attesa che ulteriori dati sperimentali siano capaci di indicare il tipo di cellula staminale da preferire per una data patologia. Negli altri paesi europei vigono leggi molto diverse tra loro: nel Regno Unito è lecita ed è finanziata con fondi pubblici la ricerca su ES umane, mentre altri paesi come la Germania e l'Austria la vietano. La Comunità Europea sta cercando di risolvere il non facile problema stabilendo delle linee guida, che però lasciano ai singoli governi nazionali la decisione finale sull'argomento. In USA invece la situazione è complessa: mentre il governo federale non concede finanziamenti, questa ricerca può essere finanziata da privati e di recente alcuni stati, quali la California, hanno operato massicci investimenti sulle staminali embrionali. Il motivo reale della situazione italiana è legato al concetto cattolico di "sacralità della vita umana", che viene esteso anche ad embrioni congelati allo stadio di poche cellule o di blastocisti. Occorre sottolineare che nel caso della ricerca scientifica quello che conta è il risultato, ovunque questo sia ottenuto. E' chiaro quindi che le difficoltà dovute ai problemi su menzionati non avranno alcun effetto sul rapido evolversi della ricerca sulle ES umane che si svolge in USA e in altri paesi e che quindi presto saranno disponibili i risultati di questo lavoro e si potrà valutare la loro applicabilità in protocolli terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Differentiation of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells to endocrine pancreatic lineage.** Parekh VS, Joglekar MV, Hardikar AA. Differentiation. 2009 Aug 5.
- 2. Martín M, Gallego-Llamas J, Ribes V, Keding M, Niederreither K, Chambon P, Dollé P, Gradwohl G. Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice.** Dev Biol. 2005 Aug 15;284(2):399-411.
- 3. Kaneto H, Miyatsuka T, Shiraiwa T, Yamamoto K, Kato K, Fujitani Y, Matsuoka TA** Crucial role of PDX-1 in pancreas development, beta-cell differentiation, and induction of surrogate beta-cells. Curr Med Chem. 2007;14(16):1745-52.
- 4. Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice.** Zhao Y, Lin B, Darflinger R, Zhang Y, Holterman MJ, Skidgel RA. PLoS One. 2009;4(1):e4226. Epub 2009 Jan 19.
- 5. Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunoisolation device: implications for diabetes cell therapies.** Lee SH, Hao E, Savinov AY, Geron I, Strongin AY, Itkin-Ansari P. Transplantation. 2009 Apr 15;87(7):983-91.

6. **A secretory function of human insulin-producing cells in vivo.** Hu YH, Wu DQ, Gao F, Li GD, Yao L, Zhang XC. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009 Jun;8(3):255-60.
7. **Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration.** Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. *Cytotherapy.* 2009;11(4):377-91. Review.
8. GAO Feng, WU De-quan, HU Yan-hua and JIN Guang-xin **Extracellular matrix gel is necessary for *in vitro* cultivation of insulin producing cells from human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells** *Chinese Medical Journal* 2008; 121(9):811-818 811
9. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. **Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture.** *Dev Biol* 2000; 15;227:271-8
10. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L et al . **Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes.** *Genes Dev* 1998;12:1763-1768
11. Beattie GM, Itkin-Ansari P, Cirulli V, Leibowitz G, Lopez AD, Bossie S, Mally MI, Levine F, Hayek A. **Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets.** *Diabetes* 1999;48:1013-9
12. Beattie GM, Montgomery AM, Lopez AD, Hao E, Perez B, Just ML, Lakey JR, Hart ME, Hayek A. **A novel approach to increase human**

- islet cell mass while preserving beta-cell function.** *Diabetes* 2002;51:3435-9
- 13. Boscher AC, Crepaldi SC, et al. Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanisms in cultured neonatal rat islets.** *Endocrinology* 1993;133:515-520
- 14. Bo Sun et al. Induction of human umbilical blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure.** *Science Direct* 354,919-923;2007
- 15. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.** *Cell* 2005;122:947-56
- 16. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice.** *Science* 2000, 290:1775-9
- 17. Butler AE, Huang A, Rao PN, Bhushan A, Hogan WJ, Rizza RA, Butler PC. Hematopoietic stem cells derived from adult donors are not a source of pancreatic beta-cells in adult nondiabetic humans.** *Diabetes.* 2007;56:1810-6
- 18. Butler PC, Meier JJ, Butler AE, Bhushan A. The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:758-68
- 19. Chase LG, Ulloa-Montoya F, Kidder BL, Verfaillie CM. Islet-derived fibroblast-like cells are not derived via epithelial-mesenchymal transition from Pdx-1 or insulin-positive cells.** *Diabetes* 2007;56:3-7

20. Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. **Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny.** *Stem Cells* 2004;22:1070-84
21. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. **Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol* 2006;24:1392-401
22. De León DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA. **Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy.** *Diabetes* 2003;52:365-71
23. Denner L, Bodenbun Y, Zhao JG, Howe M, Cappo J, Tilton RG, Copland JA, Forraz N, McGuckin C, Urban R. **Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin.** *Cell Prolif* 2007;40:367-80
24. Dohrmann C; Gruss P et al **Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in pancreas** *Mech Dev* 2000, 92:47-54
25. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. **Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.** *Nature* 2004 May 6;429(6987):41-6.
26. Edlund H. **Development biology of the pancreas.** *Diabetes* 2001; 50 Suppl 1:S5-9
27. Esni F, Stoffers DA, Takeuchi T, Leach SD. **Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas.** *Mech Dev* 2004;121:15-25

28. Faglia G. **Malattie del sistema Endocrino**. McGraw-Hill 2^a edizione
1997
29. Faich GA, Fishbein HA, Ellis SE. **The epidemiology of diabetic acidosis: a population-based study**. *Am J Epidemiology*. 1983; 117;551-558
30. Forraz N, Pettengell R, McGuckin CP. **Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for ex vivo expansion and enriched for LTC-IC**. *Stem Cells* 2004;22:100-8
31. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. **Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors**. *Development* 2002;129:2447-57
32. Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G. **Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny**. *Development* 1995;121:11-8
33. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. **Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development**. *Endocrinology* 2005;146:1025-34
34. Harris DT. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem cell Rev* 2008; 10;1007
35. Hebrok M, Kim SK et al. **Regulation of pancreas development by hedgehog signaling** *Development* 2000, 127:4905-13

- 36.** Herrera PL, Huarte J, Sanvito F. **Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene.** *Development* 1991; 113:1257-65
- 37.** Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK. **Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells.** *PLoS Med* 2005;2:e103
- 38.** Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG, Liu S, Willett WC, Speizer FE et al. **The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up.** *Arch Intern Med* 2001;161:1717-23.
- 39.** Hui H, Perfetti R. **Pancreas duodenum homebox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood.** *Eur J Endocrinol* 2002;146:129-141
- 40.** Itkini-Ansari P, Demeterco C, et al. **PDX-1 and cell-cell contact act in synergy to promote delta- cell development in a human pancreatic endocrine precursor cell line.** *Mol Endocrinol* 2000, 14:814-822
- 41.** Jacquemin P, Durviaux SM et al. **Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3.** *Mol Cell Biol* 2000;20:4445-4454
- 42.** Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, Majumdar AS. **Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells.** *Stem Cells* 2007;25:1940-53
- 43.** Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, Qing T, Sun X, Zhang P, Ding M, Li D, Deng H. **In vitro derivation of functional**

- insulin-producing cells from human embryonic stem cells.** *Cell Res* 2007;17:333-44
44. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. **Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.** *Exp Hematol* 2002;30:896-904
45. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. **Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice.** *Nature* 1994;371:606-609
46. Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, Sanai Y, Yonekawa H, Yazaki K, Tam PP, Hayashi Y. **Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice.** *Development* 2002;129:2367-79
47. Kim SK, Hebrok M, Melton DA. **Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development.** *Development* 1997;124:4243-52
48. Klein T, Ling Z, Heimberg H, Madsen OD, Heller RS, Serup P. **Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas.** *J Histochem Cytochem* 2003;51:697-706
49. Klöppel G, Löhr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. **Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited.** *Surv Synth Pathol Res.* 1985;4(2):110-25.
50. Korbitt GS, Elliott JF, Ao Z, Smith DK, Warnock GL, Rajotte RV. **Large scale isolation, growth, and function of porcine neonatal islet cells.** *J Clin Invest* 1996;97:2119-29

51. Lechner A, Nolan AL, Blacken RA, Habener JF. **Redifferentiation of insulin-secreting cells after in vitro expansion of adult human pancreatic islet tissue.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:581-8
52. Leibowitz G, Oprescu AI, Uçkaya G, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. **Insulin does not mediate glucose stimulation of proinsulin biosynthesis.** *Diabetes* 2003;52:998-1003
53. Li H, Edlund H. **Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9.** *Natur Genet* 1999;23:67-70
54. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. **Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets.** *Science* 2001; 292:1389-94
55. Martin F, Salinas E, Barahona F, et al. **Engineered peptides corresponding to segments of the H3 domain of syntaxin inhibit insulin release both in intact and permeabilized mouse pancreatic beta cells .** *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:83-86
56. Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ, Draper JS, Bahrami AR, Morton I, Moore HD, Andrews PW. **Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells.** *Stem Cells* 2004;22:659-68
57. Melloul D, Marsak S, Cerasi E. **Regulation of insulin gene transcription** *Diabetologia* 2002;45:309-326
58. McGuckin CP, Forraz N, Allouard Q, Pettengell R. **Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro.** *Exp Cell Res* 2004;292:350-9

59. McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navran S, Zhao J, Urban R, Tilton R, Denner L. **Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood.** *Cell Prolif* 2005;38:245-55
60. Meier JJ, Nauck MA. **Glucagon-like peptide 1(GLP-1) in biology and pathology.** *Diabetes Metab Res Rev* 2005;21:91-117
61. Noaksson K, Zoric N, Zeng X, Rao MS, Hyllner J, Semb H, Kubista M, Sartipy P. **Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using real-time PCR.** *Stem Cells* 2005;23:1460-7
62. Offield MF, Jetton TL et al. **PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum.** *Development* 1996; 122:983-995
63. Orci L. **Macro-and micro domains in the endocrine pancreas.** *Diabetes* 1982; 31:538-565
64. Pertusa JA, Sanchez-Andres JV et al. **Effects of calcium buffering on glucose-induced insulin release in mouse pancreatic islet: an approximation to the calcium sensor.** *J Physiol* 1999;520:473-483
65. Pessina A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L. **Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:315-22
66. Piper K, Ball SG, Turnpenny LW, Brickwood S, Wilson DI, Hanley NA. **Beta-cell differentiation during human development does not rely on nestin-positive precursors: implications for stem cell-derived replacement therapy.** *Diabetologia.* 2002;45:1045-7

67. Proctor SJ, Dickinson AM, Parekh T, Chapman C. **Umbilical cord blood banks in the UK.** *BMJ* 2001;323:60-1
68. Querol S, Capmany G, Azqueta C, Gabarró M, Fornas O, Martín-Henao GA, García J. **Direct immunomagnetic method for CD34+ cell selection from cryopreserved cord blood grafts for ex vivo expansion protocols.** *Transfusion* 2000;40:625-31
69. Roche E, Sepulcre MP, Enseñat-Waser R, Maestre I, Reig JA, Soria B. **Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells: a review of progress.** *Med Biol Eng Comput* 2003;41:384-91
70. Ruhnke M et al. **Differentiation of in Vitro-Modified Human Peripheral Blood Monocytes into Hepatocyte-like and Pancreatic Islet-like cells.** *Gastroenterology* 128,1774-1786;2005
71. Sander M, German MS. **The beta cell transcription factors and development of the pancreas.** *J Mol Med.* 1997;75:327-40
72. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. **Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters.** *Stem Cells.* 2004;22:265-74
73. Sevtja JM, Ferrer J. **Transcriptional networks controlling pancreas development and beta cell function** *Diabetologia* 2004, 47:597-613
74. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA et al. **Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus used a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.** *N. Engl J Med* 2002, 343:230-238
75. Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, Deng H. **Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a**

novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid.

Stem Cells. 2005;23:656-62

- 76.** Soares MB, Schon E et al. **RNA-mediated gene duplication: the rat proinsulin I gene is a functional retroposon.** *Mol Cell Biol* 1985, 5:2090-2013
- 77.** Soria B. **In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells.** *Differentiation* 2001;68:205-19
- 78.** Sosa Pineda B, et al. **The pax-4 gene is essential for differentiation of insulin producing beta cells in the mammalian pancreas.** *Nature* 1997;386:399-402
- 79.** Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS, Kang KS. **Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:919-23
- 80.** Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S, Yasukawa M, Kanemaru T, Ishibashi H, Shultz LD, Harada M. **Human cord blood--derived cells generate insulin-producing cells in vivo.** *Stem Cells*2005;23:1409-16
- 81.** Yue F, Cui L, Johkura K, Ogiwara N, Sasaki K. **Induction of midbrain dopaminergic neurons from primate embryonic stem cells by coculture with Sertoli cells.** *Stem Cells*2006;24:1695-706
- 82.** Zhao Y, Wang H, Mazzone T. **Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics.** *Exp Cell Res*2006;312:2454-64

- 83.** Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. **Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.** *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
- 84.** Wilson ME, Scheel D et al. **Gene expression cascades in pancreatic development.** *Mech Dev* 2003;120:65-80

FINE