

TITLE PAGE

Cellule staminali da tessuto adiposo: isolamento, caratterizzazione e differenziazione *in vitro*.

Francesca Toia

Chirurgia Plastica e Ricostruttiva. Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche. Università degli Studi di Palermo. Via del Vespro, 129 - 90127 Palermo, Italia.

SUMMARY (400 parole)

Le cellule staminali derivate da adiposo (ASCs) offrono numerosi vantaggi rispetto alle MSCs (Mesenchymal Stem Cells). Il tessuto adiposo, infatti, è molto abbondante nel corpo umano, molto ricco in cellule staminali e può essere prelevato mediante lipoaspirazione, una metodica sicura, poco invasiva e ben accettata dai pazienti.

Questo studio ha come oggetto lo studio delle proprietà rigenerative delle cellule staminali estratte da tessuto adiposo e coltivate in condizioni di non adesione (in sospensione). Gli obiettivi dello studio sono: 1) dimostrare che dal lipoaspirato è possibile estrarre cellule staminali e che queste possono essere coltivate in sospensione (sfere di cellule staminali); 2) dimostrare che le sfere di cellule staminali hanno un potenziale rigenerativo maggiore rispetto alle ASCs coltivate in adesione.

Le cellule sono state estratte da tessuto adiposo sottocutaneo di 50 donatori sani. Le cellule staminali ottenute da tessuto adiposo e coltivate in sospensione sono state confrontate con quelle di differenti gruppi di cellule coltivate in adesione: cellule derivate dal tessuto adiposo aspirato, cellule derivate da sfere e cellule staminali commerciali. Questi quattro gruppi di cellule sono stati confrontati attraverso l'analisi del ciclo cellulare, la caratterizzazione immunofenotipica e genotipica. Inoltre, è stato eseguito uno studio della differenziazione in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico delle cellule coltivate in sospensione.

La staminalità delle cellule contenute nelle sfere è stata confermata *in vitro* dalla mancanza di anoikis, dalla crescita in condizioni di non aderenza e dalla differenziazione verso le linee cellulari mesenchimali. I dati ottenuti dall'analisi del ciclo cellulare evidenziano che le sfere e le cellule staminali commerciali sono quelle che presentano una fase di quiescenza G0-G1 maggiore, mentre le cellule degli altri gruppi hanno mostrato più alti livelli della fase G2-M, tipica delle cellule differenziate.

Nell'analisi eseguita dopo digestione, i markers di staminalità mesenchimale (CD29, CD44, CD73, CD271, CD9, CD90) erano debolmente espressi, mentre erano presenti ad alti livelli nelle sfere e nelle cellule staminali commerciali.

La quantificazione del RNA messaggero, ottenuta mediante Real Time PCR, ha dimostrato che le sfere esprimono maggiormente i geni di staminalità mesenchimale rispetto alle ADSCs, e in particolare dei geni HGF, FGF2, VIM e ICAM1; esprimono invece in minor misura i markers di differenziazione delle principali linee mesenchimali, quali BMP6, BMP7 e SOX2.

I risultati di questo studio dimostrano che le ASCs coltivate in sospensione mantengono intatte le loro capacità proliferativa e differenziativa multipotente *in vitro*, e che queste sono superiori rispetto alle cellule coltivate in adesione.

BODY OF THE MANUSCRIPT

Introduzione

Negli ultimi anni, gran parte della ricerca nel campo della chirurgia rigenerativa si è focalizzata sullo studio delle cellule staminali, la cui spiccata capacità proliferativa e differenziativa può essere sfruttata per rigenerare differenti tessuti e organi.

Un promettente sito donatore di cellule staminali è rappresentato dal tessuto adiposo, valida alternativa al midollo osseo (1). Le ASCs (Adipose derived Stem Cells), infatti, offrono numerosi vantaggi rispetto alle MSCs (Mesenchymal Stem Cells) (2).

- Le ASCs vengono coltivate per tempi più lunghi e crescono più velocemente rispetto alle MSCs (3).

- Un grammo di tessuto adiposo contiene circa 5000 ASCs, quantitativo 500 volte maggiore rispetto a quelle contenute in 1 grammo di aspirato midollare (4). Tale ricchezza in cellule staminali, combinata

con l'abbondanza di tessuto adiposo nel corpo umano, rende questo tessuto una ricca fonte di cellule staminali.

- La procedura di prelievo di tessuto adiposo tramite lipoaspirazione è sicura, poco invasiva, ben accolta dal paziente e con un rischio di complicanze estremamente basso (circa 0,1%) (3).

La definizione, la caratterizzazione e la nomenclatura delle cellule staminali derivate da tessuto adiposo sono ancora oggetto di un acceso dibattito. Queste cellule non sono state caratterizzate con marcatori cellulari di riferimento, ed è verosimile che rappresentino una popolazione eterogenea di cellule in differenti stadi di sviluppo (5). Inoltre, sono stati proposti e utilizzati numerosi acronimi per descriverle. In accordo al consenso della International Fat Applied Technology Society del 2004 (6) vengono definite "adipose-derived stem cells" (ASCs) quelle cellule appartenenti a una popolazione estratta dal tessuto adiposo, multipotente ed aderente al supporto di plastica.

Questo studio ha come oggetto lo studio delle proprietà rigenerative delle cellule staminali estratte da tessuto adiposo e coltivate in condizioni di non adesione. Gli obiettivi dello studio sono: 1) dimostrare che dal lipoaspirato è possibile estrarre cellule staminali e che queste possono essere coltivate in sospensione (sfere di cellule staminali); 2) dimostrare che le sfere di cellule staminali hanno un potenziale rigenerativo maggiore rispetto alle ASCs coltivate in adesione.

Materiali e metodi

Le cellule staminali ottenute da tessuto adiposo e coltivate in sospensione sono state confrontate con quelle di differenti gruppi di cellule coltivate in adesione: è stata eseguita un'analisi del ciclo cellulare, una caratterizzazione immunofenotipica e genotipica. Inoltre, è stato eseguito uno studio della differenziazione in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico delle cellule coltivate in sospensione.

Prelievo del campione di tessuto adiposo ed estrazione cellulare

Le cellule sono state estratte da tessuto adiposo sottocutaneo di 50 donatori sani (11 uomini, 39 donne), previo consenso informato specifico per la donazione di materiale biologico. I dati relativi a ogni donatore sono stati analizzati con particolare attenzione all'età, sesso ed ad eventuali comorbidità che possono condizionare la crescita cellulare (per esempio diabete mellito, malattie del connettivo, malattie infettive). I donatori sono stati selezionati fra individui sani, di età compresa fra 20 e 79 anni (M = 43) ed anamnesi negativa per patologie oncologiche. Il prelievo è stato eseguito mediante lipoaspirazione dalla regione addominale attraverso cannule di Coleman, previa infiltrazione dell'area del prelievo con soluzione di Klein (NaCl (0,9%), 1 L; Lidocaina 2%, 25 ml; Adrenalina 1:1000, 1ml; NaHCO₃ 8,45%, 12,5 ml). Da ciascun paziente sono stati isolati circa 20-40 cc di lipoaspirato che è stato inviato in laboratorio per la digestione e messa a coltura. Il campione non processato, è stato mantenuto a 4°C per un massimo di 12 h.

Digestione tissutale e modalità di coltura delle cellule staminali

Sono stati allestiti 4 tipi differenti di colture cellulari:

- cellule staminali derivate dal tessuto adiposo aspirato e coltivate in sospensione (sfere)
- cellule staminali derivate dal tessuto adiposo aspirato e coltivate in adesione (ASCs)
- cellule derivate da sfere e coltivate in adesione (SDACs)
- cellule staminali commerciali coltivate in adesione (ADSCs, Invitrogen)

Tutte le procedure sul tessuto adiposo sono state svolte in cappa sterile per minimizzare il rischio di eventuale contaminazione batterica o micotica. Ogni campione è stato posto in un tubo conico (falcon) e sottoposto a una digestione enzimatica con collagenasi (100 I/10 ml; Life Technologies) e ialuronidasi (20 I/10 ml; Sigma-Aldrich) e meccanica mediante delicato movimento di rotazione per 60' a 37°C. Quindi sono state centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti. Il campione digerito si distribuisce in tre strati. Lo strato superiore è costituito da liquido oleoso che è stato eliminato. Lo strato intermedio contenente una quota cellulare è stato sottoposto a una ulteriore centrifugazione per ottenere un ulteriore quota di pellet cellulare. L'ultimo strato corrispondente al pellet cellulare sedimentato nel fondo è stato messo

direttamente messo in coltura.

Le cellule sono state piastrate in due differenti condizioni di crescita: sia in terreno DMEM con aggiunta di siero bovino fetale 10% (FBS) in condizione di aderenza che in un terreno di coltura specifico per cellule staminali in condizioni di non aderenza. Questa è garantita dall'utilizzo di particolari fiasche definite ultra-low adhesion (a bassa aderenza) che impediscono l'adesione delle cellule al fondo. Il terreno per cellule staminali è costituito da DMEM/F12 modificato e supplementato con il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e il fattore di crescita dell'epidermide (EGF). Tali condizioni determinano la morte per anoikis (morte cellulare programmata) delle cellule differenziate, non in adesione, mentre le cellule staminali, le uniche capaci di proliferare in questo ambiente ed in queste condizioni fisiche, crescono lentamente come aggregati detti sferoidi.

La coltura delle cellule staminali in sospensione porta alla formazione di sfere. Alcune di queste sono state disgregate e le cellule estratte sono state seminate su un terreno di coltura contenente DMEM e FBS10%, che determina la loro successiva adesione (SDACs). Un altro tipo di coltura è stato ottenuto utilizzando le ASCs disponibili in commercio (ADSCs).

Le cellule sono state poste in coltura a 37°C con 5% CO₂ in incubatore umidificato e il terreno di coltura è stato cambiato ogni 2-3 giorni.

Analisi del ciclo cellulare

Per l'analisi del ciclo cellulare, i nostri campioni sono stati tripsinizzati, lavati con PBS e fissati in etanolo 70 % a 4°C overnight. Successivamente le cellule sono state colorate con propidio ioduro (50mg/ml; Sigma) a 37°C per 30 minuti. La distribuzione in fase G₀/G₁, S e G₂/M è stata analizzata mediante citofluorimetro (BD Biosciences). L'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita su cinque popolazioni di cellule staminali:

- le cellule staminali cresciute in sospensione (sfere)
- le cellule staminali cresciute in adesione (ASCs)
- le cellule staminali commerciali (ADSCs)
- le cellule derivate da sfere e poste in coltura in adesione dopo 7 giorni (SDAC7)
- le cellule derivate da sfere e poste in coltura in adesione dopo 28 giorni (SDAC28)

Caratterizzazione immunofenotipica

Una classica prova per l'identificazione di una popolazione cellulare è la fenotipizzazione mediante la ricerca di marcatori cellulari definiti clusters di differenziazione (CD). Per identificare il profilo fenotipico delle cellule, abbiamo effettuato un'analisi citofluorimetrica sui principali marcatori cellulari espressi, CD29, CD44, CD73, CD271, CD9, CD90, CD45, CD19.

Caratterizzazione genotipica

Per l'estrazione e la purificazione dell'RNA totale ci siamo serviti dell' Rneasy Mini KIT (Qiagen). Per valutare la concentrazione e il grado di purezza dell' RNA estratto, rispetto ad eventuali proteine e DNA genomico contaminanti, abbiamo fatto ricorso alla lettura spettrofotometrica mediante Nanodrop ND-1000 a 260 nm e 280 nm. L'RNA estratto è stato retrotrascritto mediante il protocollo della ditta fornitrice (Qiagen). Successivamente abbiamo eseguito una real-time PCR di 96 geni (Human Mesenchymal Stem Cell PCR Array, Qiagen).

Differenziazione osteogenica

Le sfere sono state disgregate utilizzando la tripsina (1' a 37°C), contate in camera di Bürker, piastrate in piastre con pozzetti multipli (multi-well) e coltivate con terreno di differenziazione osteogenica (STEM PRO® Osteogenesis Differentiation Kit) per 28 giorni. La vitalità cellulare, l'adesione e la differenziazione sono state controllate quotidianamente utilizzando la microscopia ottica.

- Fosfatasi alcalina

L'espressione della fosfatasi alcalina è stata valutata tramite immunofissazione. Si sono utilizzate cellule poste in differenziazione ossea su supporti di vetro 17 (chamber slides) per 28 giorni. Le cellule sono state fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% per 30' a 37°C e lavate in PBS. Il campione è stato

incubato con tris buffer 0,1 M a pH 9.5 per 10' a temperatura ambiente. Dopo la rimozione del tris buffer, il colorante NBT/BCIP è stato applicato al campione. Dopo un'incubazione di 30' in camera oscura, il colorante è stato rimosso e si è proceduto con un'incubazione in metanolo 100% per 5' per rimuovere altre colorazioni. Il campione è stato colorato con ematossilina (1' in camera umida) per evidenziare i nuclei.

- *Osteopontina*

L'immunofissazione per osteopontina è stata realizzata su sfere coltivate in chamber slides mediante l'utilizzo di terreno di coltura di differenziazione ossea per 28 giorni. I campioni, fissati in paraformaldeide (PFA) 4% per 30' a 37°C, sono stati lavati in PBS e permeabilizzati utilizzando una soluzione di PBS contenente 0.1% Triton X. Il blocking è stato eseguito per saturare i siti di legame aspecifici dell'anticorpo, utilizzando una soluzione di PBS, BSA 1%, Triton X 0,1% per 10'. Il campione è stato incubato overnight a 4°C con l'anticorpo anti-osteopontina (Sigma-Aldrich, Inc.) alla diluizione 1:300. Il giorno successivo il campione è stato incubato in un primo momento con biotilato (Sigma-Aldrich, Inc.) per 30' e successivamente con streptavidina (Sigma-Aldrich, Inc.) per 30' a temperatura ambiente in camera umida. Il campione è stato incubato con AEC (Sigma-Aldrich, Inc.) per 5', colorato con ematossilina (diluita a 1:1 in H₂O) e montato sul vetrino copri-oggetto.

- *Staining di Von Kossa*

Il deposito di matrice mineralizzata nelle colture in monolayer è stato valutato qualitativamente con la colorazione di Von Kossa alla fine del periodo di coltura in differenziazione ossea (28 giorni). Dopo alcuni lavaggi in PBS, il campione è stato incubato con una soluzione al 3% di nitrato d'argento ed esposto ai raggi UV per 40'. Quando assorbono il nitrato d'argento i minerali di calcio assumono una colorazione dal marrone scuro al nero. Il campione è stato successivamente posto in sodio tiosolfato al 5% per 2' e in seguito contro-colorato con Nuclear Fast Red per 5', deidratato e montato sul vetrino.

Differenziazione condrogenica

Le sfere sono state disgregate utilizzando la tripsina (1' a 37°C), contate in camera di Bürker, piastrate in piastre da pozzetti multipli (multi-well) e supplementate di terreno di coltura condrogenico (STEM PRO® Chondrogenesis Differentiation Kit), per 28 giorni. La vitalità cellulare, l'adesione e la differenziazione sono state controllate quotidianamente utilizzando la microscopia ottica. Le cellule sono state poi sottoposte a colorazione con Alcian Blue.

- *Alcian Blue*

La differenziazione condrogenica è stata valutata al ventunesimo giorno. Il campione è stato fissato in paraformaldeide (PFA) 4% per 30' a 37°C, lavato in PBS e successivamente incubato con Alcian Blue (pH 2,5) per 30'. Il campione è stato contro-colorato con Nuclear Fast Red per 10', lavato e montato sul vetrino.

Differenziazione adipogenica

Le sfere sono state disgregate utilizzando la tripsina (1' a 37°C), contate in camera di Bürker, piastrate in piastre da pozzetti multipli (multi-well) e supplementate di terreno di coltura adipogenico (STEM PRO® Adipogenesis Differentiation Kit), per 28 giorni. La vitalità cellulare, l'adesione e la differenziazione sono state controllate e contate a tempi definiti, utilizzando la microscopia ottica.

- *AdipoRed*

Dopo 28 giorni, il campione di cellule differenziate, previo lavaggio con PBS, è stato incubato con Adipored (Lonza) per 20' a temperatura ambiente, trattato con RNASE per 30' a 37 °C ed in seguito incubato con TOTO3 per 10' a temperatura ambiente. La colorazione è stata valutata tramite microscopia confocale per ricercare la presenza di vescicole di lipidi che assumono una colorazione rossa fluorescente.

Risultati

La staminalità delle cellule contenute nelle sfere è stata confermata in vitro dalla presenza di comportamenti biologici specifici delle cellule staminali, quali la mancanza di anoikis, la crescita in

condizioni di non aderenza, la divisione asimmetrica e la differenziazione verso le linee cellulari mesenchimali.

ASCs coltivate in sospensione

Nel corso dello studio sono stati processati 50 campioni di lipoaspirato. Le ASCs sono state estratte da 50 sui 50 campioni. Non sono state evidenziate differenze di andamento colturale fra i diversi campioni, relative alle differenze di età e di sede di prelievo. Da ogni campione sono state estratte circa 75-100.000 cellule ogni 20 cc di lipoaspirato. Le cellule erano presenti sia singolarmente sia aggregate in clusters. In condizioni di non aderenza, le cellule crescono in sospensione, come avviene per le cellule staminali tumorali prelevate dai tessuti adulti. Inizialmente le cellule formano sferoidi, cioè aggregati multiclonali di cellule differenti che aderiscono fra loro per blandi legami elettrochimici. Nei successivi giorni di coltura le cellule formano sfere, cioè aggregati formati dall'espansione monoclonale di una singola cellula. La formazione di queste sfere, contenenti circa 100 unità, si realizza in 4-5 settimane. Le cellule che costituivano le sfere apparivano omogenee per morfologia e dimensione. Le cellule capaci di formare sfere potevano essere espanse mediante disgregazione meccanica delle stesse. Successivamente le singole cellule e gli aggregati residui, capaci di riformare nuove sfere, venivano ripiastrati. Quando queste cellule venivano poste in terreno contenente DMEM addizionato con 10% di FBS aderivano alla superficie in plastica già al secondo giorno di coltura. Le cellule aderenti costituivano colonie visibili già al terzo giorno di coltura. Dopo circa due settimane si ottenevano colonie di cellule omogenee, confluenti e aderenti, con aspetto affusolato o stellato. Queste continuavano a proliferare spontaneamente per numerosi passaggi.

Analisi del ciclo cellulare

I dati ottenuti dall'analisi del ciclo cellulare evidenziano che le sfere e le ADSCs sono quelle che presentano una fase di quiescenza G0-G1 maggiore. Invece gli 22 altri campioni presi in esame hanno mostrato più alti livelli della fase G2-M, tipico delle cellule differenziate.

Caratterizzazione immunofenotipica

Nell'analisi eseguita dopo digestione, i markers di staminalità mesenchimale (CD29, CD44, CD73, CD271, CD9, CD90) erano debolmente espressi, mentre erano presenti ad alti livelli nelle sfere e nelle ADSCs, in particolare CD44, CD271, CD9 e CD90.

Le SDACs a 28 giorni, invece, hanno mostrato bassi livelli dei markers di staminalità, mostrando un profilo più differenziato. L'espressione di CD19 e CD45 ha escluso la presenza di cellule della linea ematopoietica nei campioni di sfere, ADSCs e SDACs a 28 giorni. Una positività al CD19 è stata riscontrata solo nell'analisi eseguita subito dopo la digestione.

Caratterizzazione genotipica

La quantificazione del RNA messaggero, ottenuta mediante Real Time PCR, dimostra che le sfere esprimono maggiormente i geni di staminalità mesenchimale rispetto alle ADSCs, e in particolare dei geni HGF, FGF2, VIM e ICAM1; esprimono invece in minor misura i markers di differenziazione delle principali linee mesenchimali, quali BMP6, BMP7 e SOX2.

Differenziazioni mesenchimali

Per dimostrare la multipotenza delle cellule estratte da tessuto adiposo e coltivate in sospensione (sfere), le cellule isolate sono state poste in differenziazione adipogenica, osteogenica e condrogenica su chamberslides.

Le cellule e le sfere, precedentemente cresciute in condizioni di non aderenza per alcuni passaggi colturali, poste nei terreni di differenziamento si attaccavano al vetrino ed iniziavano a differenziarsi già dopo 24 h. Come controllo negativo si sono utilizzate le cellule degli stessi campioni, poste in terreno per cellule staminali in aderenza (DMEM/ FBS 10%). Queste cellule hanno aderito al supporto plastico ed hanno assunto un aspetto simile a quello di una popolazione di fibroblasti.

Differenziazione osteogenica

Le cellule di tutti i campioni posti in differenziazione (15 su 15) hanno modificato il loro fenotipo, acquisendo una morfologia simile a quella degli osteoblasti. Le cellule poste in differenziazione osteogenica hanno proliferato rapidamente, formando colonie addensate di cellule fusiformi e allungate e aree granulari sono comparse fra di esse. La differenziazione è stata confermata dall'espressione della fosfatasi alcalina. La reazione d'immunofluorescenza effettuata al ventunesimo giorno, ha evidenziato la presenza citoplasmatica e perinucleare dell'osteopontina, la proteina maggiormente prodotta dagli osteoblasti (7). La colorazione di Von Kossa delle cellule coltivate in differenziazione osteogenica per 21 giorni ha evidenziato la presenza di numerosi granuli marrone scuro e neri, dovuti alla presenza di accumuli extracellulari di sali di calcio e della matrice extracellulare mineralizzata secreta dagli osteoblasti.

Nessun segno di differenziazione osteoblastica era visibile nella popolazione di controllo.

Differenziazione condrogenica

La differenziazione condroblastica è stata confermata dalla morfologia che le cellule assumevano durante la coltura in terreno condrogenico e dalla positività alla colorazione con Alcian Blue, colorante selettivo per mucopolisaccaridi acidi e glicosaminoglicani solforati, tipicamente espressi nella matrice extracellulare (ECM) del tessuto cartilagineo maturo. I mucopolisaccaridi acidi e glicosaminoglicani solforati si colorano in blu, mentre i nuclei vengono colorati di rosso/rosa. Tutti i campioni coltivati (12 su 12) hanno acquisito un fenotipo simile a quello dei condrociti. Le cellule tendevano a formare sfere nelle colture e a secernere proteoglicani cartilagineo-specifici. I primi sferoidi erano visibili a occhio nudo già al terzo giorno dall'inizio dell'induzione della differenziazione condrogenica; i noduli hanno aumentato la loro dimensione durante le tre settimane di coltura in terreno condroblastico.

Differenziazione adipogenica

La differenziazione adiposa è stata dimostrata dall'accumulo di vacuoli contenenti lipidi all'interno del monolayer di cellule poste su chamberslides, valutato sia alla microscopia ottica sia con AdipoRed. Le cellule sono state poste in differenziazione adiposa per due settimane. Le cellule presentavano una morfologia globosa già dal secondo giorno, aumentando di diametro fino a 20 volte, e iniziavano ad accumulare vescicole contenenti lipidi dal quarto giorno di coltura. Lo spazio intracellulare era prevalentemente occupato da vescicole lipidiche, che hanno aumentato il loro volume durante la differenziazione, condizione tipica degli adipociti maturi. L'AdipoRed ha permesso una valutazione quantitativa delle vescicole lipidiche: gli adipociti apparivano al microscopio confocale come cellule rotondeggianti con accumuli lipidici di colore arancio-rosso. Le cellule di controllo, senza terreno di differenziazione adipogenico, non mostravano vacuoli di lipidi e quindi nessun segno di differenziazione adiposa.

Discussione

I risultati di questo studio dimostrano che le ASCs coltivate in sospensione mantengono intatte le loro capacità proliferativa e differenziativa multipotente *in vitro*, e che queste sono superiori rispetto alle cellule coltivate in adesione.

Studi condotti nel nostro Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche dell'Università degli Studi di Palermo, presso il laboratorio di Fisiopatologia Cellulare e Molecolare, hanno evidenziato che cellule staminali tumorali provenienti da diversi tessuti (tiroide, colon e mammella) condividono lo stesso comportamento biologico, cioè la crescita in presenza di fattori di crescita, assenza di siero e in sospensione, cioè non aderendo alla fiasca in cui vengono coltivate (8-10). Tale assenza di adesione potrebbe rappresentare un minore grado di differenziazione di tali cellule, che sarebbero pertanto a monte della cascata differenziativa cui vanno incontro le cellule staminali nel corso del loro ciclo vitale. Le cellule da noi isolate dal tessuto adiposo, infatti, crescono utilizzando specifiche condizioni colturali, come sfere, cioè agglomerati di cellule staminali e potrebbero rappresentare una popolazione di cellule meno differenziate. Per verificare la fondatezza della nostra teoria e che, quindi,

le cellule da noi estratte siano delle vere cellule staminali, abbiamo condotto alcune prove finalizzate a testimoniare la loro staminalità.

L'utilizzo di terreno di coltura per cellule staminali, che per la sua composizione chimica è altamente specifico, preclude la possibilità di crescita a cellule differenziate. Tale terreno, infatti, determina una selezione positiva delle cellule staminali, determinando la morte per apoptosi di ogni altro tipo differenziato di cellule. Molto importante è la crescita in assenza di siero fetale bovino (FBS): il siero, infatti, contiene fattori non ancora ben identificati, capaci di attivare o inibire la proliferazione e la differenziazione cellulare (11). La crescita in condizioni di non adesione, determinata dall'utilizzo di fiasche ultralow attachment è un indice di staminalità, in quanto solo queste cellule sono capaci di proliferare in tale microambiente. Al contrario, l'adesione al supporto solido tramite molecole di adesione ancora non espresse dalle cellule staminali, è fondamentale per la crescita delle cellule differenziate.

Le cellule differenziate che non aderiscono alla fiasca, infatti, vanno incontro a morte per un particolare tipo di apoptosi definita anoikis (12). L'anoikis (dal greco ν - “senza”, $\omicron\iota\kappa$ “casa”) è un tipo di morte programmata che previene la crescita e l'adesione di cellule mature in una matrice extracellulare (MEC) diversa dalla propria (meccanismo che invece si perde nelle cellule tumorali metastatiche). Questa si realizza quando le cellule non aderiscono più alla propria MEC a causa d'interruzioni di legame fra le integrine e i loro ligandi. Normalmente queste interazioni permettono loro di poter proliferare e differenziarsi, ma la perdita di questi legami, sottraendo tali stimoli, conduce le cellule differenziate a morte. Le cellule staminali non differenziate crescono in sospensione indipendentemente dalle interazione fra le integrine e i loro ligandi ed in queste non si realizza l'anoikis (13). In contrasto con il tradizionale metodo di coltura in adesione delle cellule staminali, nella quale le cellule crescono solo in due dimensioni, la coltura in sospensione permette la crescita nelle tre dimensioni, così come si realizza nei tessuti in vivo (11).

Ulteriori prove eseguite per valutare la staminalità delle cellule coltivate in sospensione sono state il test del ciclo cellulare e la caratterizzazione genotipica. I dati ottenuti dall'analisi del ciclo cellulare evidenziano che le sfere e le ADSCs presentano una fase di quiescenza G0-G1 maggiore. Tale risultato è indice di staminalità. La quantificazione del RNA messaggero, ottenuta mediante Real Time PCR, dimostra, però, che i geni di staminalità sono più espressi nelle sfere rispetto alle ADSCs.

Le cellule originate dalle sfere, dopo disaggregazione meccanica, hanno mantenuto la loro capacità di differenziarsi nei principali citotipi mesenchimali quando coltivate con specifici terreni di differenziamento. Le sfere coltivate con terreno di differenziamento osteogenico, hanno acquisito i segni differenziativi tipici degli osteoblasti, quali l'espressione della Fosfatasi Alcalina, la produzione di matrice extracellulare mineralizzata e l'espressione di una proteina osteospecifica, l'osteopontina. Le sfere hanno la capacità di differenziarsi lungo la linea osteogenica e quindi possono rappresentare una fonte cellulare promettente per l'ingegneria del tessuto osseo. Le sfere che hanno intrapreso la differenziazione condrogenica *in vitro* hanno formato noduli compatti caratteristici del tessuto cartilagineo. Inoltre, la mancata espressione dell'osteopontina e la negatività alla colorazione Von Kossa hanno confermato l'assenza di differenziazione osteogenica all'interno di questa popolazione. Le sfere possono, inoltre, differenziarsi in adipociti maturi e possono essere considerate come un'ottima risorsa cellulare per la medicina rigenerativa del tessuto adiposo bianco.

Alla luce dei risultati ottenuti, possiamo affermare che le sfere rappresentano le vere “cellule staminali” derivanti da tessuto adiposo, dotate di maggiore plasticità in termini di differenziamento fenotipico e genotipico, rispetto alle cellule descritte finora in letteratura.

Bibliografia

1. Izadpanah, RC, Trygg, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived 39 from bone marrow and adipose tissue. J Cell Biochem 99(5); 2006:1285-1297.
2. Kern S, Elchler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem cells 2006; 24(5):1294-301.
3. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and

applications in surgery. *ANZ J Surg.* 2009;79(4):235-44.

4. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH: Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150-154.

5. Leto Barone AA, Giunta G, Toia F, Cordova A, Moschella F. Adipose-derived stem cells: true or false? A different point of view. *J Craniofac Surg.* 2013;24(4):1072.

6. Zuk PA. Consensus statement. In: International Fat Applied Technology Society 2nd International Meeting. Pittsburg, PA, 2004.

7. Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y, Couser WG, Johnson RJ, Alpers CE. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10(3):444-57.

8. Cammareri P, Lombardo Y, Francipane MG, Bonventre S, Todaro M, Stassi G. Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol.* 2008; 86:311-24.

9. Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, Gulotta G, Dieli F, Giordano S, De Maria R, Stassi G. Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res* 2010; 70(21): 8874-85.

10. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(4): 389-402.

11. Dromard C, Bourin P, André M, De Barros S, Casteilla L, Planat-Benard V. Human Adipose derived stroma/cells grow in serum-free medium as floating spheres. *Exp Cell Res* 2011; 317(6): 770-80.

12. Gilmore AP. Anoikis Cell Death Differ 2005; 12 Suppl 2: 1473-7.

13. Horbinski C, Mojesky C, Kyprianou N. Live free or die: tales of homeless (cells) in cancer. *Am J Pathol* 2010; 177(3): 1044-52.