RELAZIONE FINALE DELL'ATTIVITA' SVOLTA NELL'AMBITO DEL PROGETTO DI RICERCA DAL TITOLO :

"RIPARAZIONE DI LESIONI OSTEOCARTILAGINEE MEDIANTE SCAFFOLD NANO STRUTTURATI E CELLULE PROGENITRICI CD34"

Borsista: Dott.ssa Silvia Mattia

Responsabile Scientifico: Prof. Filippo Castoldi Co-responsabile: Dott. Antonio Marmotti

Obiettivo dello studio

Lo scopo di questo studio preclinico è stato di dimostrare la pluripotenzialità di cellule staminali mesenchimali di origine cordonale (UC-MSC) e, in particolare, il potenziale condrogenico e osteogenico delle UC-MSC su scaffold nanostrutturati tridimensionali, al fine di identificare la rilevanza clinica per i pazienti che potrebbero beneficiare di terapia con cellule mesenchimali.

Approccio sperimentale

Processamento del cordone ombelicale

Grazie ad una collaborazione con la S.C.D.U. Ginecologia ed Ostetricia, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano di Torino, sono stati prelevati cordoni ombelicali freschi umani in seguito a parto cesareo programmato. I cordoni ombelicali, trasportati in un mezzo di trasporto contenente soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), 200 mg/100 ml ciprofloxacina, 500 UI di eparina, sono stati processati immediatamente ogob trasporto laboratorio. Dopo aver misurato la lunghezza ed il peso, il cordone ombelicale è stato lavato in PBS per rimuovere le tracce globuli rossi contaminanti. 11 tessuto cordonale è in sminuzzato in frammenti di 3 cm di lunghezza e tagliato longitudinalmente in modo da esporre la superficie interna del cordone. Successivamente sono stati effettuati tanti taglietti longitudinali in modo da permette la fuoriuscita delle cellule dal tessuto. Tali frammenti sono stati ulteriormente tagliati in piccoli pezzi da 4-7 mm ed in seguito trasferiti in piastre Petri da 60 cm2, contenenti il terreno per espandere le cellule staminali mesenchimali, usato precedentemente per tagliare i pezzi di cordone, con la faccia interna rivolta sul fondo della piastra, ed incubati a 37°C, in atmosfera umida con 5% di CO2 per 15 giorni. Il terreno di coltura per l'espansione delle UC-MSC era composto da: Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 (D-MEM), 5% lisato piastrinico umano ottenuto da donatori sani, 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1X penicillina/streptomicina, 1X sodio piruvato, 1X amminoacidi non-essenziali, 500 IU eparina (Fig. 1A, B) II tessuto cordonale è stato lasciato indisturbato in cultura e monitorato fino a 15 giorni per consentire l'identificazione nelle piastre di piccole colonie di MSC. Successivamente, i frammenti di cordone ombelicale sono stati rimossi e le cellule aderenti sono state espanse per ulteriori passaggi di coltura cellulare.



Fig. 1A



Fig.1E



Fig.1C

Coltura delle UC-MSCs

Dopo due settimane dalla semina iniziale (giorno 14) sono stati rimossi i frammenti di tessuto cordonale, e le cellule aderenti sono state espanse per ancora due settimane. Ogni 3-4 giorni è stato rinnovato il 40% del terreno di coltura. Dopo 28 giorni, le cellule aderenti (passaggio 0, P0) sono state staccate, centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti, risospese nel terreno di coltura e piastrate nuovamente per un ulteriore step di espansione alla densità di 100-200 cells/cm², fino ad arrivare a confluenza (P1). Alla fine del passaggio 1 (giorno 42), sono state contate le cellule vive con il metodo 'trypan blue dye exclusion'. Le UC-MSCs isolate sono state impiegate per l'analisi immunofenotipica, i diversi tipi di differenziamento. Infine le UC-MSCs isolate da un solo cordone sono state impiegate per l'analisi della lunghezza del telomero.

Caratterizzazione immunofenotipica delle UC-MSC

L'immunofenotipo delle UC-MSCs è stato studiato analizzando in citofluorimetria l'espressione dei seguenti marker di superficie: CD90, CD73, CD105, CD44, CD29, CD34, HLA-ABC e HLA-DR. L'analisi è stata effettuata mediante l'uso dello strumento FACScan e del software CellQuest. È stato acquisito un numero di eventi pari a 10000.

Analisi della lunghezza del telomero

La lunghezza dei telomeri è stata valutata nelle UC-MSC ai diversi passaggi di coltura (dal passaggio 0 al passaggio 5). La valutazione è stata effettuata mediante analisi Southern blot, utilizzando circa 5x106 cellule. Brevemente, il DNA (19.2 µg) è stato digerito mediante l'impiego di enzimi di restrizione, nello specifico Hinf I e Rsa I. I frammenti di DNA digerito sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 0.8%, nel running buffer 1X Tris-acetate-EDTA. Per trasferire il DNA separato mediante elettroforesi, è stata utilizzata una membrana di nylon 'positive charged'. In seguito al trasferimento overnight, la membrana di nylon è stata esposta ai raggi ultravioletti per fissare i frammenti di DNA. Per la fase di ibridazione è stato utilizzato il kit TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche Diagnostic). La membrana è stata successivamente immersa in una soluzione pre-ibridizzante (contenente 2 µl di sonda specifica per il telomero marcata con digossigenina [DIG]) per circa 2 ore a 62°C su un basculante e successivamente in una soluzione ibridizzante per 3 ore alla stessa temperatura. Dopo l'ibridazione, la membrana è stata lavata due volte a temperature ambiente con il 'stringent wash buffer l' (2X SSC, 0,1% SDS) per 10 minuti ed in seguito a 37°C nel 'stringent wash buffer II' (0.2X SSC, 0.1% SDS) per 20 minuti. In seguito, la membrana è stata incubata con la soluzione bloccante 1X per 30 minuti a temperature ambiente e, successivamente, con l'anticorpo specifico per DIG legato covalentemente con la fosfatasi alcalina (AP). Infine, sono state aggiunte alcune gocce di substrato chemiluminescente (CDP-Star) alla membrana al fine di stimolare la AP a produrre emissione luminosa. L'emissione è stata acquisita da un film X-ray (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film) e scannerizzata per l'analisi. L'analisi è stata effettuata usando il softwer Quantity One (BioRad).

Differenziamento condrocitario in ipossia e normossia

Per il differenziamento condrocitario sono state utilizzate le UC-MSC al primo passaggio di coltura cellulare. Sono stati utilizzati terreni specifici provenienti dall'azienda EuroClone S.p.A, con il quale collaboriamo attivamente. Tali terreni contengono un medium per le cellule mesenchimali staminali e vari supplementi per i diversi differenziamenti.

Per il differenziamento condrogenico è stato impiegato il sistema della coltura cellulare a pellet, utilizzando circa 1×10^6 di UC-MSC. Il differenziamento condrocitario è stato effettuato sia in condizioni di normossia (5% CO₂ e 21% O₂) che in condizioni di ipossia (5% CO₂ e 1% O₂). Tale ambiente è stato simulato nella camera ipossica, che permette di riprodurre l'ambiente ipossico presente nell'area meniscale. I pellet sono stati coltivati per 28 giorni nel terreno di EUROMED Chondrogenic Differentiation Kit, con l'aggiunta di 10 ng/ml di Transforming Growth Factor β 3. A fine coltura sono stati fissati in etanolo 80% e sezionati al microtomo, in modo da ottenere delle sezioni da utilizzare per le colorazioni istologiche specifiche per la cartilagine, quale ad esempio il safranin-O (colorante che evidenzia la presenza dei glicosamminoglicani).

Per quantificare il contenuto s-GAG (glicosamminoglicani) nel pellet condrocitario, sia in ipossia e che in normossia, è stato utilizzato il sistema di coltura pellet sopra descritto. Al termine dei 28 giorni di coltura, i campioni sono stati sottoposti ad un'analisi biochimica, mediante il saggio di quantificazione colorimetrica per s-GAG (condotto secondo il metodo descritto da Hoemann et al.). Brevemente, i campioni sono stati direttamente digeriti in papaina, a pH 7 a 60°C per 16-24 ore. La soluzione di digestione era composta da 5 mM L di cisteina, 100 mM di Na₂HPO₄, 5 mM di EDTA e 125 mg/ml papaina tipo III. Dopo la digestione, i campioni sono stati centrifugati a 21.000 g per 5 min a temperatura ambiente. Il supernatante è stato trasferito in una nuova provetta e immediatamente sottoposto al test di quantificazione. In una piastra da 96 pozzetti, sono stati combinati 50 μl del campione digerito in papaina e 200 μl di soluzione reagente DMMB (composta da 40 mM di NaCl, 40 mM di glicina, 46 mM di DMMB, pH 3,0). I campioni sono stati analizzati da un lettore di piastra a 525 nm di assorbanza utilizzando come standard la cartilagine di squalo (condroitin solfato C, concentrazione da 0,125 mg a 1,25 mg).

I valori di concentrazione di s-GAG ottenuti dall'analisi biochimica sono stati rapportati alla quantità di DNA presente nel pellet condrocitario. L'analisi del contenuto di DNA è stata effettuata mediante un saggio spettrofotometrico in fluorescenza.

Differenziamento condrocitario ed osteocitario su scaffold tridimensionali

La differenziazione osteogenica su scaffold è stata effettuata su Orthoss (Gruppo Geistlich) descritto precedentemente, seminando le UC-MSC al primo passaggio di coltura. Lo scaffold è stato suddiviso in frammenti cubici di circa 1cm². Successivamente, gli scaffold sono stati rivestiti da uno strato di fibronectina, mediante immersione in una soluzione contenente 50 mg/ml di fibronectina per 4 ore a temperatura ambiente. Lo scaffold è stato lasciato asciugare over-night sotto cappa cellulare sterile, e successivamente utilizzato per la semina delle UC-MSC. In particolare, le cellule sono state risospese in colla di fibrina alla concentrazione di 6x10⁶ cellule/scaffold, seminate e coltivate nel terreno di coltura specifico per il differenziamento osteogenico, a 37°C, in atmosfera umida con 5% di CO₂ per 10 giorni, 20 giorni e 30 giorni. A fine coltura i costrutti sono stati decalcificati, fissati in formalina, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo. L'analisi istologica è stata effettuata colorando le sezioni con ematossilina/eosina ed alizarin-red. L'analisi in immunofluorescenza ha permesso di valutare l'espressione dell'osteocalcina e di RUNX2 (proteine che giocano un ruolo importante nel differenziamento osteocitario). La differenza di intensità di fluorescenza tra le colture a 10, 20, 30 giorni è stata determinata utilizzando il programma ImageJ, ed analizzata statisticamente con il software statistico GraphPad Prism 5.0.

Per la differenziazione condrogenica su scaffold tridimensionale, sono stati utilizzati i due diversi tipi di scaffold: Hyaff-11 e Chondrogide. Lo scaffold Hyaff-11 (FIDIA Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italia) è una matrice polimerica, ottenuta per esterificazione dell'acido ialuronico con alcoli diversi (estere benzilico di acido ialuronico). L'acido ialuronico è un polisaccaride lineare costituito da seguenze ripetute di acido glucuronico e N-acetilglucosamina, presente principalmente nella matrice extracellulare di molti tessuti come cartilagine, cordone ombelicale e fluido sinoviale. Grazie alle sue proprietà chimico-fisiche può interagire con differenti tipi cellulari attraverso recettori di membrana e intervenire in diversi processi biologici quali l'organizzazione dei proteoglicani, il differenziamento e la migrazione cellulare. I biomateriali a base di acido ialuronico garantiscono quindi caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità, la crescita tridimensionale delle cellule e la produzione di matrice extracellulare. Lo scaffold Chondro-gide (Geistlich Group, Svizzera) è una matrice di collagene suino di tipo I/III a doppio strato, con un lato compatto ed un lato poroso. Lo strato compatto consta di una superficie con funzione di barriera cellulare, in quanto impedisce che le cellule staminali mesenchimali si diffondano nella cavità articolare proteggendole quindi da sollecitazioni meccaniche. Il lato poroso della matrice è formato da fibre di collagene libere, che favoriscono la penetrazione e l'adesione cellulare. Brevemente, 2x106 UC-MSC/cm² sono state risospese in 50 μl di terreno di differenziamento condrogenico e seminate sugli scaffold. I costrutti sono stati lasciati 3-4 ore a 37°C, in atmosfera umida con 5% di CO2 per permettere l'adesione delle cellule allo scaffold. Successivamente sono state aggiunte due gocce di colla di fibrina e 2 ml di terreno di differenziamento condrogenico. Anche in questo caso sono state effettuate colture in ambiente ipossico (5% CO2 e 1% O2) e (5% ambiente normossico CO₂ 21%

Dopo 1 mese di coltura, i costrutti sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo. Successivamente, le sezioni istologiche sono state colorate con ematossilina/eosina e safranin-o in modo da

analizzare la distribuzione delle cellule all'interno dello scaffold e la produzione di matrice cartilaginea. L'analisi in immunofluorescenza ha permesso di valutare l'espressione dei principali marcatori condrocitari (sox-9, il collagene di tipo II) e dei marcatori ipossici (HIF-1 α , HIF-2 α).

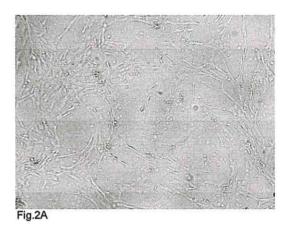
Infine, per confrontare l'intensità di fluorescenza di ogni singolo marcatore tra le colture in ipossia e quelle in normossia, è stato utilizzato il software ImageJ. L'espressione dei marcatori è stata analizzata statisticamente mediante l'impiego del software statistico GraphPad Prism 5.0.

Risultati ottenuti

Caratterizzazione morfologica ed immunofenotipica delle UC-MSCs

Nelle colture primarie, le cellule aderenti migrate dal tessuto cordonale presentano una forma fibroblastica ed iniziano a formare colonie dopo circa 14 giorni dalla seminale iniziale dei pezzi di cordone.

I frammenti di cordone sono stati rimossi dopo circa 14 giorni dalla semina iniziale, e le cellule aderenti hanno impiegato circa 10 giorni per ottenere una confluenza pari al 60% (Fig. 2A), mentre dopo 14 giorni si osserva una confluenza pari al 100%. Dopo 28 giorni (P0) sono state raccolte le colonie di UC-MSCs (P0) e piastrate nuovamente per un'ulteriore espansione (P1). Dopo 14 giorni di coltura si osserva la confluenza totale al P1 (giorno 42).

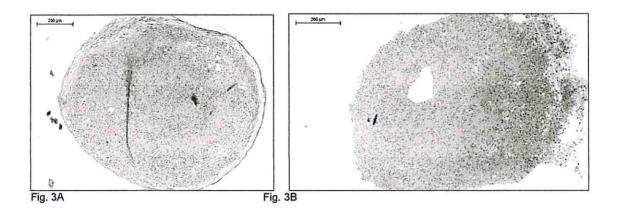


La media delle cellule mesenchimali ottenute al giorno 42 (P1) è $23,37 \times 10^6$. In particolare, dalla semina iniziale (giorno 0) abbiamo ottenuto alla fine del P1 (giorno 42) $0,78 \times 10^6$ cellule/gr di cordone ombelicale seminato in piastra (peso medio 33,9 gr e lunghezza media 43,3 cm).

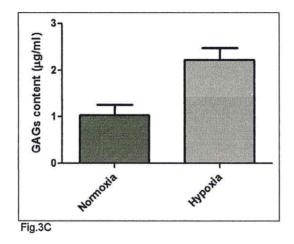
Per analizzare il fenotipo delle cellule isolate da cordone ombelicale abbiamo utilizzato l'analisi in citometria a flusso. Tali cellule mostrano positività per i principali marker di superficie delle cellule staminali mesenchimali, quali: CD73, CD90, CD105, CD44 e CD29. Inoltre tali cellule sono negative per il CD34, marker delle cellule staminali emopoietiche.

Differenziamento condrocitario in condizioni di ipossia e normossia

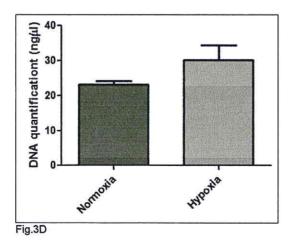
Per studiare il differenziamento condrogenico, abbiamo utilizzato il sistema della coltura a pellet in terreno di differenziamento condrogenico. Dopo 28 giorni di coltura, sia per la coltura in normossia che per la coltura in ipossia, il pellet cordrocitario mostra positività per la colorazione istologica con Safranin-O (Fig. 3A normossia, fig. 3B ipossia). Le UC-MSCs mostrano una parete cellulare tondeggiante, simile alle cellule MSC isolate da midollo osseo (dati non mostrati).



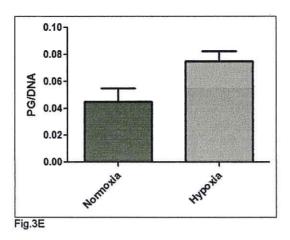
Inoltre, i risultati ottenuti dall'analisi biochimica mostrano che vi è una differenza statisticamente significativa (p<0,01) tra il contenuto di proteoglicani in ambiente ipossico e normossico (Fig.3C).



La quantità di DNA nei pellet condrocitari rimane invariata, in accordo con il principio secondo cui le cellule in differenziamento non devono andare incontro a proliferazione (p>0,05, Fig.3D).



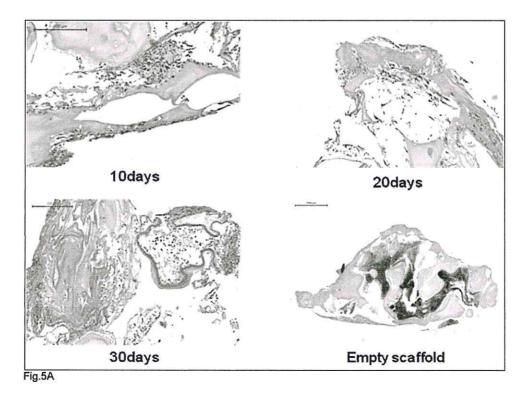
Infine, l'analisi statistica mostra che rapporto tra il contenuto di proteoglicani ed il contenuto di dna nel pellet condrocitario è maggiore, e statisticamente significativo (p<0,05), in ambiente ipossico rispetto all'ambiente normossico (Fig.3E).



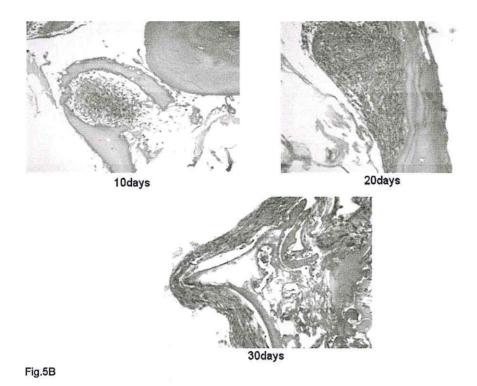
I risultati ottenuti dagli esperimenti di differenzazione *in vitro* mostrano che le cellule staminali mesenchimali isolate da cordone ombelicale umano hanno differenziato in maniera ottimale in senso condrocitario, sia in normossia che, in misura maggiore, in ipossia. In particolare, i risultati confermano l'effetto pro-condrogenico dell'ipossia in vitro. È da precisare che tali cellule sono 'commissionate' verso le specifiche linee cellulari e non sono equiparabili a cellule differenziate provenienti dai tessuti specifici: tale stato di differenziazione iniziale potrebbe essere ulteriormente migliorato dall'influenza del microambiente *in vivo* e completare così il processo di differenziazione.

Differenziamento osteocitario di UC-MSCs su scaffold

I risultati relativi al differenziamento osteocitario su scaffold Orthoss mostrano che vi è una considerevole cellularità del costrutto ad ogni intervallo temporale considerato (10, 20 e 30gg) comparato con le sezioni di scaffold senza cellule (Fig. 5A).



L'analisi mediante colorazione con Alizarin Red ha fornito risultati sovrapponibili, evidenziando i depositi di calcio verosimilmente aumentanti di importanza analizzando i costrutti a periodi temporali crescenti sempre di 10, 20 e 30 giorni complessivi (Fig.5B).



Ciò che effettivamente risulta più significativo sono stati i risultati ottenuti tramite l'analisi semiquantitativa in immunofluorescenza dell'espressione del fattore trascrizionale osteocalcina (Fig.5C).

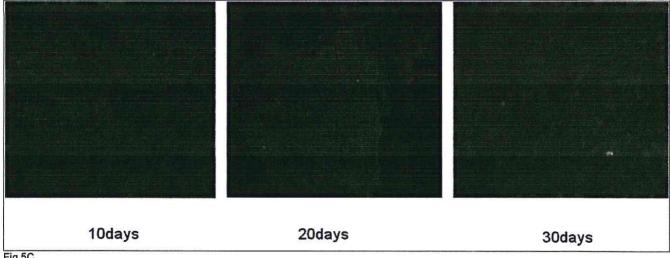
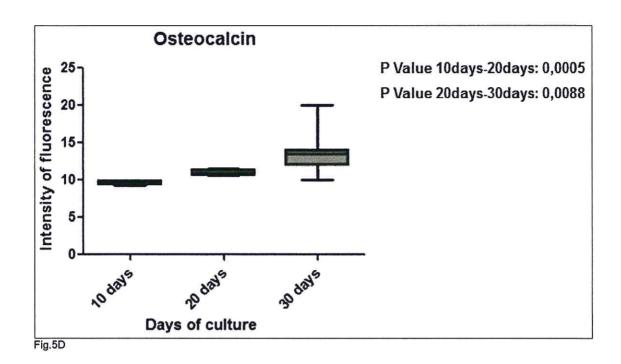


Fig.5C

Le immagini in immunofluorescenza mostrano un intuibile aumento di intensità negli intervalli di tempo analizzati, intuizione confermata dal grafico e dal dato della significatività statistica (Fig.5D).



Risultati analoghi sono stati ottenuti dall'analisi in immunofluorescenza dell'espressione del fattore trascrizionale RUNX2 (Fig.5E, 5F).

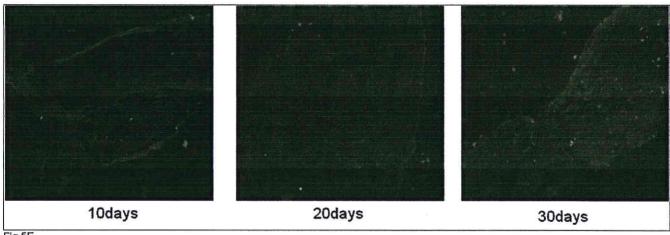
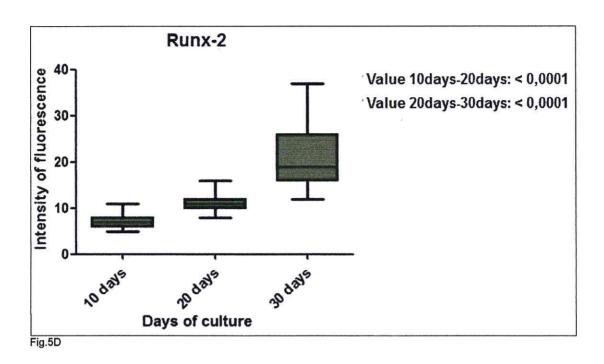


Fig.5E



Differenziamento condrocitario di UC-MSCs su scaffold

Per studiare il differenziamento condrogenico su scaffold, sono stati utilizzato due diversi tipi di scaffold (Hyaff-11 e Chondro-Gide) in cui sono state seminate le UC-MSCs in terreno di differenziamento condrogenico, mantenendo le colture in condizioni di normossia e ipossia. È stata scelta una tensione di ossigeno del 10%, in quanto è stato osservato in precedenti esperimenti che un livello troppo basso di ipossia può determinare una sofferenza cellulare e apoptosi. Inoltre, essendo le cellule disposte non in monostrato, ma su supporto tridimensionale, è ipotizzabile la formazione di un gradiente di concentrazione di ossigeno all'interno del costrutto, che determina una diminuzione della tensione di ossigeno con profondità crescente.

Le colorazioni istologiche hanno messo in evidenza le differenze dei due costrutti: nel Chondro-Gide le cellule si distribuiscono esclusivamente sulla superficie porosa; nell'Hyaff-11 le cellule hanno la possibilità di penetrare più all'interno della struttura, distribuendosi così su una superficie maggiore.

Il conteggio cellulare non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra normossia e ipossia in entrambi gli scaffolds, dimostrando che il grado di ipossia scelto non ha determinato una sofferenza cellulare e apoptosi all'interno del costrutto (dati non mostrati). La colorazione istologica Safranin-O ha permesso di valutare la quantità di proteoglicani presenti all'interno della neomatrice. In ipossia, la colorazione è più positiva ed intensa, dimostrando che viene sintetizzata più matrice rispetto alla normossia, ed è visibilmente molto marcata nel Chondro-Gide (Fig.4A).

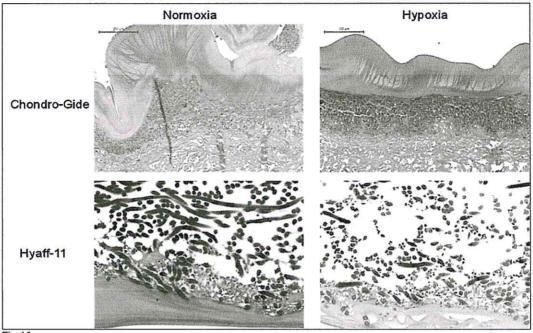


Fig.4A

La conferma del maggior potenziale condrogenico delle UC-MSCs nell'ambiente ipossico è data dall'immunofluorescenza. Infatti, sia su Chondro-Gide che su Hyaff-11, la riduzione della tensione di ossigeno determina l'aumento dell'espressione a livello nucleare di tre fattori trascrizionali, SOX-9 (Fig.4B, C), HIF-1 α (Fig.4D, E) e HIF2 α (Fig.4F, G), in modo simile e statisticamente significativo (p<0,001).

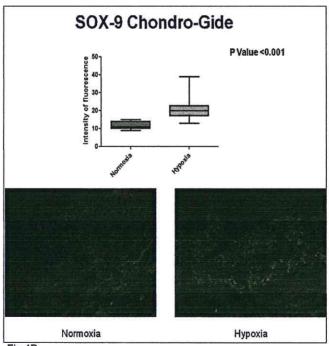


Fig.4B

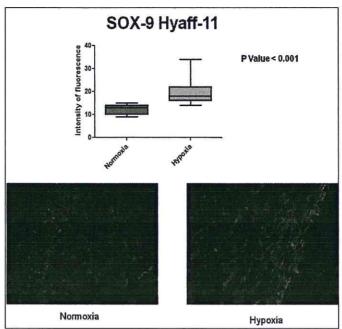


Fig.4C

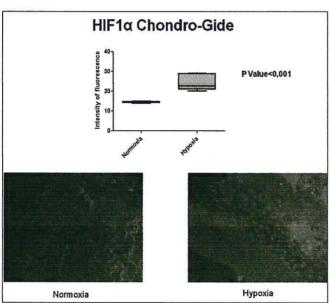


Fig.4D

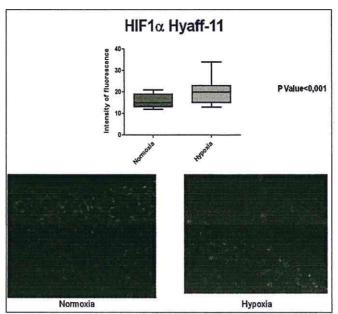


Fig.4E

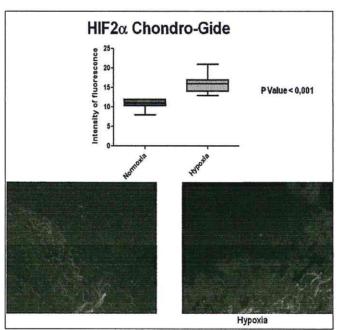


Fig.4F

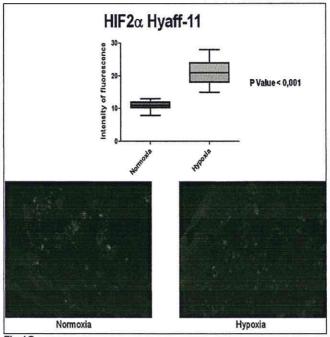


Fig.4G

Anche la produzione di collagene di tipo II aumenta nei costrutti incubati in ipossia. In questo caso, però, è presente una differenza statisticamente significativa soltanto nell'Hyaff-1 (p<0,005, Fig.4H) e non nel Chondro-Gide (p>0,05, Fig.4I). Questa maggior produzione di collagene di tipo II indotta dall'ipossia, insieme alla maggior porosità, che permette alle cellule di penetrare all'interno della struttura e alla possibilità che si instaurino delle interazioni tra le cellule e le fibre di acido ialuronico, rendono l'Hyaff-11 un supporto ottimale da utilizzare nel campo dell'ingegneria tissutale per la riparazione di lesioni cartilaginee.

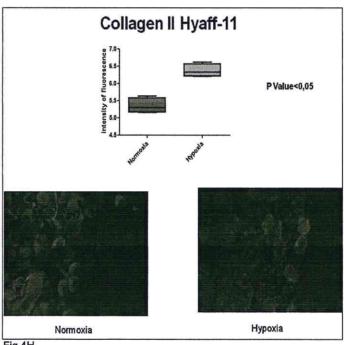


Fig.4H

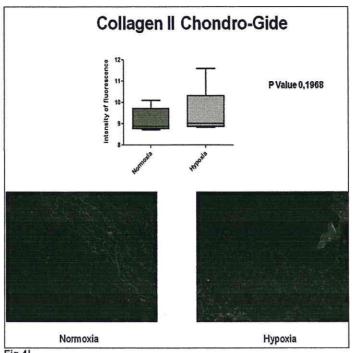


Fig.41

Analisi lunghezza telomerica L'analisi della lunghezza del telomero delle UC-MSCs ai diversi passaggi di coltura (dal passaggio 0 al passaggio 5) (Fig.6) mostra che non vi è nessuna significativa differenza nei passaggi di coltura cellulare: il valore mediano del telomero delle UC-MSCs è di 8684 paia di basi (8,684 kbp).

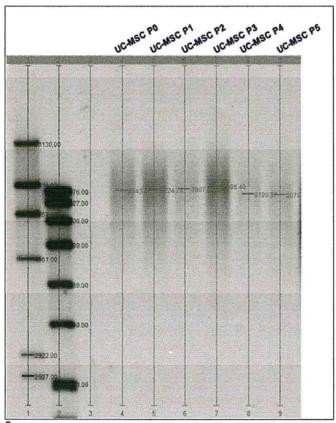


Fig.6

Conclusioni

Le UC-MSCs presentano un grande interesse sia per la medicina rigenerativa che per la loro attività immunomodulatoria. In questo lavoro, ci siamo focalizzati sulla possibilità di ottenere dal cordone ombelicale umano cellule dotate di capacità differenziative notevoli nell'ambito dei processi di riparazione tissutale in ambito ortopedico.

In primo luogo, tale studio evidenzia come le UC-MSCs, veicolate in scaffold condrogenici, presentino segni di differenziamento verso la linea condrogenica maggiori quando sono incubate in condizioni ipossiche, condizione simile a quella della superficie cartilaginea. Tale proprietà rende le UC-MSCs dei candidati allogenici promettenti per la riparazione in un solo tempo chirurgico ("one-stage") delle lesioni cartilaginee. In secondo luogo, in tale studio è stata valutata l'osteogenesi delle cellule staminali mesenchimali seminate sullo scaffold Orthoss: i risultati ottenuti indicano come 30 giorni il periodo di tempo adeguato affinché le cellule mesenchimali staminali si differenzino ed esprimano maggiormente i fattori trascrizionali tipici degli osteociti: RUNX2 e osteocalcina. Infine, la lunghezza telomerica rimane costante nei vari passaggi in coltura cellulare, a significare che non viene vi è senescenza cellulare nei primi passaggi di coltura in vitro.

Le UC-MSCs sembrano avere un buon potenziale per essere dei buoni candidati nei processi di riparazione tissutale in ambito ortopedico. Il concetto di questo studio può essere considerato davvero come una scelta ipotetica e futura per pazienti che trarrebbero profitto dalla terapia con cellule staminali. Non rimane a questo punto che sviluppare un modello animale pre-clinico che testi in vivo i risultati ottenuti, con l'obbiettivo un giorno di traslare l'esperienza ottenuta in un organismo umano.

Bibliografia:

- 1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-147.
- 2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-317.
- 3. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J. Cell. Biochem. 1997;64(2):278-294.
- 4. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J. Cell. Biochem. 1997;64(2):295-312.
- 5. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998;279(5356):1528-1530.
- 6. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. J. Bone Miner. Res. 1999;14(5):700-709.
- 7. Johnstone B, Hering TM, Caplan Al, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp. Cell Res. 1998;238(1):265-272.
- 8. Young RG, Butler DL, Weber W, et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. J. Orthop. Res. 1998;16(4):406-413.
- 9. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells. 2007;25(6):1384-1392.
- 10. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells. 2008;26(3):591-599.
- 11. Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz. J. Med. Biol. Res. 2003;36(9):1179-1183.
- 12. Fan C-G, Zhang Q-jun, Zhou J-ru. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. Stem Cell Rev. 2011;7(1):195-207.
- 13. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. Stem Cells. 2008;26(11):2865-2874.
- 14. Arufe MC, De la Fuente A, Mateos J, et al. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. Stem Cells Dev. 2011;20(7):1199-1212.
- 15. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. PLoS ONE. 2010;5(2):e9016.
- 16. Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. Blood. 2008;111(1):430-438.
- 17. Zhu H, Cao B, Zhen Z, et al. Controlled growth and differentiation of MSCs on grooved films assembled from monodisperse biological nanofibers with genetically tunable surface chemistries. Biomaterials. 2011;32(21):4744-4752.

- 18. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. Osteoarthr. Cartil. 2010;18 Suppl 3:S113-116.
- 19. Buttiglieri S, Ruella M, Risso A, et al. The aging effect of chemotherapy on cultured human mesenchymal stem cells. Experimental Hematology. 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864489. Accessed October 8, 2011.
- 20. Giannini S, Buda R, Cavallo M, et al. Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. Injury. 2010;41(11):1196-1203.
- 21. Jäger M, Jelinek EM, Wess KM, et al. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. Curr Stem Cell Res Ther. 2009;4(1):34-43.
- 22. Buda R, Vannini F, Cavallo M, et al. Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells. J Bone Joint Surg Am. 2010;92 Suppl 2:2-11.
- 23. Caplan Al. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J. Pathol. 2009;217(2):318-324.
- 24. Zhao Z, Hao C, Zhao H, Liu J, Shao L. Injectable allogeneic bone mesenchymal stem cells: A potential minimally invasive therapy for atrophic nonunion. Medical Hypotheses. 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21885204. Accessed October 8, 2011.
- 25. Capelli C, Gotti E, Morigi M, et al. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. Cytotherapy. 2011;13(7):786-801.
- 26. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells. 2005;23(2):220-229.
- 27. Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL. Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. Stem Cells and Development. 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21410356. Accessed October 8, 2011.
- 28. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem Cells. 2006;24(3):781-792.
- 29. Sun L, Wang D, Liang J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2010;62(8):2467-2475.
- 30. Ichim TE, Solano F, Lara F, et al. Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report. Int Arch Med. 2010;3:30.
- 31. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003;21(1):50-60.
- 32. Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells. 2004;22(7):1330-1337.
- 33. Montanucci P, Basta G, Pescara T, et al. New Simple and Rapid Method for Purification of Mesenchymal Stem Cells from the Human Umbilical Cord Wharton Jelly. Tissue Engineering. Part A. 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21679124. Accessed October 8, 2011.
- 34. Lu Y, Dhanaraj S, Wang Z, et al. Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. J. Orthop. Res. 2006;24(6):1261-1270.
- 35. De Schauwer C, Meyer E, Cornillie P, et al. Optimization of the Isolation, Culture, and Characterization of Equine Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells. Tissue Engineering. Part C, Methods. 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21870941. Accessed October 8, 2011.
- 36. Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. Stem Cell Rev. 2011;7(1):17-31.
- 37. Lawrence V. Gulotta, David Kovacevic MD, Jonathan D. Packer, John R. Ehteshami, and Scott A. Rodeo. Adenoviral-Mediated Gene Transfer of Human Bone Morphogenetic Protein–13 Does Not Improve Rotator Cuff Healing in a Rat Model. Am J Sports Med 2011 39: 180.
- 38. Lawrence V. Gulotta, David Kovacevic, Jonathan D. Packer, Xiang Hua Deng and Scott A. Rodeo. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Transduced With Scleraxis Improve Rotator Cuff Healing in a Rat Model. Am J Sports Med 2011 39: 1282.
- 39. Peter Verdonk, Philippe Beaufils, Johan Bellemans, Patrick Djian, Eva-Lisa Heinrichs, Wouter Huysse, Heinz Laprell, Rainer Siebold, Rene' Verdonk, and the Actifit Study Group. Successful Treatment of Painful Irreparable Partial Meniscal Defects With a Polyurethane Scaffold. The American Journal of Sports Medicine, DOI: 10.1177/0363546511433032.
- 40. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvescicles protect against acute tubular injury. JASN 2009; 20: 1053-67.
- 41. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvescicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusioninduced acute and chronic kidney injury. NDT 2011; 26: 1474-83.

42. Adetola B Adesida, Aillette Mulet-Sierra, Nadr M Jomha, Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. Stem Cell Research & Therapy 2012, 3:9 doi:10.1186/scrt100.

43. Jana Mu"ller, Karin Benz, Michael Ahlers, Christoph Gaissmaier and Ju"rgen Mollenhauer. Hypoxic Conditions During Expansion Culture Prime Human Mesenchymal Stromal Precursor Cells for Chondrogenic

Differentiation in Three-Dimensional Cultures. Cell Transplantation, Vol. 20, 2011.

44. Brandon D. Markway, Guak-Kim Tan, Gary Brooke, James E. Hudson, Justin J. Cooper-White and Michael R. Doran. Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Low Oxygen Environment Micropellet Cultures. Cell Transplantation, Vol. 19, 2010.

> Responsabile Scientif Filippo Castolo

Borsista Dott.ssa Silvia Mattia

Silia Mattia

Dott. ANTONIO MARMOTTI DIRIGENTE MEDICO S.C. ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA Matr. 44585