



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE**

*Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Fausto Piana*

**CURRICULUM IN MEDICINA DI GENERE DELL'UOMO, DELLA DONNA E DEL BAMBINO**

*Responsabile di Curriculum: Prof. Giampiero Capobianco*

**XXIX CICLO**

**MORFOLOGIA STRUTTURALE ED ULTRASTRUTTURALE DELLE CELLULE DEL LIQUIDO**

**AMNIOTICO. DIFFERENZE DI GENERE**

***Coordinatore:***

Prof. Andrea Fausto Piana

***Tutor:***

Prof.ssa Grazia Fenu

***Tesi di dottorato di:***

Dott. Giampiero Muggianu

**Anno Accademico 2015 – 2016**

## Indice

1. Introduzione .....	
2. Scopo .....	
3. Le cellule staminali e la differenziazione delle cellule del liquido amniotico	
4. Il liquido amniotico "AF" .....	
5. Cellule e ultrastrutture: meccanismi .....	
6. Materiali e metodi .....	
7. Isolamento degli amniociti dal liquido amniotico .....	
8. Processamento delle colture cellulari .....	
9. Colorazione in bande QFQ .....	
10. Inclusione in resine Durcupam .....	
11. Citofluorimetria .....	
12. Analisi morfologica.....	
13. Proliferaazione cellulare .....	
14. Fotografie al microscopio elettronico .....	
15. Programma di analisi di immagine ImageJ .....	
16. Analisi statistica dei risultati .....	
17. Risultati .....	
18. Conclusioni .....	
19. BIBLIOGRAFIA .....	

## 1) INTRODUZIONE

La maggior parte delle ricerche delle strategie mediche sono state condotte su uomini e su animali maschi e i risultati traslati alle donne e agli animali femmine riconoscendo una differenza di genere solo in relazione alla riproduzione.

Infatti, l'obiettivo della medicina di genere è analizzare le differenze derivanti dal genere sotto differenti aspetti: biologico, funzionale, anatomico, fisiologico, psicologico sociale, culturale e nella risposta ai fattori di rischio, la prevalenza, l'insorgenza delle malattie e l'approccio terapeutico.

Per la prima volta la "Questione femminile" fu discussa in medicina nel 1991, quando Bernardine Healy, sull'importante rivista *New England Journal of Medicine* parlò di "Yentl Syndrome" a causa dell'atteggiamento discriminante dei cardiologi nei confronti della donna. "Yentel" era una giovane donna che nel racconto del premio Nobel Isaac Singer si era vestita da ragazzo per studiare il Talmud.

Bisognò attendere per più di dieci anni perché fosse avviata una sperimentazione riservata alle donne, esattamente fino al 2002 quando, presso la Columbia University di New York è stato istituito il primo corso di medicina di genere "*A new approach to health care based on insights into biological differences between women and men*" per lo studio di tutte quelle patologie che riguardano entrambi i sessi (Singer, B.I. 1983; Banchieri E. 2008).

La stessa Organizzazione mondiale della sanità ha inserito dal 2000 la medicina di genere nell'Equity Act, a testimonianza che il principio di equità implica non solo la parità di accesso alla cura di donne e uomini ma anche l'adeguatezza e l'appropriatezza di cura secondo il proprio genere.

Nella storia della medicina situazioni analoghe a quelle di Bernardine Healy o Yentel si sono presentate sin dall'antica Atene dove la medicina non era considerata un "lavoro" da donne. In questi ultimi anni, nella medicina moderna, sono state individuate molte differenze di genere e ormai è sempre più evidente che i polmoni, il cuore, i vasi sanguigni, il fegato, i reni, l'encefalo, hanno bisogno di essere declinati sia al femminile sia al maschile.

Grazie a questa nuova disciplina, sulla base degli studi scientifici condotti, si vuole arrivare a garantire, sia all'uomo che alla donna, il miglior trattamento terapeutico possibile per determinate patologie.

Si è maschi o femmine non solo in base al sesso, ma anche in relazione ad altri aspetti della fisiologia dell'organismo e ai ruoli che ricopriamo nella società.

Con il termine “sesso” si intendono le differenze basate sulla biologia, mentre il genere è inteso come l’insieme delle differenze basate sulla cultura (Franconi F., Catastini E., 2010).

Siamo tutti consapevoli che, nel momento in cui ha inizio lo sviluppo, lo zigote contiene alcuni caratteri “preformati”, ma che questi devono interagire tra loro, nei processi di “epigenesi”, prima che la condizione adulta venga raggiunta.

Lo studio dei caratteri “preformati” appartiene al presente ed è la disciplina nota come Genetica. Il nome “Epigenetico” è suggerito per lo studio di quei processi che costituiscono l’epigenesi, che si occupa anche di sviluppo (Waddington C. H., 1956).

Le differenze di genere, dal punto di vista scientifico, sono il trionfo dell’epigenetica definita da Denise Barlow “tutte quelle cose occulte e meravigliose che la genetica non è in grado di spiegare”. Colma il divario fra natura e cultura e sul piano biologico è caratterizzata da modificazioni del DNA che influenzano il genoma senza alterare la sequenza dello stesso DNA, e che può essere trasferito alle generazioni cellulari successive.

La cromatina è regolata dai fattori esterni e le modifiche che comportano possono essere trasmissibili. La differenza tra gli esseri umani non è data solo dalla sequenza di basi nucleotidiche del DNA, cioè le istruzioni contenute nei geni, ma anche dall’azione di meccanismi complessi indotti dall’ambiente (Andrew P. Feinberg, 2007).

Nell’epigenetica ricadono tutte quelle attività di regolazione dei geni attraverso processi chimici (dieta e farmaci) che non comportano cambiamenti della sequenza del DNA, ma che possono tuttavia modificare il fenotipo dell’individuo e/o della progenie.

È evidente che in una situazione in cui la maggior parte dei cromosomi fra uomo e donna (ad eccezione di uno, il cromosoma Y) sono identici, quello che varia è la loro espressione e ciò potrebbe spiegare il motivo per cui uomini e donne hanno un diverso rischio di contrarre certe malattie anche in conseguenza di eventi sociali ed avere anche una diversa risposta a certe terapie (David Allis C., et al., 2008).

Quando si parla di genetica si parla di geni e dello studio del DNA. Per DNA intendiamo la doppia elica che sta all’interno del nucleo contenente i geni e per geni le porzioni del DNA che contengono le informazioni che servono a sintetizzare le proteine.

Le proteine servono per la formazione di tutti gli organi del nostro corpo, tutte le cellule che compongono i vari organi del nostro corpo e i geni devono essere espressi nel momento in cui la proteina viene sintetizzata e se non sono espressi rimangono “silenti”.

Tutto questo processo avviene con una sorta di catena che parte dal DNA e arriva

con un intermediario che si chiama RNA che mediante un processo di traduzione il segnale viene tradotto in proteine, che vanno a formare le varie parti della cellula.

In passato si riteneva che il DNA fosse l'unico protagonista di tutto questo processo, che una mutazione sul DNA porta a delle conseguenze su di esso è parzialmente vero.

La genetica dice che l'informazione di ciò che siamo, le proteine che abbiamo (di avere gli occhi di un certo colore, al fatto di essere predisposti a sviluppare una certa malattia, etc.) è scritto nel nostro DNA e nei nostri geni.

Questo ha portato alla logica della predeterminazione genica, cioè chi ha dei geni di serie b svilupperà sicuramente quella certa malattia.

Questo è vero ma per una percentuale bassa di patologie (esempio: il cancro per il 5% ha una ragione solo genetica, per il restante 95% le cause non sono genetiche).

Finalmente la scienza ha fatto dei balzi avanti e si è resa conto che l'ambiente (per ambiente si intende non solo quello esterno al nostro corpo ma anche quello interno, all'esterno delle nostre cellule), influenza le nostre abitudini; fa freddo e ci vestiamo in un certo modo che è una forma di condizionamento ambientale esterno evidente, ma anche interno che è diretta conseguenza di ciò che mangiamo, respiriamo e influenza le nostre abitudini cellulari biologiche andando a influenzare anche il nostro DNA. L'ambiente sia interno che esterno può influenzare l'espressione dei nostri geni. L'espressione dei geni è regolata dall'ambiente in maniera non grossolana ma molto fine, dettagliata, ci sono molecole che in base agli stimoli circostanti possono essere attivate o disattivate e quindi andare ad attivare l'espressione di certi geni piuttosto che disattivarla.

Quando si parla di geni bisogna dire che non sono tutti attivi contemporaneamente, cioè se noi abbiamo 25.000 geni non sono tutti espressi, infatti alcuni geni sono attivi in un certo momento della nostra vita perché servono quelle proteine. Per esempio, in fase embrionale non tutti i geni sono espressi, infatti verranno espressi o da bambini, altri da adolescenti e da adulti. I geni vengono attivati e disattivati a seconda della necessità, a seconda della fase della nostra vita e a seconda di quali cellule che ha bisogno il nostro corpo, una cellula cardiaca, una cellula polmonare, un neurone non avranno tutti i medesimi geni attivi, ci sono dei geni che codificano proteine tipiche di un neurone che non servono al polmone e viceversa.

Così come ci sono geni attivi per una femmina e geni attivi per un maschio.

Ovviamente quando c'è una disfunzione di questo meccanismo di attivazione e disattivazione della funzione dei geni può scatenarsi una patologia, per questo si dice che molte patologie sono di origine epigenetica e non genetica.

È stato scoperto il Junk DNA, “DNA spazzatura”, che è il 90% del DNA ed è non codificante. In questo avviene il controllo di attivazione e disattivazione dei geni.

Il DNA “spazzatura” è controllato da fattori come l’età, lo stress, il cibo, l’inquinamento, etc. tutto questo determina una forma di controllo su quel 90% di DNA che va ad attivare determinati geni fino ad arrivare alla sintesi di proteine in maniera più o meno modesta a seconda della variazione dei fattori extracellulari.

## **2) SCOPO**

Con questo studio ci si propone di evidenziare, se esistono, differenze di genere nella morfologia strutturale e ultrastrutturale delle cellule del liquido amniotico, allo scopo di progettare un campo di ricerca basato sull’analisi morfologica ancor prima della crescita, in cui siano presenti condizioni che possano favorire indicazioni sulle tappe di evoluzione dell’embrione e di conseguenza valutarne le eventuali differenze di genere.

## **3) LA DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO**

Le cellule utilizzate per vedere le differenze di genere nella morfologia strutturale e ultrastrutturale sono le cellule del liquido amniotico.

Le cellule del liquido amniotico (AFCs) amniotic fluid cells rappresentano una popolazione eterogenea derivata dai tre foglietti embrionali. Queste cellule condividono un’origine epiteliale e sono derivati dallo sviluppo dell’embrione e dalla zona interna della membrana amniotica (Pappa K. I. and Anagnou N. P., 2009)

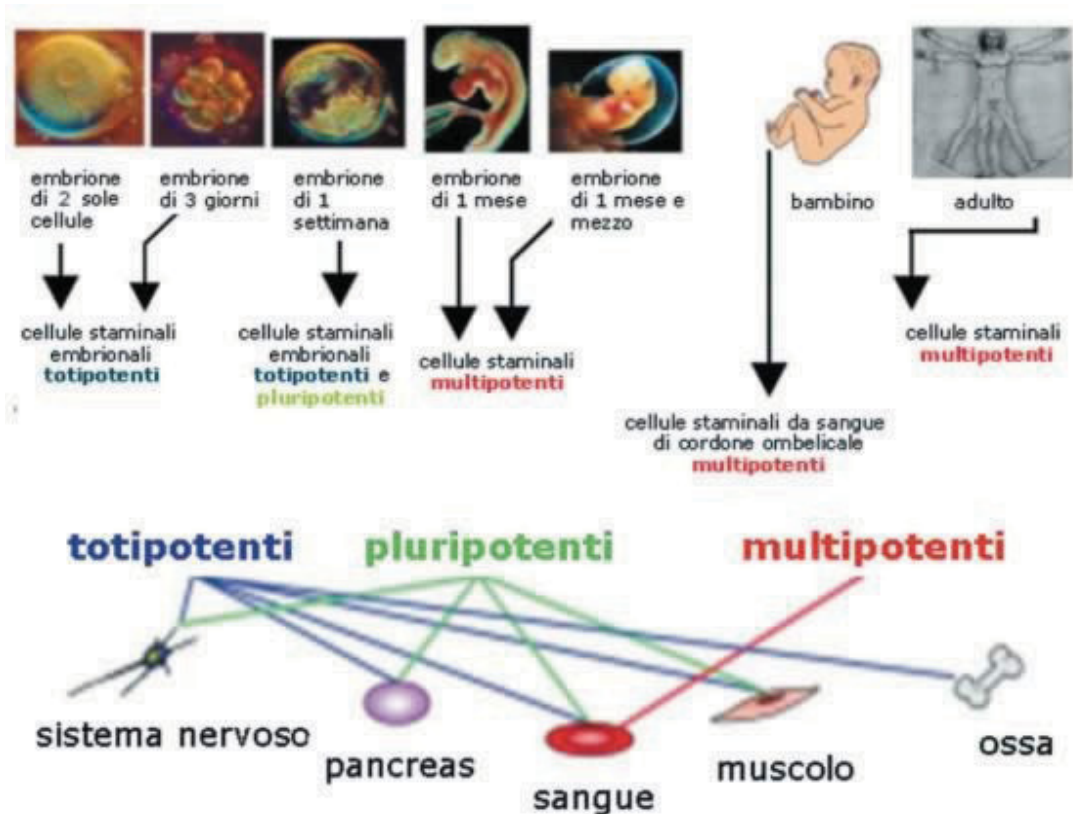


Fig. 1 Differenziazione delle cellule staminali embrionali

Nonostante siano consolidate le metodiche di coltura delle cellule del liquido amniotico (AFCs) nella diagnosi genetica prenatale esistono numerose domande circa la natura e l'origine di queste cellule che ancora non hanno trovato risposta (Hoehn H, et al., 1974; Gospodarowicz D, et al., 1977).

Le AFCs sono composte da tre gruppi di cellule aderenti, suddivise in categorie in base alla loro morfologia, crescita e caratteristiche biochimiche (Pappa K. I. and Anagnou N. P., 2009).

Il maggiore contributo della popolazione di cellule è dato dalla pelle fetale, dal tratto digestivo fetale, e dal tratto urinario, respiratorio e dalle membrane placentari (Priest RE, Marimuthu KM, Priest JH, 1978; Prusa AR, Hengstschläger M, 2002).

Sono presenti cellule epitelioidi (di tipo E) di forma cuboidale e colonnare derivate dalla pelle fetale e dalle urine, amniociti (di tipo AF) e le cellule derivate dalle membrane fetali e dal connettivo fibroso, i fibroblasti (di tipo F).

Sia le AF che le F hanno la stessa morfologia fibroblastoide.

Diversi studi hanno documentato che le cellule staminali del liquido amniotico umano (AFCs) possono essere ottenute da una piccola quantità di liquido amniotico

umano dopo il secondo trimestre tramite amniocentesi.

Fino ad oggi, sono stati testati un certo numero di protocolli differenti per la coltura di AF (Klemmt P. A., et al., 2011).

Klemmt et al hanno potuto stilare una lista dei protocolli da utilizzare per la coltura delle AFCs:

“In una sola fase.”

Il liquido amniotico è stato messo in coltura per 7 giorni o più fino alla comparsa delle colonie cellulari.

“ In due fasi.”

Gli amniociti che dopo 5 giorni si sono attaccati efficacemente alla piastra vengono raccolti e riseminati e portati a confluenza.

Marcare le cellule con un marcatore per CD117 (c-kit recettore).

L'isolamento meccanico delle colonie di cellule progenitrici mesenchimali.

Separare le colture a breve termine per isolare le colonie di cellule fibroblastoidi.

La maggior parte delle AFCs ha condiviso un fenotipo di cellule mesenchimali multi potenti ed espone un elevato potenziale proliferativo e di differenziazione dalle MSC adulte (M. G. Roubelakis, et al., 2007; M.G.Roubelakis, et al., 2011).

#### 4) IL LIQUIDO AMNIOTICO “AF”

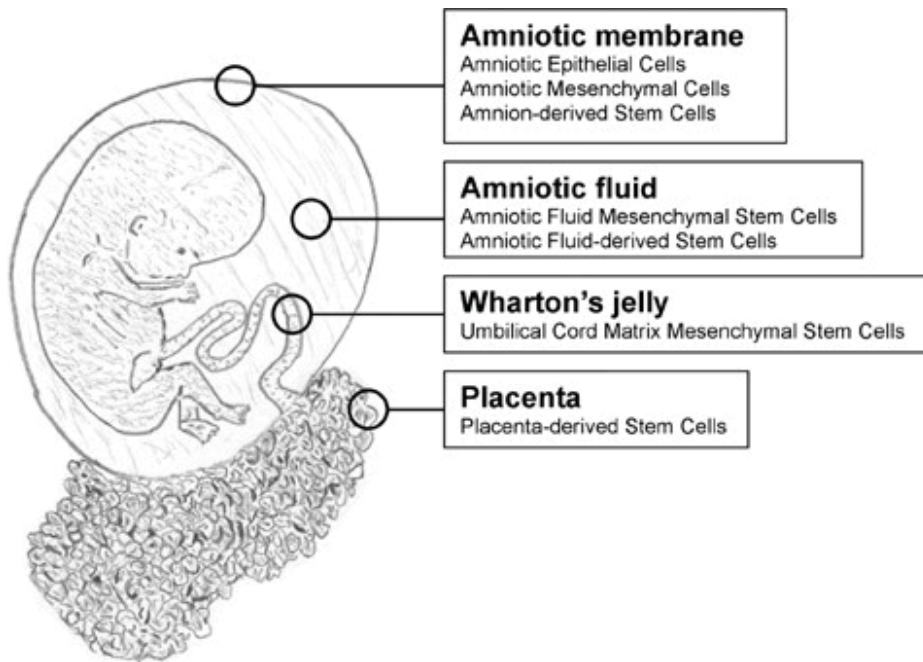


Figura 2 Extra-embryonic stem cell sources. Stem cells have been isolated from all extra-embryonic tissues, including the amniotic membrane, amniotic fluid, Wharton's jelly and placenta ( Akiva J. Marcus,Dale Woodbury 2008).

Il liquido amniotico AF (amniotic fluid) è un liquido protettivo per l'embrione durante il suo sviluppo. Fornisce supporto e sostanze nutritive necessarie per l'embriogenesi. L'amniocentesi viene utilizzata da molti decenni come una procedura di routine per la determinazione del cariotipo fetale e la diagnosi prenatale, permettendo la rivelazione di una varietà di patologie genetiche.

Il protocollo di coltura per isolare le cellule amniotiche non interferisce con il processo di studio del cariotipo fetale. La componente principale del liquido amniotico è l'acqua e la sua composizione varia durante la gravidanza (D. Fauza, 2004). All'inizio della gravidanza, l'osmolarità del liquido amniotico è simile al plasma fetale. Dopo la cheratinizzazione della pelle fetale l'osmolarità del liquido amniotico diminuisce (principalmente a causa della raccolta di urina fetale).

Il liquido amniotico rappresenta una ricca fonte di popolazione di cellule staminali provenienti dal feto e dalla membrana che circonda il liquido stesso (Pappa K. I. and Anagnou N. P., 2009).

#### 5) CELLULE E ULTRASTRUTTURE: MECCANISMI

I primi biologi credevano che le cellule fossero costituite da gel chiamato

protoplasma. Con l'introduzione del microscopio è stato possibile migliorare la conoscenza del mondo cellulare interno (Heuser J. and MW Kirschner ,1980).

Sempre con l'avvento della microscopia elettronica, negli anni '40 e '50, George Palade, Keith Porter, e i loro colleghi sono andati alla scoperta di nuove strutture e organelli all'interno della cellula con il nuovo microscopio. Tuttora numerosi scienziati studiano le differenze che intercorrono nelle strutture cellulari sia per prevenire che per curare le patologie che queste differenze possono portare. Wing e O'Connor hanno studiato le differenze della cromatina dei due cromosomi X e Y.

Hanno scoperto che i due cromosomi X nelle femmine di mammifero funzionano in modo molto diverso. Il cromosoma X contiene oltre 1.000 geni, mentre il cromosoma Y è relativamente povero di geni. Ciò rappresenta una sfida per gli uomini, che hanno bisogno di eguagliare l'espressione del cromosoma X nei maschi (XY) all'espressione che si ha nelle cellule femminili (XX).

La soluzione del genere umano è quindi quello di inattivare un cromosoma X nelle femmine durante le prime fasi di sviluppo con l'assemblaggio di una forma distinta di cromatina che silenzia l'espressione dei geni.

Dal momento che le prime immagini dell'inattivo cromosoma X sono stati pubblicati nel 1949, gli scienziati hanno studiato il processo di inattivazione in dettaglio, e hanno scoperto che il cromosoma X possiede una regione unica, chiamata il "X-inactivation center", che è essenziale per l'inattivazione. Le cellule svolgono i processi essenziali della vita. Contengono molecole e sistemi organizzati come il DNA e l'RNA che portano le informazioni ereditarie (Wing, J. & O'Connor, C., 2008).

Non è difficile individuare i cromosomi X inattivi in un interfase cellulare . A differenza di altri cromosomi, gli X inattivi non condensano pienamente durante l'interfase.

Così, l'X inattiva appare come una struttura densamente macchiata all'interno del nucleo delle cellule femminili. Murray Barr e Bertram Ewart hanno fornito alcune delle prime immagini della X inattivo in uno studio 1949, in cui si segnala che: "Il sesso di una cellula somatica altamente differenziata come un neurone può essere rilevato senza attrezzature più elaborate di un microscopio composto tramite la colorazione dei tessuti con il metodo di Nissel routine..." .

È stata studiata la differenza di struttura nucleare tra i neuroni del gatto maschio adulto e femmina e si è visto che si basa sul grado di sviluppo di un secondo corpo, che è molto più piccolo del nucleolo " (Barr, M. L., & Bertram, E. G. ,1949).

Barr e Bertram hanno chiamato questo secondo corpo, che noi ora chiamiamo un corpo di Barr , satellite nucleolare, perché è spesso situato accanto al nucleolo. I loro dati hanno mostrato che il corpo di Barr è ben sviluppato nelle femmine , ma poco sviluppato nei maschi.

Così, il duo ha ipotizzato che “il satellite nucleolare può derivare dall'eterocromatina dei cromosomi sessuali”.

I ricercatori ora apprezzano quanto sono state importanti queste osservazioni, Barr e Bertram erano in grado di riconoscere che il satellite è su un singolo cromosoma X.

Dieci anni più tardi, Susumu Ohno e colleghi (Ohno et al. , 1959) hanno fornito la prova definitiva che il corpo di Barr era su un cromosoma X .

Studiando e confrontando sistematicamente le cellule del fegato femminile e maschile durante il ciclo cellulare, hanno osservato che le cellule femminili contenevano cromatina altamente condensata che era assente nel cromosoma di cellule maschili.

Inoltre, hanno osservato che le cellule triploidi avevano ulteriori copie di questa struttura condensata. Dai dati, Ohno et al. hanno dedotto che il corpo di Barr , era probabilmente un cromosoma X condensato .

La prova definitiva della sua identità sarebbe avvenuta più tardi, dopo che gli scienziati hanno sviluppato sonde molecolari capaci di identificare cromosomi specifici (Ohno, S., et al. ,1959).

Nei primi anni 1960, la ricercatrice Mary Lyon sulle osservazioni citologiche di Ohno, ha formulato un ipotesi sull'inattivazione di X (Lione 1961, 1962).

Lyon è stata una genetista incuriosita dal fatto che le femmine di topo , ma non i maschi, avessero un mantello di colore screziato quando erano eterozigoti per i geni coinvolti nel colore del mantello.

A quel tempo, molti geni X-linked sono stati implicati nel colore del mantello, e i ricercatori sono stati in grado di eseguire gli esperimenti di allevamento che erano necessari per comprendere l'eredità del colore del mantello. Mettendo insieme i dati genetici e citologici, Lione ha interpretato "sex chromatin" come una manifestazione genetica del cromosoma X inattivo.

Si può allora spiegare l'aspetto screziato dei topi femmina, come segue: *"Questo mosaico fenotipico è dovuto all'inattivazione di uno o l'altro cromosoma X all'inizio dello sviluppo embrionale. Se questo è vero, cellule pigmentate discendono da cellule in cui il cromosoma porta il gene mutato che è stato inattivato danno luogo un colore normale e quelli in cui il cromosoma trasporta il gene normale che è stato inattivato daranno luogo ad*

*una colorazione diversa dalla normale* " (Lyon, 1961).

Un elemento essenziale dell'ipotesi di Lyon era la natura casuale del processo di inattivazione, che potrebbe quindi influenzare sia la trasmissione materna o la paterna ereditata con il cromosoma X .

Nel suo secondo articolo su questo argomento (1962), Lyon estese la sua analisi ad altre specie, tra cui i gatti e gli esseri umani, concludendo che l'inattivazione di X si applica in generale ai mammiferi (Lyon, M. F. ,1961).

Le attività delle cellule vengono svolte grazie a molecole organiche con la funzione di fonte di energia. Questa energia serve per generare movimento e per modificare le proprie reazioni interne in risposta all'ambiente circostante.

Le cellule possono duplicarsi e trasmettere le proprie informazioni ereditarie, hanno una dimensione così ridotta da non essere visibile ad occhio nudo (possono variare in diametro da 5 a 30µm, es. i globuli rossi sono lunghi 7-8 µm).

Per osservare le cellule e le strutture cellulari si utilizza la microscopia. I microscopi ottici sfruttano la luce per illuminare il campione e i microscopi elettronici sfruttano un fascio di elettroni.

Le cellule hanno una regione centrale che contiene molecole di DNA il cui scopo è conservare l'informazione ereditaria.

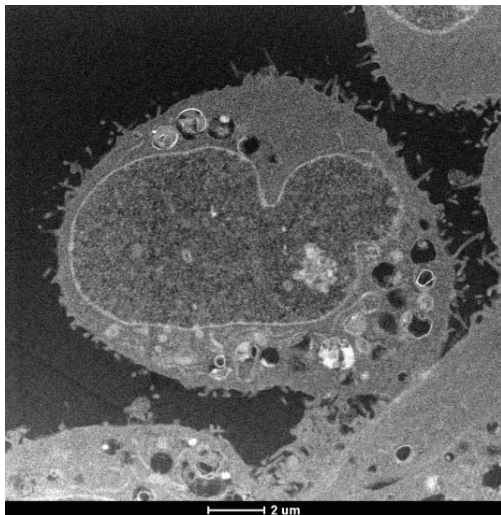
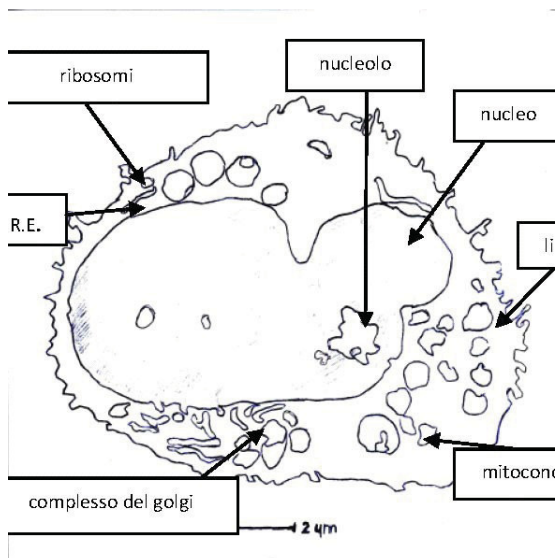




Fig.3 Struttura di cellula del liquido amniotico.



Il nucleo è una struttura formata da due membrane separate solo tra di loro da un ristretto spazio ed è separato grazie all'involucro nucleare.

I pori nucleari controllano il movimento tra citoplasma e nucleo di grandi molecole: RNA e proteine.

Il nucleoplasma è il liquido o semiliquido presente all'interno del nucleo. All'interno è presente anche la cromatina: DNA con proteine.

Sempre all'interno è presente uno o più nucleoli che sono piccole strutture che al microscopio elettronico si presentano come masserelle irregolari composte da fibre e da granuli.

Queste strutture si organizzano attorno ai geni che codificano per le molecole di RNA ribosomiale, che una volta assemblate con proteine specifiche, escono dal nucleolo e dal nucleo e vanno a formare i ribosomi.

Le vescicole, piccoli compartimenti delimitati da membrane hanno l'importante funzione di trasferimento del materiale biologico.

Il reticolo endoplasmatico (R.E) è una rete di tubuli membrana chiusi e sacche (cisterne), che si estende dalla membrana nucleare in tutto il citoplasma. L'intero reticolo endoplasmatico è racchiuso da una membrana continua ed è il più grande organello della maggior parte delle cellule eucariotiche. La sua membrana può rappresentare circa la metà di tutte le membrane cellulari, e lo spazio racchiuso dal R.E. (lume o cisterna) può rappresentare circa il 10% del volume cellulare totale.

Vi sono due tipi distinti di R.E. che svolgono funzioni diverse all'interno della cellula. Il R.E. ruvido è coperto da canali e ribosomi sulla sua superficie esterna, e la sua funzione è la trasformazione delle proteine. La maggior parte delle proteine sintetizzate nel R.E. Rugoso sono destinate al complesso di Golgi.

Il R.E. liscio non è associato ai ribosomi ed è coinvolto nel metabolismo lipidi, piuttosto che delle proteine. Quindi il reticolo endoplasmatico è una rete interconnessa di canali e vescicole (cisterne) che racchiudono uno spazio chiamato lume del R.E. Ruvido.

Nel complesso di Golgi si verificano modificazioni chimiche a carico delle proteine.

Il Golgi regola il movimento di numerosi tipi di proteine: quelle secrete dalla cellula, quelle integrali di membrana e quelle destinate ai ribosomi (tramite vescicole secretorie). L'apparato del Golgi (chiamato anche il corpo di Golgi, complesso di Golgi, o semplicemente Golgi) è stato scoperto dal microscopista italiano Camillo Golgi nel 1898.

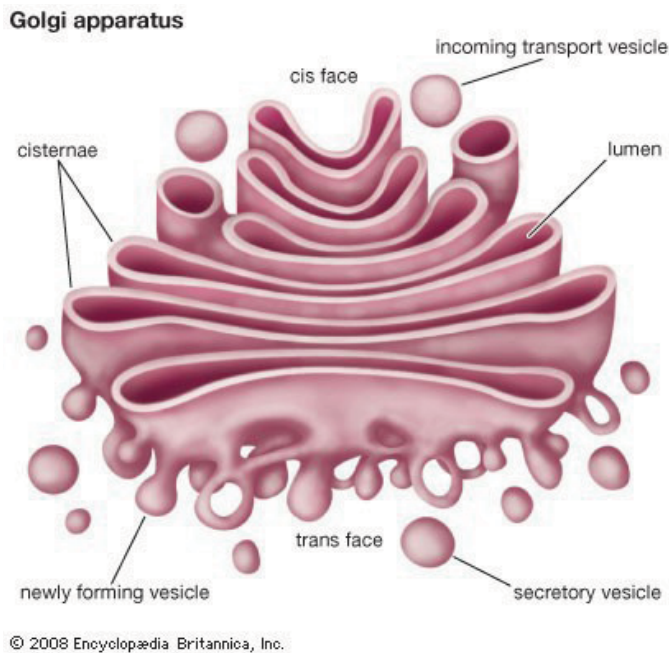
È costituita da una pila di membrane appiattite; ciascuna membrana appiattita racchiude un unico vano. Gli "stack" le cisterne del Golgi sono denominate in base al loro orientamento nella cellula. Il cis Golgi è vicino alla membrana del RE, il trans del Golgi è in prossimità della membrana plasmatica, e il mediale del Golgi si trova nel mezzo. Materiali vengono trasportati tra le pile del Golgi tramite vescicole di membrana che escono da un compartimento nel Golgi (per esempio, dal cis del Golgi) e si fondono con un altro vano (per esempio, alla mediale del Golgi). La proteina si farà strada tra le pile del Golgi fino all'altra estremità chiamata la faccia trans dove viene secreta per andare nelle altre parti

della cellula.

Nel Golgi le catene di carboidrati sono aggiunte alla proteina mentre altre catene vengono rimosse. Negli strati del Golgi vengono anche ordinate le proteine per la secrezione.

Dopo la selezione delle proteine, le membrane del Golgi, formano vescicole secretorie che sono le proteine di trasporto per una destinazione specifica nella cellula.

La destinazione di una proteina è spesso segnalata con una specifica sequenza di amminoacidi alla sua estremità (David D. Sabatini , Gert Kreibich 1976).



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

Fig. 4 Apparato del Golgi

L'apparato di Golgi dirige la produzione, ordinamento, e la secrezione di molecole cellulari. L'apparato del Golgi svolge tre funzioni sovrapposte:

(1) l'elaborazione, (2) l'Assortimento della proteina, e (3) la secrezione.

Gli enzimi nell'apparato di Golgi modificano o processano, alcune proteine e lipidi.

I carboidrati possono essere attaccati alle proteine e lipidi nel reticolo endoplasmatico.

La glicosilazione continua nel Golgi. Perché ciò si verifichi, una proteina o un lipide viene trasportato attraverso vescicole al cis del Golgi.

La maggior parte della glicosilazione avviene nel mediale Golgi. Un secondo tipo di elaborazione è la proteolisi, per cui enzimi chiamati proteasi tagliano le proteine in polipeptidi più piccoli.

Per esempio, l'ormone insulina viene prima fatto come una grande proteina precursore definita proinsulina. Nel Golgi, la proinsulina è assemblata con proteasi in vescicole. Le proteasi ritagliano una porzione della proinsulina per creare una molecola più piccola di insulina che è un ormone funzionale.

Questo accade appena prima della secrezione. Le proteine destinate alla secrezione sono sintetizzate e vanno al Golgi, e poi vengono trasportate da vescicole di membrana plasmatica per la secrezione. L'intero percorso è chiamato la via secretoria. La fase successiva di questo processo nel quale le vescicole si fondono con la membrana plasmatica è chiamato esocitosi .

Questo processo può anche funzionare in senso inverso per prendere sostanze nella cellula, questo è chiamato endocitosi.

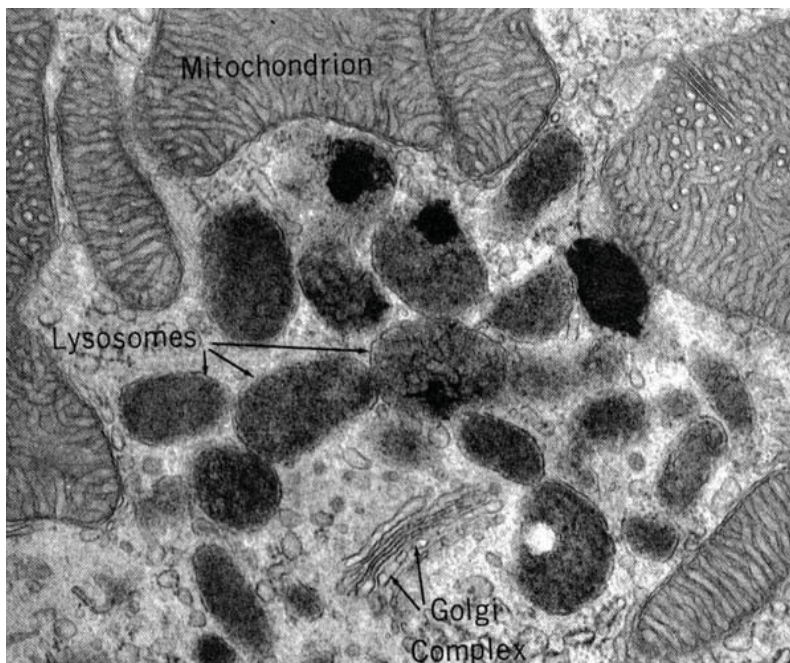


Fig.5 Lisosomi

(<http://bio.winona.msus.edu/berg/IMAGES/lysosome.jpg>)

I lisosomi sono vescicole limitate da membrana. Contengono più di 30 enzimi idrolitici necessari per la digestione di molte molecole complesse: proteine, lipidi, acidi nucleici e polissaccaridi.

Quindi i lisosomi sono siti di degradazione molecolare che si trovano in tutte le cellule eucariotiche. Sono piccoli, pacchetti singola membrana di enzimi acidi che le molecole di digerire e si trovano in tutte le cellule eucariotiche. I lisosomi sono una sorta di "spazzatura" cellulare, per liberarsi di detriti cellulari.

Tutte le proteine che non sono correttamente piegate o avere mutazioni significative

possono essere portate ai lisosomi ed essere degradate, invece di occupare spazio nella cellula. Proteine, detriti e altre molecole possono essere trasportate verso il lisosoma in vari modi.

Le molecole che si trovano fuori della cellula possono essere portate all'interno attraverso un processo chiamato endocitosi. In questo processo, la membrana cellulare si invagina, formando una vescicola contenente la molecola trasportata che può raggiungere un lisosoma.

Il contrario di endocitosi è esocitosi. In questo processo, le molecole dall'interno della cellula sono secreti all'interno di endosomi, strutture di membrana che trasportano le molecole ai lisosomi.

Dopo aver raggiunto i lisosomi, le molecole sono secrete dalla cellula in vescicole di membrana (David D. Sabatini , Gert Kreibich 1976).

In tutte le cellule eucariotiche sono presenti strutture a singola membrana chiamati perossisomi: sono piccole strutture di membrana che utilizzano l'ossigeno molecolare per ossidare molecole organiche.

I perossisomi sono uno dei principali organelli che utilizzano l'ossigeno, gli altri sono i mitocondri. I perossisomi contengono enzimi ossidativi e altri enzimi che aiutano a produrre e degradano il perossido di idrogeno.

A causa delle loro diverse composizioni enzimatiche, i perossisomi hanno diverse strutture.

La loro funzione principale è quello di aiutare la degradazione degli acidi grassi.

I mitocondri, con la sua struttura a doppia membrana, generano adenosina trifosfato (ATP), una molecola che fornisce agli organismi l'energia.

Lo spazio della matrice dei mitocondri è circondato da due membrane.

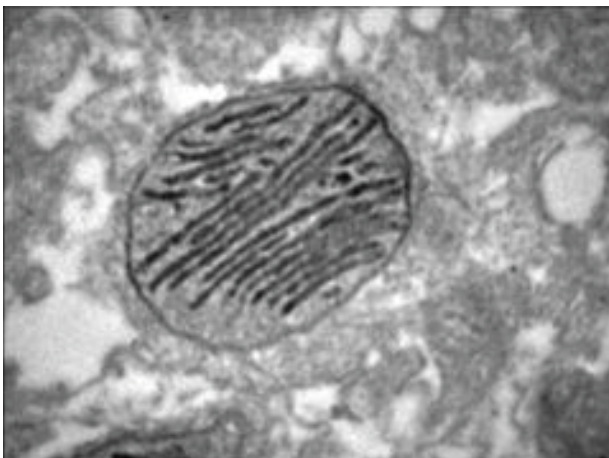


Fig. 6 Mitocondrio

La membrana mitocondriale interna contiene la catena respiratoria e un gran numero di vettori altamente specifici per i substrati prevalentemente anionici per il metabolismo mitocondriale.

In contrasto con le proprietà di permeabilità della membrana, le membrane esterne mitocondriali sono di gran lunga meno specifiche.

Esse agiscono come un setaccio molecolare per molecole idrofile con limite di esclusione definita intorno 3000 Da.

La responsabile per l'altissima permeabilità della membrana esterna mitocondriale è la presenza di una proteina definito "pore-forming" porina mitocondriale.

Le porine mitocondriali sono state isolate da una varietà di cellule eucariotiche. Esse sono proteine basiche con masse molecolari tra 30 e 35 kDa. Esperimenti di ricostituzione definiscono la loro funzione di elementi formanti pori con una conduttanza a singolo canale di circa 0,40 nS (nano Siemens) in 0.1 M KCl a basse tensioni.

Nello stato aperto mitocondriale la porina ha come un poro di diffusione con un diametro effettivo di 1,7 nm. Le porine eucariotiche sono leggermente anione-selettive nello stato aperto ma diventano catione-selettive dopo la chiusura voltaggio-dipendente (R. Benz, 1990), (Benz, R., Ludwig 1985).

Studi ultrastrutturali hanno rivelato un alto grado di organizzazione macromolecolare in cellule eucariotiche. La membrana plasmatica, la membrana nucleare, e le membrane degli organelli citoplasmatici creano compartimenti cellulari con funzioni e composizioni macromolecolari specifiche.

Le membrane limitanti di questi comparti e le strutture all'interno di essi si affidano per la loro funzione sull'organizzazione spaziale precisa di specifici costituenti proteici. Vi è quindi un notevole interesse per la comprensione dei processi che coordinano la biogenesi dei componenti della membrana con il loro assemblaggio in membrane cellulari. Ciò richiede una delucidazione dei meccanismi che assicurano che le proteine e i fosfolipidi di nuova sintesi vengano trasferiti ai loro siti di funzione.

Per molte proteine questo comporta il trasferimento tra diversi comparti e, per alcune, ampie modifiche strutturali.

Per le proteine secretorie e per alcune proteine nella parte esterna delle membrane essere trasportate verso l'ambiente extracellulare si verifica casualmente (David D. Sabatini, 1976).

L'organizzazione spaziale delle cellule, tra cui la disposizione dei componenti citoplasmatici e forma globale delle cellule, non è esplicitamente scritto nel genoma.

I geni specificano solo le sequenze primarie di macromolecole, porzioni dei quali sono effettivamente rilevanti per la localizzazione di tali molecole nello spazio.

Ma l'architettura cellulare deriva dalle interazioni di numerosi prodotti genici. Molte di queste interazioni possono essere ben descritte sia come auto-organizzazione molecolare, sia auto-assemblaggio o auto-costruzione dinamica delle molecole.

Nuovi prodotti genici, e anche la biosintesi delle molecole, vengono rilasciati in un ambiente cellulare che già possiede una struttura spaziale definita, e trovano il loro posto in quel modello sotto l'influenza dell'ordine esistente. il citoscheletro è lo strumento principale per creare architettura cellulare.

Ogni cellula è continua con la sua cellula progenitrice, non solo geneticamente ma anche strutturalmente, e la nuova cellula, a sua volta, è come una fonte di informazioni configurazionale per la realizzazione delle proprie figlie (Franklin M. Harold,2005).

## 6) MATERIALI E METODI

I campioni cellulari utilizzati sono le cellule del liquido amniotico (età tra la quindicesima e la ventesima settimana di gestazione) estratti dal liquido amniotico tramite amniocentesi, tecnica di diagnosi prenatale per lo studio del cariotipo.

Le cellule del liquido amniotico sono state fornite dall'unità Operativa di Genetica Clinica AOU di Sassari sono stati selezionati tenendo conto di diversi parametri elencati di seguito:

- il sesso del feto,
- l'età della partoriente,
- l'uso di tabacco prima e/o durante la gravidanza,
- eventuali malattie genetiche del nascituro.

Per evitare di avere differenze legate a questi parametri si è scelto di studiare le differenze di genere tra cellule del liquido amniotico XX e XY sani e di donne non fumatrici.

Foto di cellule del liquido amniotico XX e XY, immagini acquisite al microscopio ottico

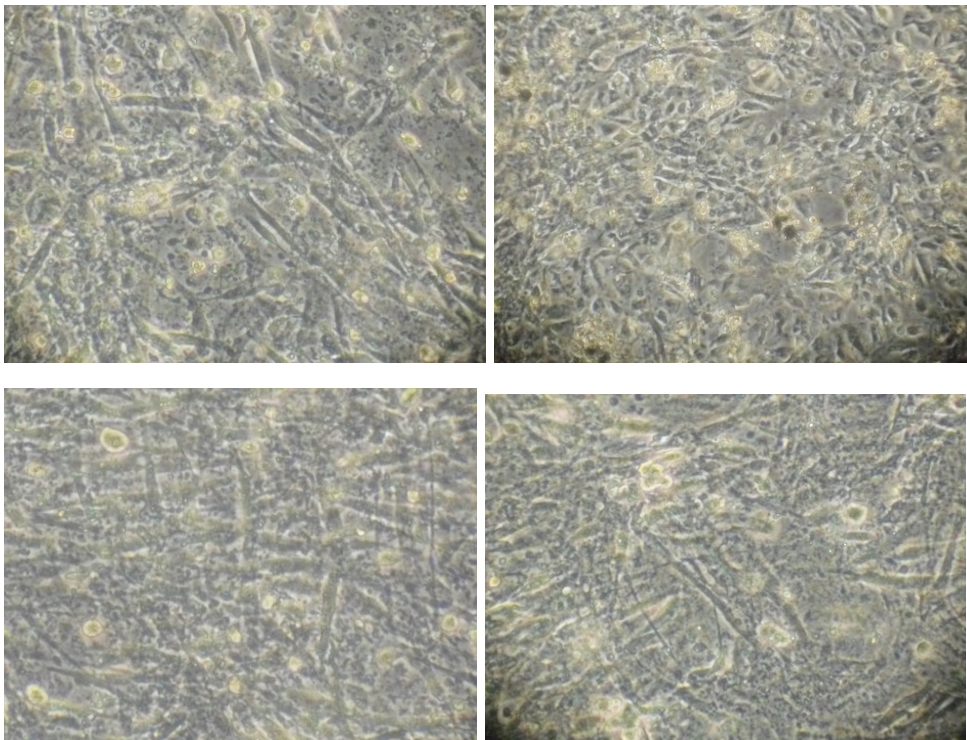


Fig.6 Morfologia delle cellule del liquido amniotico XX e XY a confluenza al microscopio a contrasto di fase (ingrandimento originale, x100).

## **7) ISOLAMENTO DELLE CELLULE DAL LIQUIDO AMNIOTICO**

### **Metodo dei cloni “in situ”**

Per l'isolamento delle cellule del liquido amniotico si è proceduto nel seguente modo: il liquido amniotico prelevato dopo 17 settimane di gestazione della madre è stato centrifugato a 1200 giri per 7 minuti.

Il surnatante è stato rimosso con una pipetta “pasteur” perché contiene cellule morte o deteriorate.

Una piccola aliquota del surnatante viene conservata in modo tale da poter risospendere il pellet cellulare, in 15ml di terreno Amniomed (Chang Medium) addizionato del 20% di FBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e 1% di antibiotici/antimicotici (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

La sospensione cellulare è stata suddivisa in 5 capsule Petri di 30 mm di diametro, sul cui fondo è stato adagiato un vetrino coprioggetto rettangolare.

Le colture sono state incubate a 37°C in termostato in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> per 7-8 giorni; dopo 8-10 giorni le cellule sono state osservate al microscopio rovesciato per valutarne la proliferazione e la confluenza. È stato cambiato il terreno e preventivamente lavate le piastre con PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) per allontanare eventuali cellule in apoptosi e eventuali sostanze di rifiuto del metabolismo cellulare. Le colture sono state tenute in termostato a 37°C per altri 2-3 giorni in 15ml di Amniomed al 20% di FBS e 1% di antibiotici/antimicotici.

## **8) PROCESSAMENTO DELLE COLTURE CELLULARI**

Le colture cellulari a confluenza (i cui cloni sono risultati essere di dimensioni ottimali), sono state tenute per 1 ora in Colcemid 0.05µl/ml (1 goccia di Colchicina). Il Colcemid blocca le cellule in mitosi nella fase di metafase. Durante il processamento è stato rimosso il terreno, dopo tripsinizzazione, centrifuga, e sostituito con 3 ml di soluzione ipotonica di sodio citrato allo 0.9% ( NaCitrato 0.8% + KCl 0.56%) lasciandola agire per 15 min.

Per il pre-fissaggio sono stati effettuati una serie di passaggi nel fissativo con una soluzione 3:1 di metanolo:acido acetico. Le cellule fissate sono “strisciate” con un ansa sterile sul vetrino o facendo cadere una goccia di cellule in fissativo sopra il vetrino, che poi è stato fatto asciugare all'aria. Si avrà una visione del nucleo intero mentre gli altri organuli vengono persi.

## 9) COLORAZIONE IN BANDE QFQ

Il vetrino è stato trattato con il colorante (Quinacrine Moustard) per 25 minuti.

In seguito è stato effettuato un lavaggio veloce in tampone fosfato, e montato sul vetrino portaoggetti con l'interposizione di una goccia del tampone fosfato. Infine è stato chiuso con comune smalto per unghie applicato lungo i bordi. Il vetrino è stato osservato al microscopio a fluorescenza e i cariotipi sono stati allestiti mediante l'utilizzo di opportuni software.

L'analisi è stata eseguita su metafasi da 10-12 cloni indipendenti, provenienti da 3 diverse colture.

Da quest'analisi si può stabilire il sesso del feto ed eventuali anomalie cromosomiche.

## 10) INCLUSIONE IN RESINE DURCUPAM

L'inclusione delle cellule in resina è avvenuta dopo l'allestimento dei preparati secondo il seguente protocollo:

- Fissazione
- Post-fissazione
- Disidratazione
- Inclusione

### ***Fissazione***

Le cellule dopo la tripsinizzazione dalle fiasche sono state centrifugate e raccolte in eppendorf. Sono state fissate in glutaraldeide al 2,5% per 2-4 ore a 4°C. La glutaraldeide ha la funzione di immobilizzare i costituenti cellulari e consentire al preparato di supportare gli stress fisici e chimici dei passaggi successivi.

### ***Post-fissazione***

Le cellule sono state lavate con il tampone fosfato pH7.4 e post-fissate in osmio tetrossido OSO4 1% lasciate per 60 min. a 4°C.

### ***Disidratazione***

Dopo la post- fissazione le cellule sono state lavate con il tampone fosfato pH 7.4 e disidratate in etanolo al 70%, 80%, 90% a 4°C ed etanolo assoluto a temperatura

ambiente. Sono stati fatti 3 cambi di 10 minuti ciascuno per ciascun etanolo di diversa concentrazione.

### **Inclusione**

Le resine durcupam ACM1 e ACM2 sono state preparate in Falcon Tube da 50 ml. ACM1 è stata preparata un'ora prima dell'utilizzo miscelando 10 ml resina Durcupam A/M (epoxy resin), 10 ml resina Durcupam B (964 hardener) e 3,5 ml di resina D (plasticiser). ACM2 è stata preparata poco prima dell'uso, unendo 20 ml della resina ACM1 a 0.15 ml della resina durcupam C (964 accelerator).

Le cellule sono state incluse inizialmente in una soluzione di ossido di propilene e resina secondo la seguente tabella:

**ossido di propilene** 3 cambi per 15 min. a temperatura ambiente

**ossido di propilene:resina ACM1** 3:1 a T. ambiente per 60 min., eppendorf chiuse

**ossido di propilene:resina ACM1** 1:1 a T. ambiente per 60 min., eppendorf aperte

**resina assoluta ACM2** a 50°C-60°C in stufa per 5 giorni, eppendorf aperte

Sono stati tagliati i campioni in resina con l'ultramicrotomo.

## **11) CITOFUORIMETRIA**

Sono stati descritti molti protocolli di citofluorimetria a flusso che riguardano i diversi compartimenti cellulari e la loro funzione è di rilevare le cellule apoptotiche (Zamai L. et al. 2001).

La maggior parte di essi si sono concentrati sulla valutazione delle variazioni dei parametri di dispersione della luce, indirettamente connessi con alterazioni morfologiche (Darzynkiewicz Z. et al.,1992, Zamai L. et al.,1993); la bassa incorporazione del PI a causa della perdita di DNA frammentato dopo la fissazione (Darzynkiewicz Z. et al.,1997 , Zamai L.et al.,1996); l'incorporazione di PI che è causa di alterazioni precoci della membrana cellulare sulle cellule non fissate ( Frey T. 1997, Vitale M. et al.1993), e le variazioni del potenziale di membrana mitocondriale ( Darzynkiewicz Z. et al.,1997 , Poot M. et al 1999).

Il protocollo utilizzato è quello della colorazione di ioduro di propidio.

### **Protocollo di colorazione con ioduro di propidio PI**

Per effettuare la colorazione con il PI è necessario ottenere una lisi della membrana citoplasmatica poiché il PI non è in grado di colorare in maniera stechiometrica le cellule con la membrana integra. Le cellule vengono fissate in etanolo freddo al 70% 4°C overnight.

Sono state centrifugate a 2000 G per 5 minuti e sono stati fatti dei lavaggi in PBS 1X e centrifugate per eliminare tutto l'etanolo.

Soluzione totale di RNAsy e propidio.

È stata preparata una soluzione di RNAsy mg/ml, ioduro di propidio 10mg/ml (il P.I. è fotosensibile deve prendere meno luce possibile) e PBS:

**RNAsy 20µg/ml**

**ioduro di propidio 5 µg/ml**

**PBS 400 µl**

L'uso dell'RNAasi si rende necessario per eliminare il RNA a doppia elica che potrebbe legare il PI e quindi influenzare la colorazione specifica del DNA.

Proprio per le caratteristiche della soluzione con il P.I. è stata lasciata a temperatura ambiente avvolta in carta stagnola per poi essere utilizzata sui campioni.

È stato aspirato il PBS dai campioni cellulare dopo due centrifughe e sostituito con 400 µl di soluzione totale di RNAsy e propidio. Infine sono stati ricoperti con carta stagnola i campioni e posti overnight a 4°C.

I campioni sono stati letti al citofluorimetro.

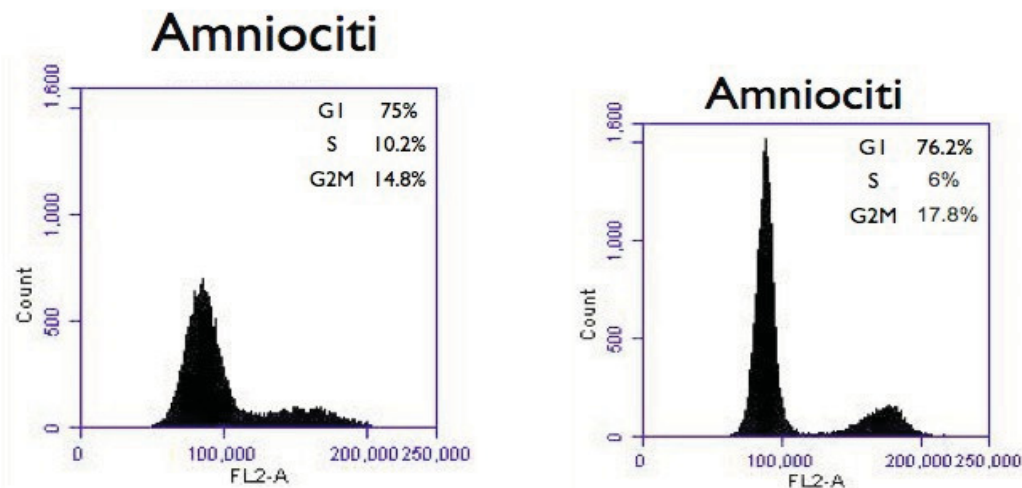


Fig. 7 Valutazione del picco ipodiploide dopo colorazione con ioduro di propidio. L'istogramma mostra il picco delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare (G0/G1, S, G2/M).

Lo ioduro di propidio (3,8–diammino–5dietilmetil amminopropil–6fenilfenantridin diioduro), PI è un colorante sintetico caratterizzato da una bassa fluorescenza (rosso-arancio), in grado di legarsi selettivamente agli acidi nucleici.

Il PI forma due tipi di legame con DNA o con RNA a doppia elica: un legame primario, quando il colorante si lega a due coppie di basi adiacenti dell'acido nucleico incrementando l'efficienza di fluorescenza di 20 volte rispetto al PI libero, ed un legame secondario, esterno alla doppia elica dove invece l'incremento di fluorescenza non si verifica. Il taglio internucleosomico del DNA della cellula apoptotica viene usato per valutare se la cellula è apoptotica.

Per valutare se il taglio è avvenuto viene utilizzata la metodica d'analisi del ciclo cellulare.

Il PI, legandosi stechiometricamente alla doppia elica del DNA (o al RNA a doppia elica) fornisce l'informazione sulla quantità di DNA contenuta nelle cellule e maggiore è il contenuto di DNA maggiore sarà la fluorescenza).

Il contenuto di DNA varia a seconda della fase del ciclo in cui si trova una cellula.

La fase G2 e la mitosi (M) hanno una quantità di DNA doppia rispetto alla fase G1, mentre durante la fase di sintesi del DNA (fase S), la cellula ha una quantità di DNA intermedia tra il contenuto in G1 e G2. Le cellule apoptotiche perdono piccoli frammenti di DNA ed è possibile osservare in esse una riduzione della fluorescenza del PI dovuta a una diminuzione del DNA. Con questo metodo è possibile valutare la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare: G0/G1, S e G2/M (Luchetti F. et al 2009).

## 12) ANALISI MORFOLOGICA

Sono state effettuate delle colture di liquido amniotico poste 15 ml di terreno Amniomed addizionato del 20% di FBS e 1% di antibiotici/antimicotici. È interessante analizzare l'aspetto morfologico delle cellule a 2 e 5 giorni nel medium (Figg.8- 10 XX e Figg.9 - 11 XY).

È molto evidente che le cellule in queste condizioni si stanno organizzando in clusters all'interno delle fiasche. Le cellule del liquido amniotico si sono dimostrati capaci di differenziare già dopo 5 giorni in quanto mostrano un fenotipo simil-fibroblastoidi, dalla presenza di cellule con più nuclei (frecche) e di cellule di forma allungata.

Le cellule coltivate, che inizialmente erano solo sulla superficie della piastra, velocemente iniziano ad organizzarsi in multipli strati. Al decimo giorno (Fig.12 XX e Fig. 13 XY) alcuni clusters appaiono mostrando cellule stratificate.

Il fenotipo appare ancora più differenziato rispetto a quello mostrato ai 5 giorni in quanto le cellule assumono una forma esagonale associata ai doppi nuclei e alla vicinanza con le cellule vicine in contrasto con la forma appiattita che si osserva generalmente in colture monostrate. Ancora più evidente è la proliferazione e l'organizzazione allo stesso tempo T delle cellule del liquido amniotico XX rispetto a quelle XY.

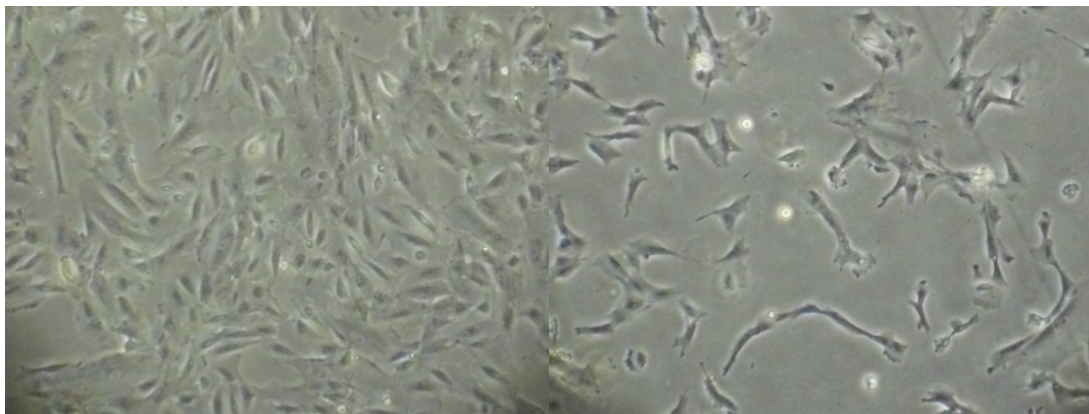


Fig.8 Cellule del liquido amniotico XX a 2 giorni di coltura.

Fig. 9 Cellule del liquido amniotico XY a 2 giorni di coltura

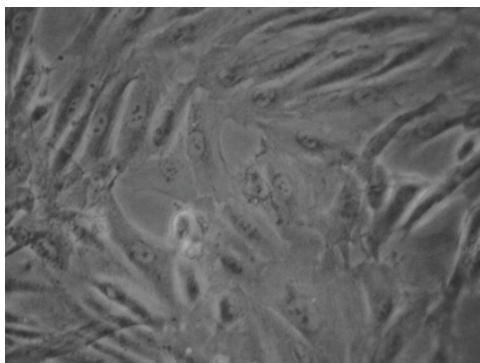


Fig.10 Cellule XX a 5 giorni di coltura

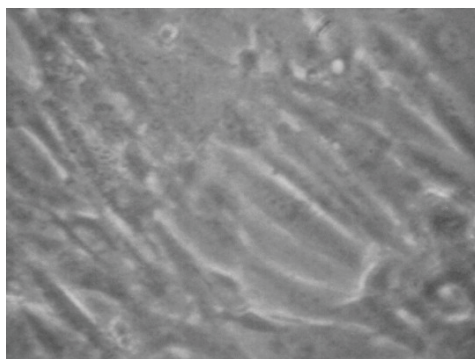


Fig.11 Cellule XY a 5 giorni di coltura



Fig.12 Cellule XX a 10 giorni di coltura

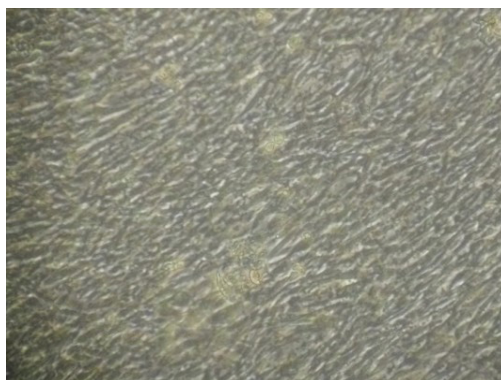


Fig.13 Cellule XY a 10 giorni di coltura

### 13) PROLIFERAZIONE CELLULARE

La conta delle cellule è stata effettuata tramite l'emocitometro di Burker dopo misurazione della vitalità con trypan blue. I dati sperimentali in vitro evidenziano che la proliferazione cellulare è maggiore per le cellule del liquido amniotico XX rispetto a quelle XY e non ci sono differenze significative di morte cellulare.

La differenza nei valori medi dei due gruppi non è abbastanza grande per rifiutare la possibilità che la differenza è dovuta alla variabilità casuale campionamento. Non vi è una differenza statisticamente significativa tra i gruppi ( $P = 0,170$ ).

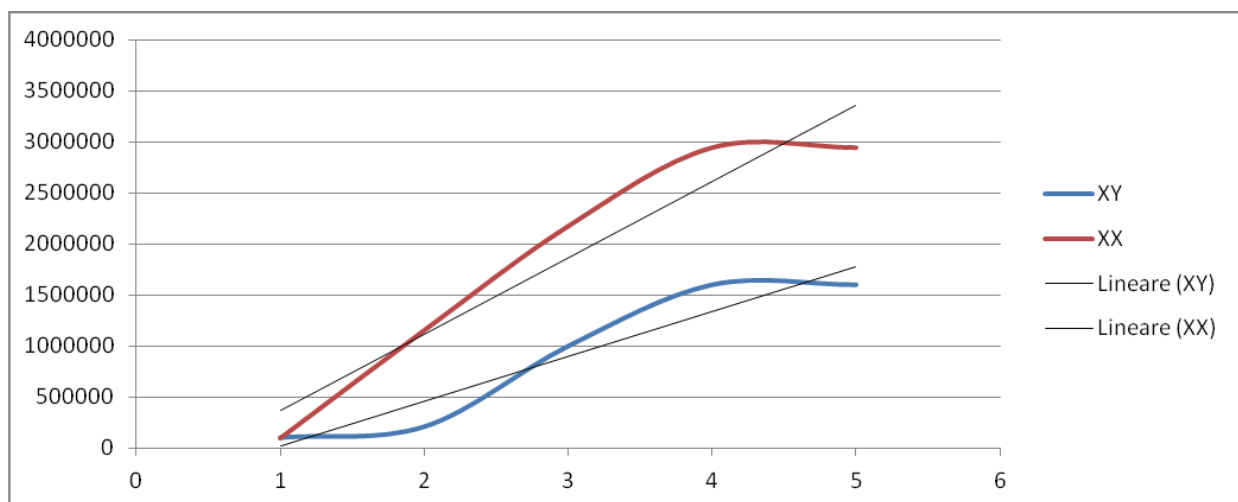


Fig.14 Grafico della proliferazione cellulare XX e XY nel tempo di 10 giorni.

**Normality Test:** Passed ( $P = 0,615$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 0,223$ )

Difference: 963820,000

$t = 1,509$  with 8 degrees of freedom. ( $P = 0,170$ )

Power of performed test with  $\alpha = 0,050$ : 0,162

95 percent confidence interval for difference of means: -508978,256 to 2436618,256

A livello cellulare, ormoni sessuali, sia androgeni ed estrogeni, regolano l'attivazione trascrizionale di varie molecole coinvolte nei processi cellulari chiave (risposte immunitarie, proliferazione cellulare e apoptosi) attraverso i recettori funzionali localizzati

in vari organelli subcellulari, inclusi membrana plasmatica e mitocondri. Per esempio l'espressione di recettori per gli androgeni ed estrogeni è stata studiata nel fegato sano e con carcinoma epatocellulare HCC , suggerendo un forte legame tra ormoni sessuali e patogenesi del carcinoma (Ohnishi S. et al. 1986; Iavarone M. et al. 2003).

Altri studi sulle cellule staminali neurali mostrano una maggiore proliferazione in risposta agli estrogeni, mentre gli androgeni hanno effetti inibitori sulla loro proliferazione (Ray R., N.M. Novotny, et al. 2008).

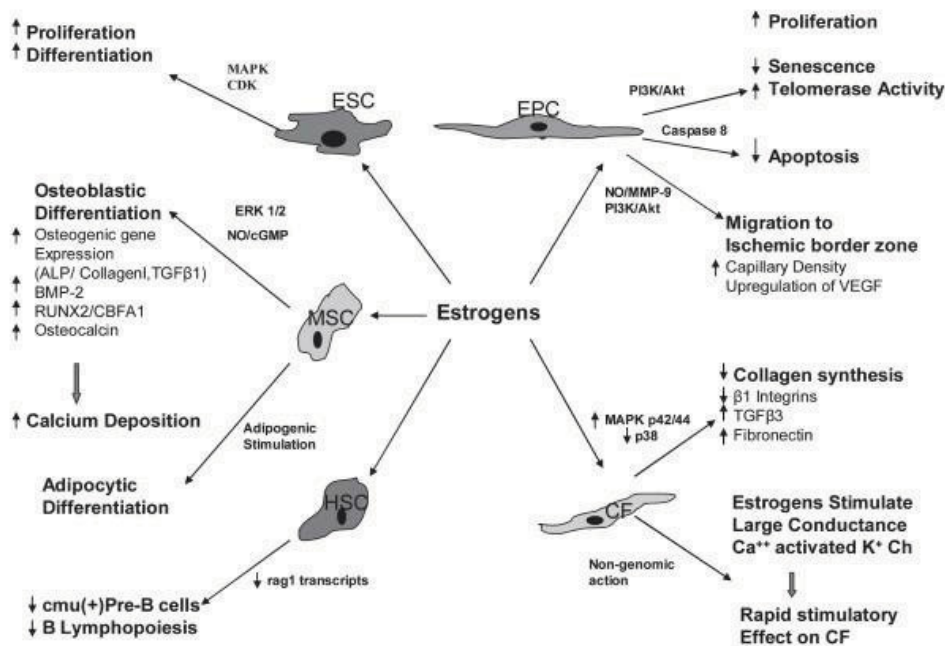


Fig.15 Effetti degli estrogeni sulle varie cellule staminali e cellule progenitrici. ESC (cellule staminali embrionali), EPC (cellule progenitrici endoteliali), MSC (cellule staminali mesenchimali); HSC (cellule staminali ematopoietiche), CF (fibroblasti cardiaci), BMP (proteina della matrice ossea); RUNX2 / Cbfa1 (fattore di trascrizione essenziale per la differenziazione degli osteoblasti) (Ray R., N.M. Novotny, et al. 2008).

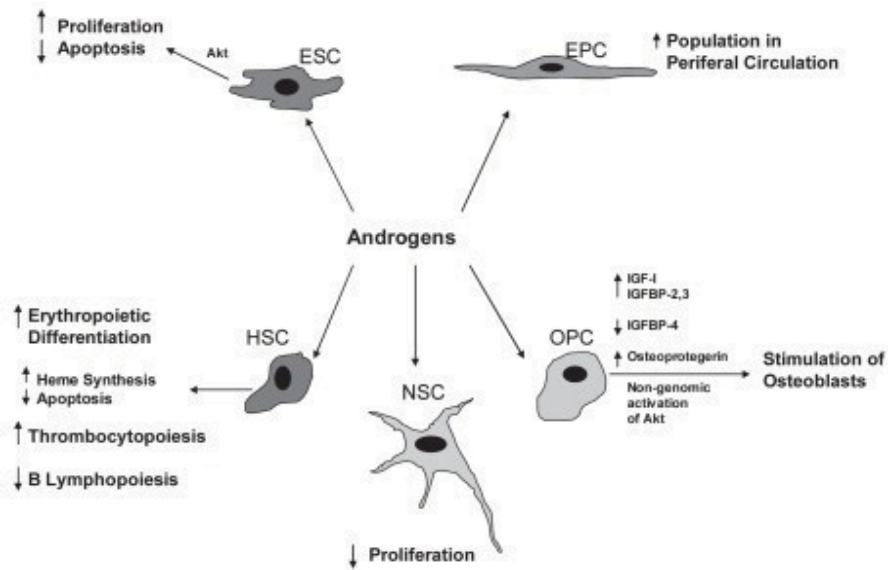


Fig.16 Effetti degli androgeni sulle varie cellule staminali e cellule progenitrici. ESC (cellule staminali embrionali), EPC (cellule progenitrici endoteliali); HSC (cellule staminali ematopoietiche); NSC (cellule staminali neurali); OPC (cellule progenitrici osteogeniche) (Ray R., N.M. Novotny, et al. 2008).



## FOTOGRAFIE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

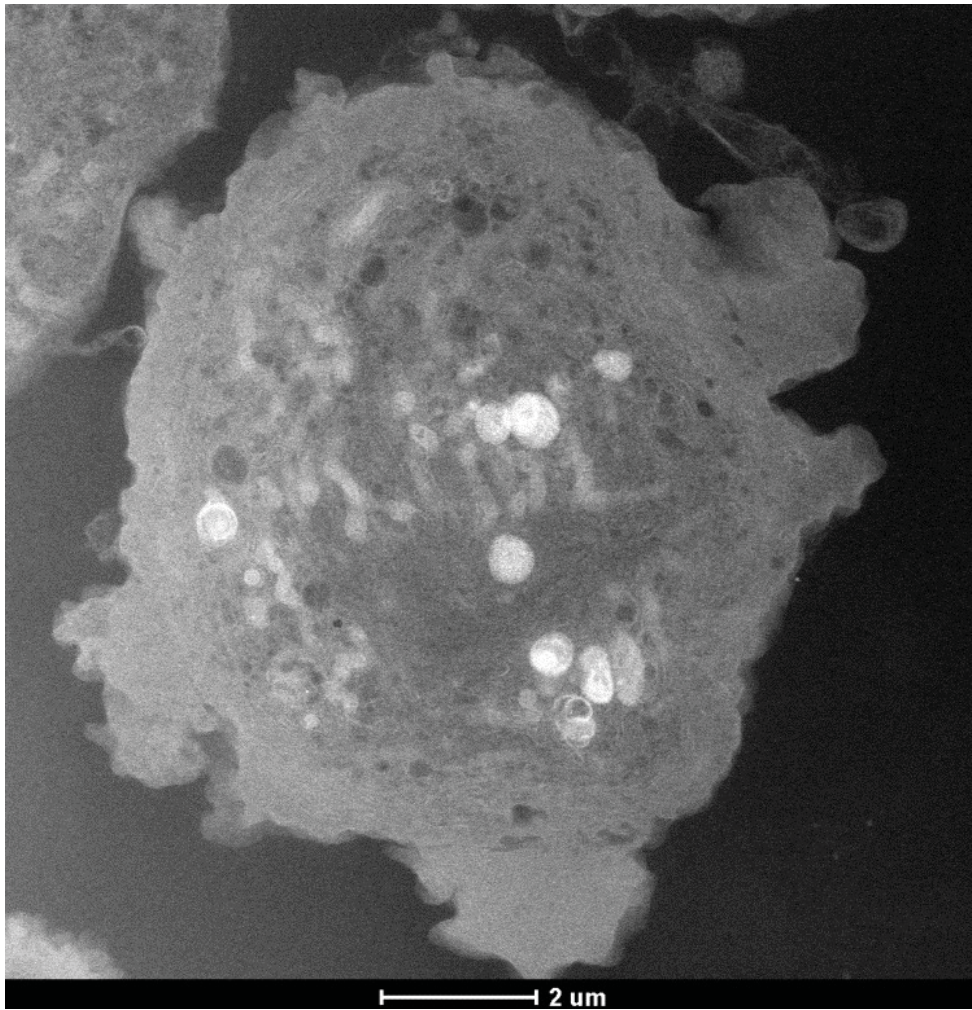


Fig.17 Ultrastruttura di cellule XY si notano molti vacuoli fagocitici e lisosomi. Non è visibile il nucleo e il nucleolo.

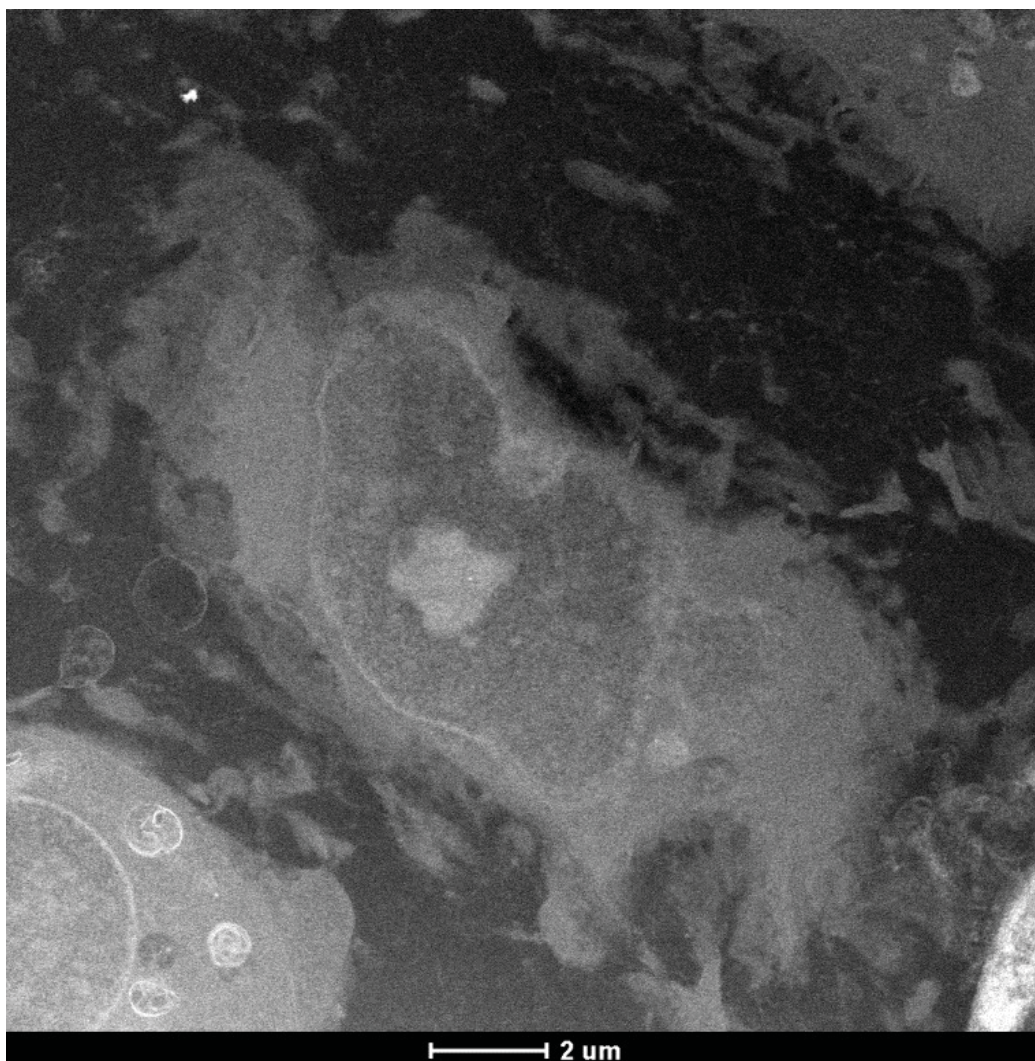


Fig.18 Ultrastruttura di cellule XX che mostra estroflessioni citoplasmatiche, un grande nucleo in posizione non centrale per via della conformazione non circolare della cellula e il nucleolo .



Fig.19 Ultrastruttura di cellule XX che mostra estroflessioni citoplasmatiche, si notano molti vacuoli fagocitici e lisosomi. Il citoplasma contiene vescicole di trasporto. Il nucleo grande in posizione centrale, zolle di eterocromatina, la matrice nucleare che contiene eucromatina e il nucleolo .

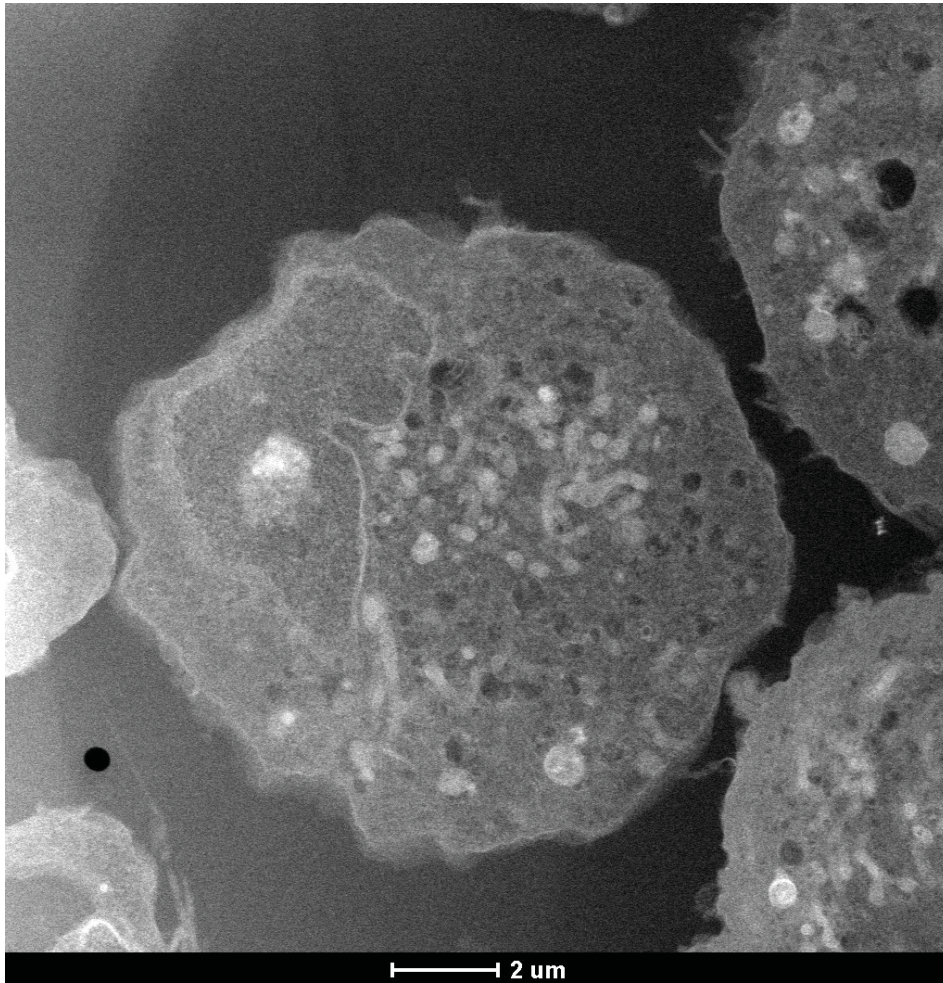


Fig.20 Ultrastruttura di cellule XY. Si notano molti vacuoli fagocitici e lisosomi. Il citoplasma contiene membrane del Golgi e vescicole di trasporto che si muovono tra il Golgi e la membrana plasmatica. Il nucleo in posizione laterale e il nucleolo.

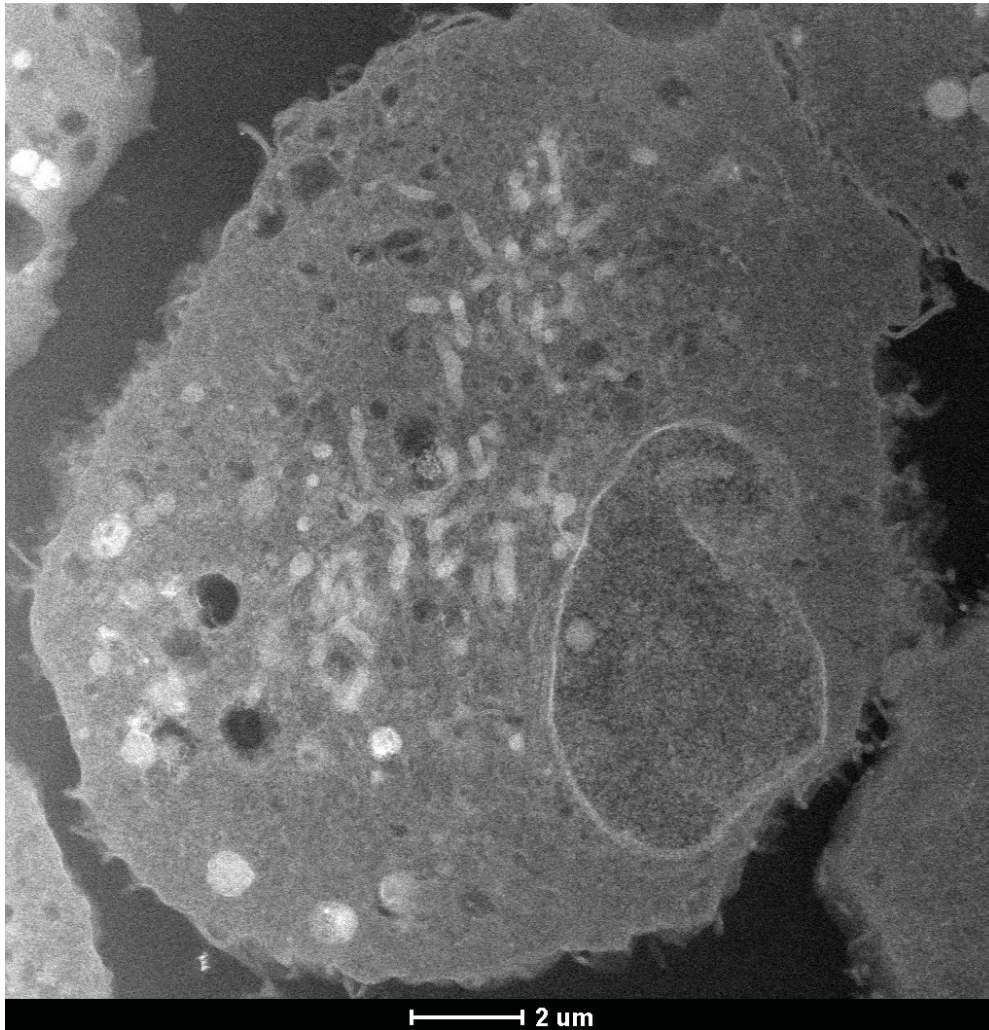


Fig.21 Ultrastruttura di cellule XY che mostra estroflessioni citoplasmatiche, si notano molte vacuoli fagocitici e lisosomi. Il citoplasma contiene membrane del Golgi, endosomi e vescicole di trasporto che si muovono tra il Golgi e la membrana plasmatica. Il nucleo in posizione laterale e il nucleolo piccolo.

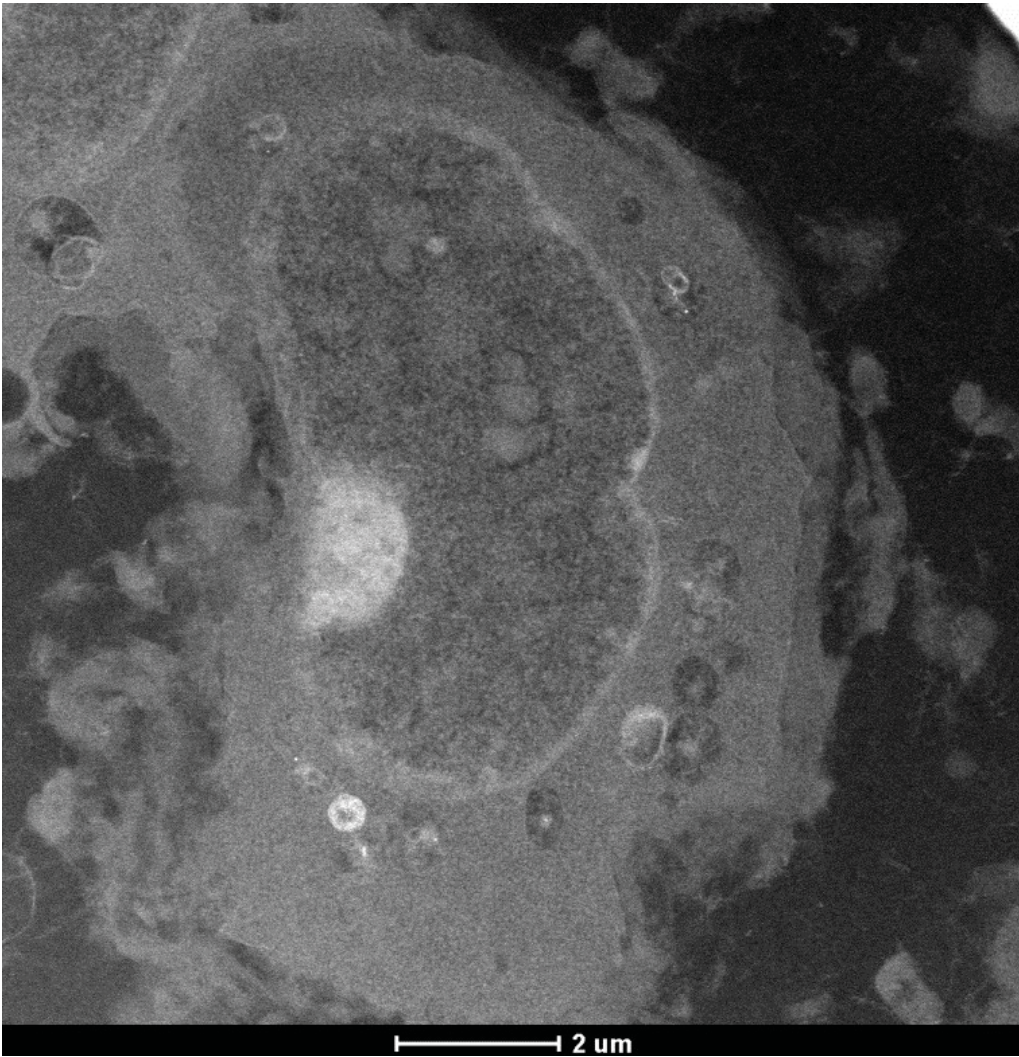


Fig.22 Ultrastruttura di cellule XX che mostra estroflessioni citoplasmatiche, si notano molte vacuoli fagocitici e lisosomi. Il citoplasma contiene vescicole di trasporto. Il nucleo in posizione centrale e un grande nucleolo.

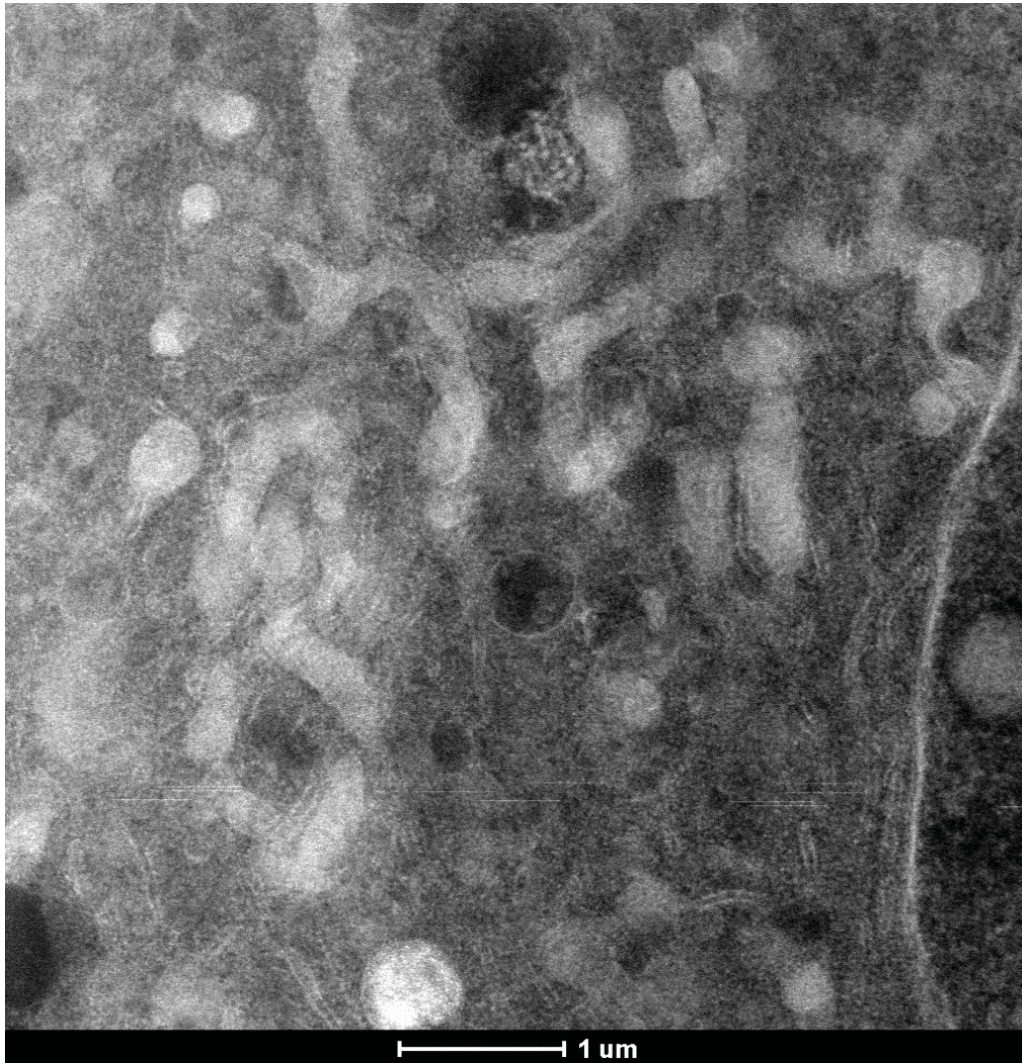


Fig.23 Apparato del Golgi di cellule XY. Le membrane dell'apparato del Golgi sono formate da pile di cisterne o membrane lisce associate con molte vescicole. L'apparato del Golgi svolge molteplici funzioni tra cui processi di modificazione, trasporto e rilascio di proteine nascenti che provengono dal reticolo endoplasmatico rugoso e produzione di lisosomi.



Fig.24 Lisosomi di cellule XX. Tali organuli delimitati da membrana (arrivano a dimensioni di  $1\mu\text{m}$ ) contengono dozzine di enzimi idrolitici utilizzati per le degradazioni biologiche. I lisosomi non coinvolti nelle attività digestive sono lisosomi primari. I lisosomi secondari sono o sono stati utilizzati precedentemente per lo smaltimento di sostanze di rifiuto e potrebbero, quindi essere classificati come fagosomi (materiale estraneo inglobato) oppure fagolisosomi.



Fig.25 Nucleo di cellule XX. Nucleo, nucleolo, zolle di eterocromatina e matrice nucleare che contiene euromatina spiralizzata.

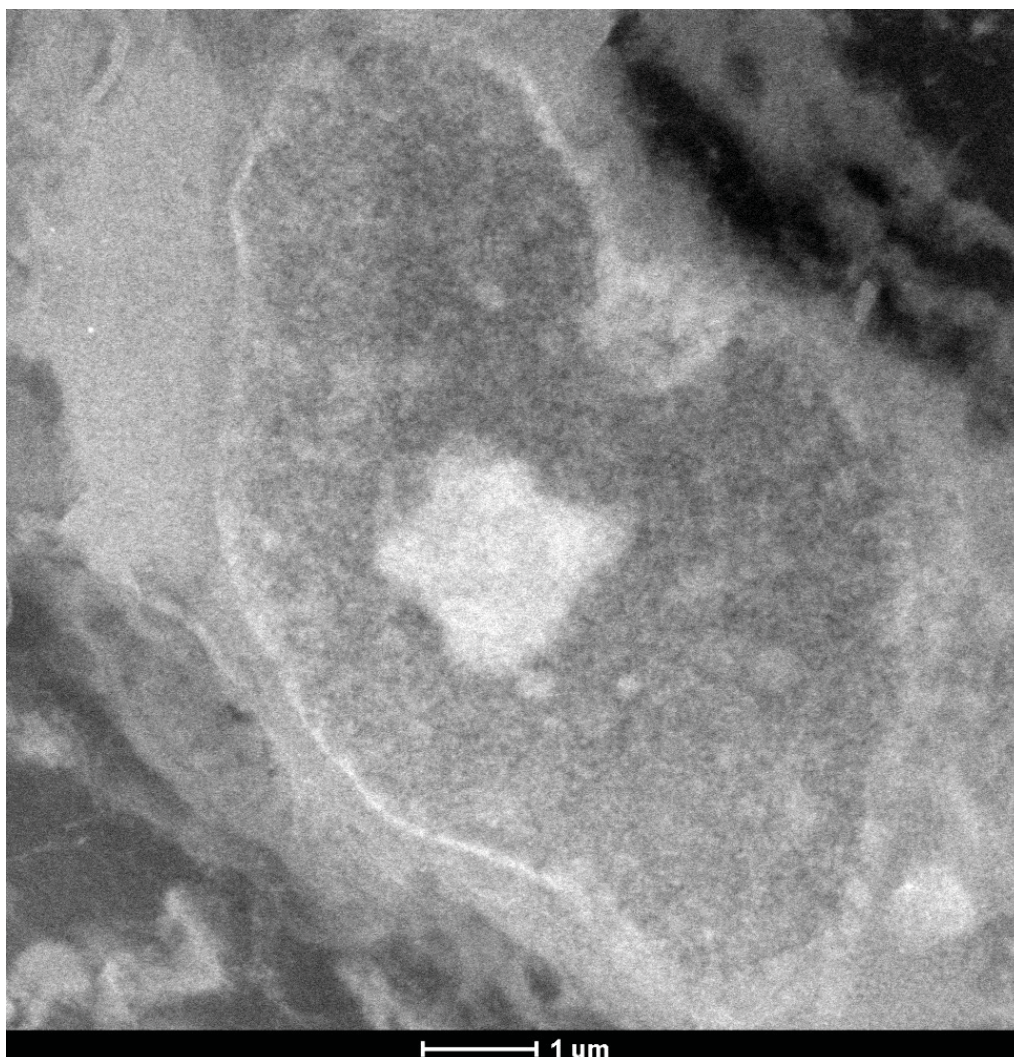


Fig.26 Nucleo di cellule XY. Nucleo della cellula, nucleolo, zolle di eterocromatina e matrice nucleare che contiene eucromatina non spiralizzata (la cromatina consiste di corti avvolgimenti di DNA intorno alle proteine istoniche, formando i nucleosomi).

## 14) PROGRAMMA DI ANALISI DI IMMAGINE IMAGEJ

Le immagini sono state analizzate con un programma di analisi di immagine: "ImageJ":

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Senza installazione dei plug-in sono state eseguite la conta automatica e la misurazione di lunghezze, di aree e di perimetri degli organuli cellulari.

Conta automatica: File > Open aprire il file

Image>Type>8-bit trasforma l'immagine in un'immagine a 8-bit

Image>Adjust>Threshold scegliere i valori in modo da evidenziare gli organuli da contare in modo che risultino distinti. La funzione Analyze Particles permette di scegliere i limiti di dimensione per le particelle da contare. L'area delle "macchie viene misurata in pixel<sup>2</sup> quindi bisogna conoscere l'area delle "macchie che bisogna escludere dalla conta e devono essere tutte più piccole delle particelle da contare.

Analyze>Set Measurement settare le misure che si vogliono ottenere, prendere lo strumento Wand e selezionare tenendo premuto Shift le più grandi macchie che si vogliono escludere dalla conta.

Analyze>Measure si aprirà una finestra con l'area in pixel<sup>2</sup> delle macchie selezionate. Memorizzare l'area della più grande perché le particelle che si devono contare avranno un'area maggiore di questa.

Analyze> Analyze Particles vengono settate le dimensioni delle particelle minime e massime da contare.

Per avere una conferma della conta automatica si può fare una conta manuale.

Conta manuale:

File>Open aprire il file

Point Selection Tool tenendo premuto il tasto Shift cliccare sulle cellule. Ad ogni cliccata appare un quadratino con il numero della cellula o organulo cellulare.

Analyze>Measure per ogni punto si avrà un numero, le coordinate e il valore di luminosità del pixel.

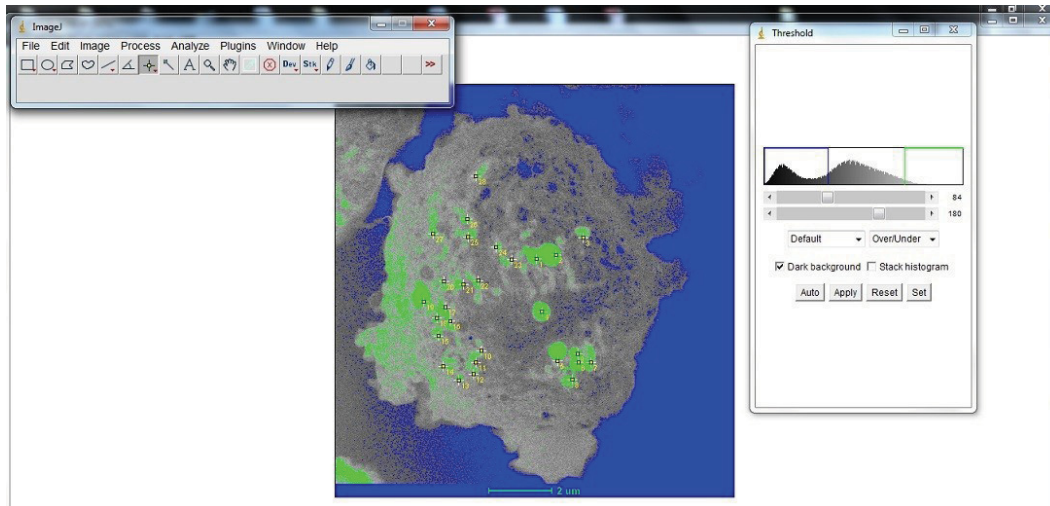


Fig.27 programma ImageJ

Misurazioni:

File>Open aprire il file. Con lo strumento Magnifying glass ingrandire il righello presente nella foto e inquadrarlo e leggere la dimensione. Con lo strumento Straight line selection disegnare una linea lunga come il righello.

Analyze>Measure si avrà la misura in pixel del righello.

Analyze> Set Scale si definisce quanto corrisponde nella realtà la distanza in pixel.

Straight line selection selezionare le linee, aree circolari, ovali, rettangolari e irregolari.

Analyze>Set Measurement scegliere le misure che si vogliono ottenere su queste aree (il perimetro, la superficie, i valori di luminosità, etc.).

Analyze>Measure il software darà i valori richiesti nell'unità di misura settata.

## 15) ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

L'analisi statistica dei risultati delle immagini fotografiche, dopo misurazione con Image J e stata effettuata mediante il software Microsoft Office Excel e SigmaStat 3,5.

Si è proceduto con l'analisi statistica:

- Perimetro nucleo
- Area nucleo
- Perimetro cellula
- Area cellula

- Perimetro vacuoli
- Area vacuoli

**PERIMETRO NUCLEO**

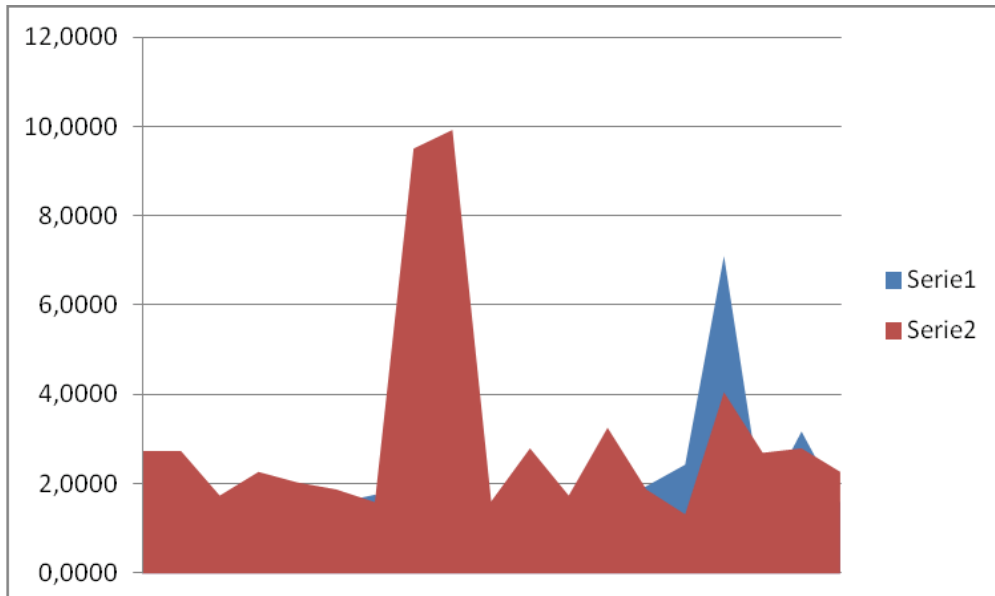


Fig.28 a

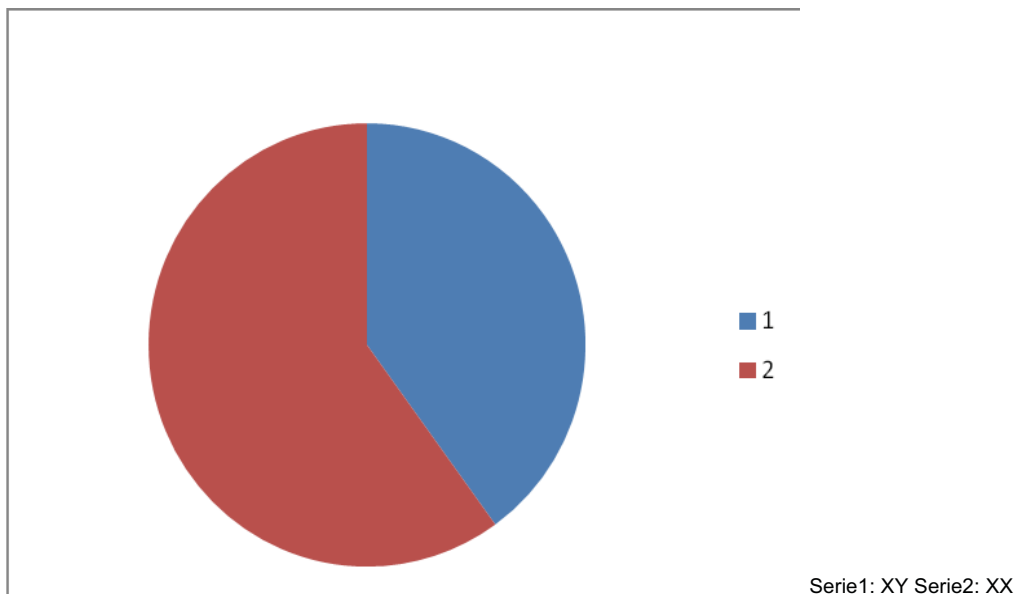


Fig.28 b

Figg.28 a/b. Grafico della relazione del perimetro del nucleo delle cellule XY e XX

La variazione intervenuta con il trattamento è maggiore di quanto ci si aspetterebbe per caso, vi è una differenza statisticamente significativa ( $P= 0,036$ ).

## AREA NUCLEO

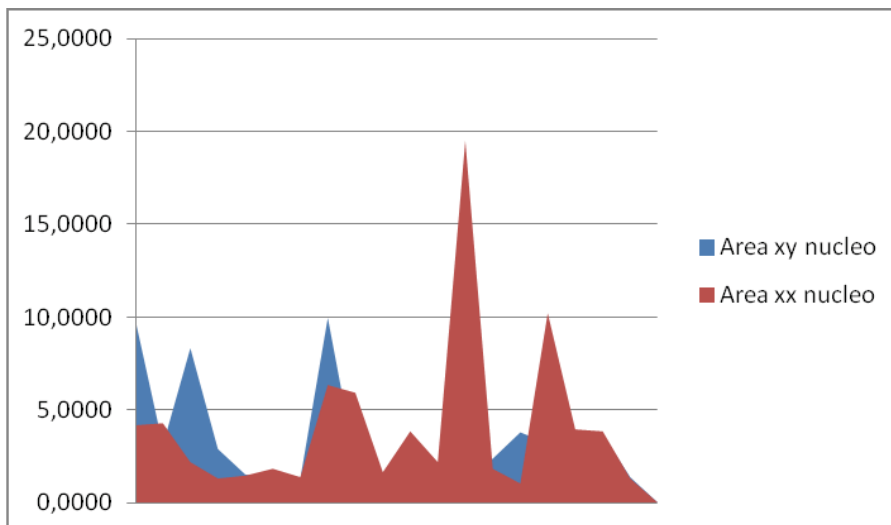


Fig.29 a

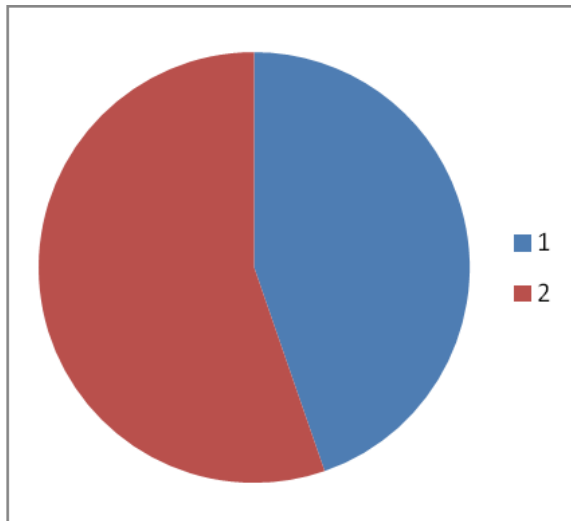


Fig.29 b

Figg.29 a/b. Grafico della relazione dell'area del nucleo delle cellule XY e XX

Il cambiamento che si è verificato con il trattamento non è abbastanza grande da escludere la possibilità che essa è dovuta al caso ( $P = 0.568$ ).

## PERIMETRO CELLULA

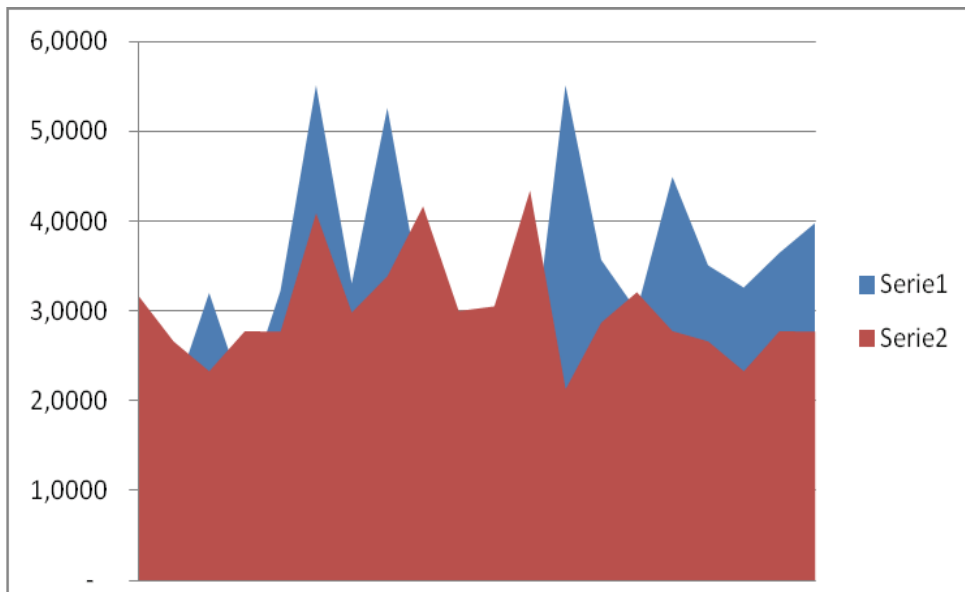


Fig.30 a

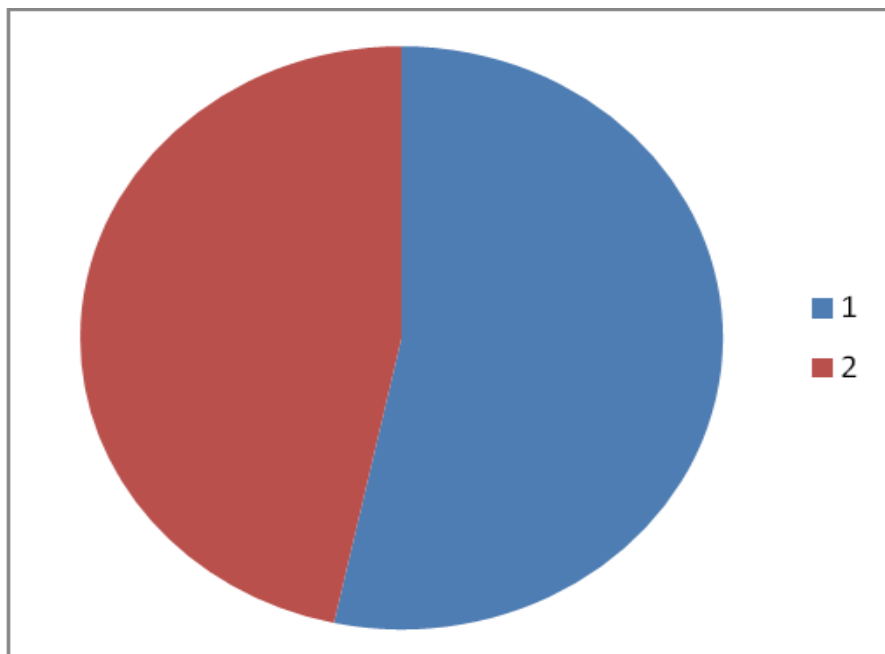


Fig.30 b

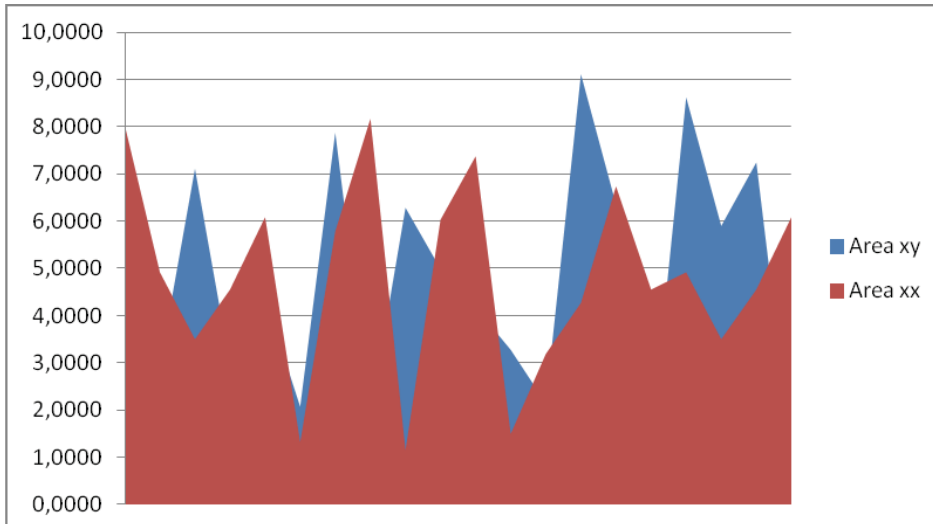
## Normality Test:Passed (P = 0,820)

Figg.30 a/b. Grafico della relazione del perimetro delle cellule XY e XX

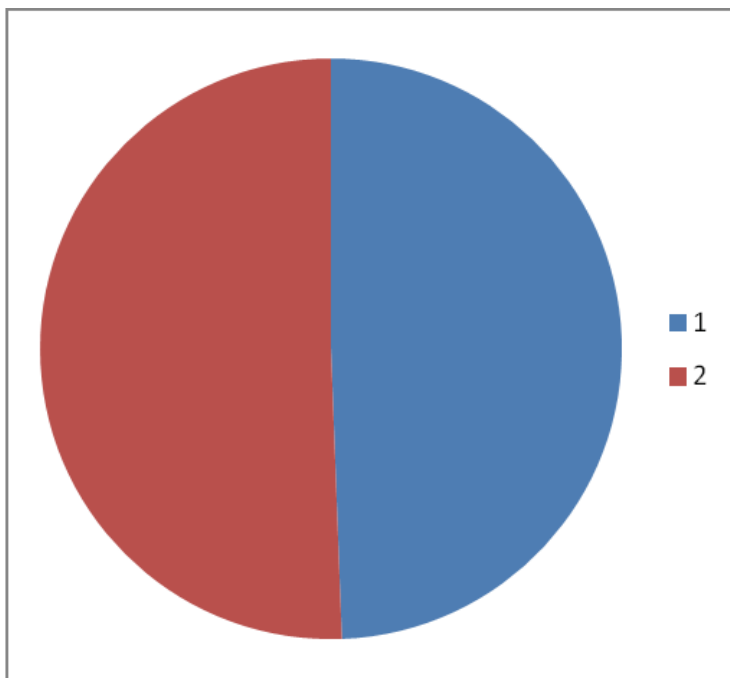
La variazione intervenuta con il trattamento non è abbastanza grande da escludere la possibilità che la differenza è dovuta al caso (P = 0,130).

Potenza di prova eseguita con  $\alpha = 0,050$ :0,202 La potenza del test eseguito (0,202) è al di sotto della potenza desiderata del 0,800.

## AREA CELLULA



Serie1: XY Serie2:XX Fig.31 a



Serie1: XY Serie2:XX

Figg.31 a/b. Grafico della relazione dell'area delle cellule XY e XX

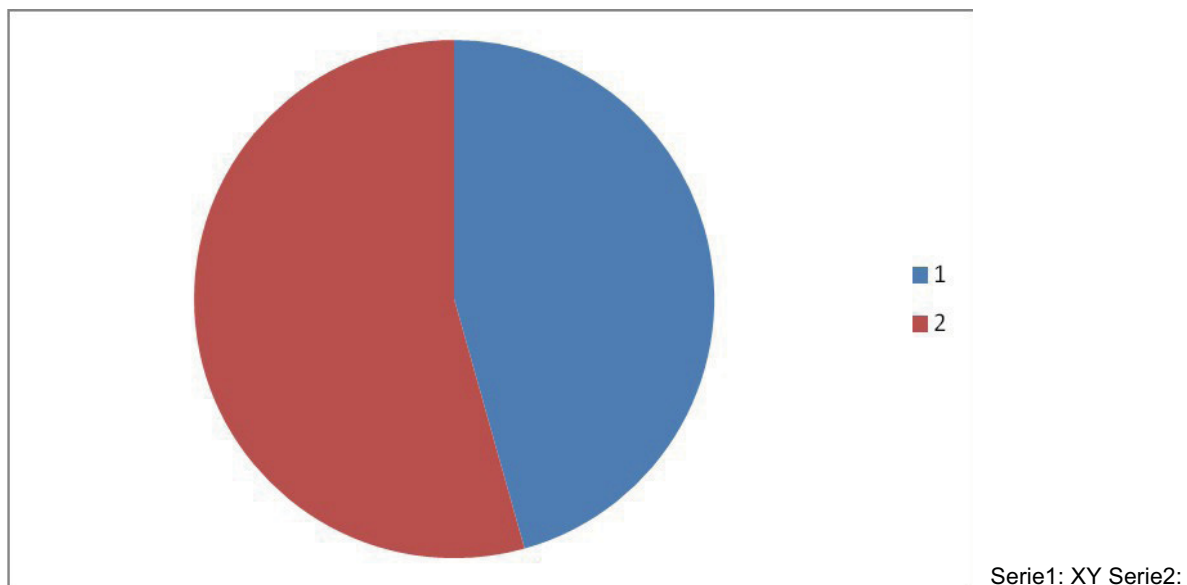
Difference 0,174

t = 0,239 with 38 degrees of freedom. (P = 0,812)

95% confidence interval for difference of means: -1,297 to 1,644

La differenza nei valori medi dei due gruppi non è abbastanza grande da rifiutare la possibilità che la differenza è dovuta alla variabilità campionamento casuale. Non vi è un aumento statisticamente significativo tra i gruppi in ingresso e la differenza ( $P = 0.812$ ). La potenza del test eseguito (0,050) è al di sotto della potenza desiderata del 0,800. Il valore di minore potenza desiderata indica che si hanno meno probabilità di rilevare una differenza quando ne esiste effettivamente. I risultati negativi devono essere interpretati con cautela.

### **PERIMETRO VACUOLI**



XX Fig.32 Grafico della relazione del perimetro dei vacuoli delle cellule XY e XX

**Normality Test:** Passed ( $P = 0,135$ )

$t = -1,857$  with 35 degrees of freedom. ( $P = 0,072$ )

95% intervallo di confidenza per la differenza di mezzi: -50234.779 a 2239.112

La variazione intervenuta con il trattamento non è abbastanza grande da escludere che la differenza è dovuta al caso ( $P = 0,072$ )

Potere della prova eseguita con  $\alpha = 0,050$ : 0315

### **AREA VACUOLI**

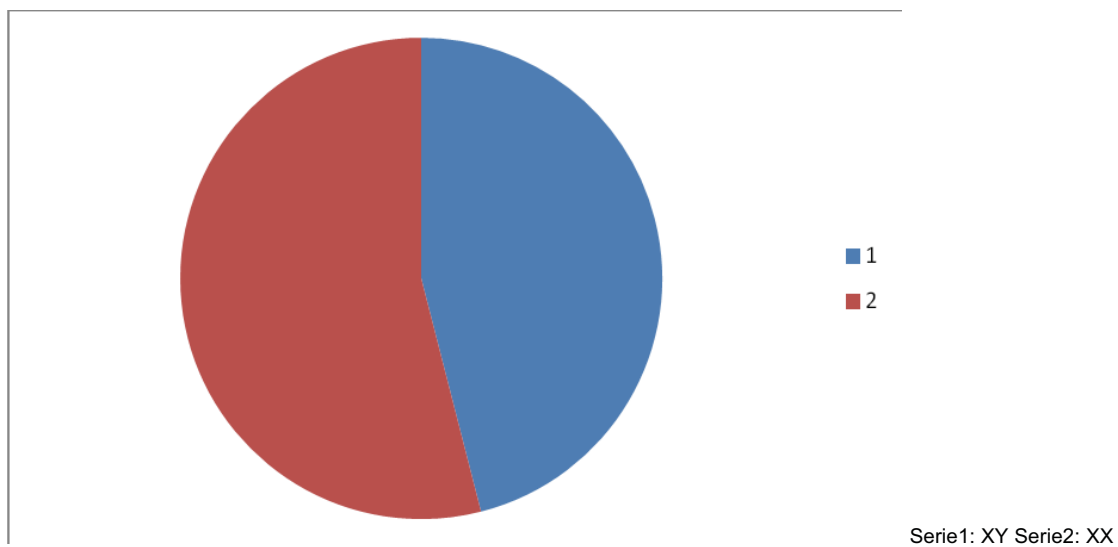


Fig.33. Grafico della relazione dell'area dei vacuoli delle cellule XY e XX

### **Wilcoxon Signed Rank Test**

Il cambiamento che si è verificato con il trattamento non è grande abbastanza per escludere la possibilità che sia dovuto al caso ( $P = 0.138$ ).

## 16) RISULTATI

### ***Differenze e similarità degli amniociti maschili e femminili.***

L'analisi statistica dei risultati delle immagini fotografiche, dopo misurazione con Image J è stata effettuata mediante il software Microsoft Office Excel e SigmaStat 3,5.

### ***Analisi della curva di crescita.***

Per quel che riguarda l'aspetto cellulare si è proceduto analizzando la proliferazione, la dimensione e la forma, nel tempo dei campioni cellulari maschili e femminili.

La proliferazione è stata studiata per dieci giorni ed è stata valutata con una curva di vitalità in tripanblue. Le cellule femminili dimostrano avere una maggiore proliferazione rispetto alle cellule maschili ma la differenza dei valori medi dei due gruppi cellulari maschili e femminili, non è abbastanza grande per rifiutare la possibilità che questa differenza sia dovuta alla variabilità casuale di campionamento ( $P = 0,170$ ).

### ***Analisi al citofluorimetro.***

Il DNA varia a seconda della fase del ciclo in cui si trova. Nella fase G1 delle cellule femminili si ha un picco, la percentuale di cellule in questa fase risulta il 75%. La fase G2 e durante la mitosi il numero cellulare scende al 16% di media dei campioni. Rispetto alle cellule maschili le cellule femminili risentono meno del trattamento con ioduro di propidio, risultando più resistenti alla colorazione e alla metodica applicata per la citofluorimetria.

### ***Analisi Perimetro nucleo***

Il perimetro del nucleo delle cellule femminili risulta essere maggiore di quanto ci si aspetterebbe per caso, rispetto a quello misurato nelle cellule maschili vi è una differenza statisticamente significativa con  $P = 0,036$ .

### ***Analisi area nucleo***

Dall'analisi statistica risulta che anche se l'area dei nuclei femminili è maggiore rispetto all'area dei nuclei maschili il cambiamento che si è verificato con il trattamento non è abbastanza grande da escludere la possibilità che essa è dovuta al caso con  $P = 0.568$ . Risulta il valore della potenza minore rispetto al valore della potenza desiderata. Il valore minore della potenza desiderata indica che si hanno meno probabilità di rilevare una differenza quando ne esiste effettivamente. I risultati negativi quindi devono essere interpretati con cautela e non possiamo dire che certamente questa differenza non esiste.

### ***Analisi perimetro cellula e analisi area cellula***

Il perimetro della cellula maschile risulta dall'analisi statistica essere maggiore rispetto al perimetro della cellula femminile. La variazione intervenuta con il trattamento non è abbastanza grande da escludere la possibilità che la differenza è dovuta al caso ( $P = 0,130$ ).

L'area della cellula femminile risulta essere di poco maggiore rispetto all'area della cellula femminile, questa differenza nei valori medi dei due gruppi non è abbastanza grande da rifiutare la possibilità che la differenza è dovuta alla variabilità campionamento casuale, ( $P = 0.812$ ).

### ***Analisi perimetro vacuoli e analisi area vacuoli***

L'analisi del perimetro dei vacuoli e dell'area dei vacuoli femminile risulta essere maggiore rispetto a quella maschile ma la variazione intervenuta con il trattamento non è abbastanza grande da escludere che la differenza è dovuta al caso ( $P = 0,072$  per il perimetro e  $P = 0.138$  per l'area).

## 17) CONCLUSIONI

Le cellule del liquido amniotico sono state utilizzate in diagnosi prenatale per oltre 70 anni. Si è dimostrato uno strumento di screening sicuro, affidabile e semplice per riconoscere le malattie genetiche (Fairweather D, Eskes T, 1978).

La prima amniocentesi è stata effettuata nel 1930 quando si cercava di correlare l'esame citologico della concentrazione cellulare alla salute del bambino. Da allora lo sviluppo della tecnica dell'amniocentesi eco guidata ha notevolmente aumentato la sicurezza e l'affidabilità di questa procedura come strumento diagnostico (Hoehn H, Salk D. 1982; Crane JP, Cheung SW. 1988).

Le cellule del liquido amniotico possono essere ottenute da una piccola quantità di liquido durante la amniocentesi (Hoehn H. et al. 1975). Kaviani e i suoi colleghi hanno riportato che solo 2 ml di liquido amniotico possono fornire fino a 20 mila cellule l'80% delle quali sono vitali (Kaviani A. et al.2001).

Mentre gli scienziati sono stati in grado di isolare e differenziare solo il 30% di cellule staminali mesenchimali di cordone ombelicale subito dopo la nascita il tasso di successo delle cellule staminali del liquido amniotico è vicino al 100% (Anker PS. et al. 2003). Inoltre per raddoppiare il numero di cellule raccolte dal liquido amniotico ci vogliono dalle 20 alle 24 ore in un tempo minore rispetto alle altre cellule (20-30h per cellule staminali del cordone ombelicale e 30h per le cellule staminali midollari) (Tsai MS. et al 2004).

Questa è una caratteristica importante in condizioni mediche urgenti. Modificazioni e alterazioni della morfologia dell'ultrastruttura è un requisito essenziale per tutti quei processi cellulari come la proliferazione e il danno cellulare. Lo studio delle alterazione genetiche inizialmente nei laboratori è stato condotto grazie alla citogenetica tradizionale: uno studio di tipo morfologico misurando le alterazioni quantitative (del numero) e qualitative (della struttura) dei cromosomi e degli organelli contenuti nel nucleo per i quali è stata per la prima volta effettuata l'associazione tra alterazioni cellulari ed ereditarietà.

Ci sono varie ipotesi sulle cause del differenziamento delle cellule del liquido amniotico. Conklin (Conklin E. G. 1924), ammette un'influenza del nucleo, nei fenomeni differenziativi, oltre all'influenza del citoplasma. Queste interpretazioni vogliono considerare il differenziamento come derivato da localizzazioni germinali assai precoci durante lo sviluppo (Peters, P. Frank Lillie. 2000).

Gli studi condotti fino ad ora sono ancora pochi per poter affermare che esista con certezza un differenza tra cellule maschili e femminili di morfologia strutturale e ultrastrutturale e di proliferazione cellulare.

Complessivamente i dati raccolti in questo studio confermano che esistono differenze sia sesso-genere dipendenti che tessuto dipendenti, e ciò potrebbe richiedere un riesame dei meccanismi molecolari coinvolti in alcune malattie umane in una prospettiva di genere dove tutti quei processi metabolici, differenze strutturali e ultrastrutturali coinvolte nell'omeostasi cellulare rappresentano il più complesso e affascinante punto di partenza per l'attuazione di studi di biologia cellulare nel prossimo futuro.

## 18) BIBLIOGRAFIA

Andrew P. Feinberg, *Nature* 447, 433-440 (24 May 2007) | doi:10.1038/nature05919; 23 May 2007.

Akiva J. Marcus, Dale Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard Woodbury Article first published online: 14 JAN 2008 DOI: 10.1111/j.15824934.2008.00221.

Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation 3. *Blood* 2003; 102(4):1548–1549.

Banchieri E. Il genere e la salute. *Quaderni SIF* 2008;13:1-12.

Barr, M. L., & Bertram, E. G. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163, 676–677 (1949) doi:10.1038/163676a0.

Benjamin R. Cipriany, Paul D. Solowayb, Harold G. Craighead. Real-time analysis and selection of methylated DNA by fluorescence-activated single molecule sorting in a nanofluidic channel; Steven Henikoff, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, April 3, 2012.

Benz R., Biophysical properties of porin pores from mitochondrial outer membrane of eukaryotic cells 15 February 1990, Volume 46, Issue 2, pp 131-137.

Benz, R., Ludwig, O., De Pinto, V., and Palmieri, F., Permeability properties of mitochondrial porins of different eukaryotic cells, in: *Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research*, vol. 1, pp 317-327. Eds Quagliariello et al. Elsevier, Amsterdam 1985.

Blobel, G., and Sabatini, DD, 1971 a, Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells, in: *Biomembranes*, Vol. 2 (LA Manson, ndr.), P.193, Plenum Press, New York.

Carina Dennis. Epigenetics and disease: Altered states. *Nature* 421, 686-688 (13 February 2003) | doi:10.1038/421686a.

Conklin E. G., Cellular differentiation, in *General Cytology* di E. Cowdry, Chicago 1924.

Crane JP, Cheung SW. An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue. *Prenat Diagn* 1988; 8(2):119–129 Waddington C. H., Embryology, Epigenetics and Biogenetics *Nature* 177, 1241 (30 June 1956) | doi:10.1038/1771241a0

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hots MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795–808.

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death. *Cytometry* 1997; 27: 1–20.

David Allis C., Marie-Laure Caparros, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg, Epigenetics, November 6th 2008 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

David D. Sabatini , Gert Kreibich Functional Specialization of Membrane-Bound Ribosomes in Eukaryotic Cells 1976, pp 531-579

Fairweather D, Eskes T, eds. Amniotic Fluid: Research and Clinical Application. New York: Excerpta Medica, 1978

Fauza D., "Amniotic fluid and placental stem cells," Best Practice and Research, vol. 18, no. 6, pp. 877–891, 2004.

Franconi F, Brunelleschi S, Steardo L, Cuomo V. Gender differences in drug responses. Pharmacol Res 2007;55:81-95.

Franconi F., Catastini E., Farmacologia di Genere Flavia Franconi, Simona Montilla, Stefano Vella settembre 2010

Franklin M. Harold, Molecules into Cells: Specifying Spatial Architecture, doi: 10.1128/MMBR.69.4.544-564.2005

Freeman J.A, B.S., M.D. Cellular fine structure 1964 McGraw-Hill

Frey T. Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. Cytometry 1997; 28: 253–263.

Fujimoto KL, Miki T, Liu LJ, Hashizume R, Strom SC, Wagner WR, Keller BB, Tobita K. Naive rat amnion- derived cell transplantation improved left ventricular function and reduced myocardial scar of postinfarcted heart. Cell Transplant. 2009;18:477–486. doi:10.3727/096368909788809785. [PubMed] [Cross Ref]

Gospodarowicz D, Moran JS, Owash ND, Effects of fibroblast growth factor and epidermal growth factor on the rate of growth of amniotic fluid-derived cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1977 **44**:651-659

Heuser, J and MW Kirschner (1980). Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell. Biol.* 86, 212-234.

Hoehn H, Bryant EM, Karp LE, Martin GD, Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential. *Pediat Res* 1974 **8**:746-754

Hoehn H, Salk D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. *Methods Cell Biol* 1982; 26:11–34.

Hou Y, Huang Q, Liu T, Guo L. Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(9):830–839. doi: 10.1093/abbs/40.9.830. [PubMed] [Cross Ref]

Iavarone M, Lampertico P, Seletti C, Francesca Donato M, Ronchi G, Ninno E, Colombo M. The clinical and pathogenic significance of estrogen receptor-beta expression in chronic liver diseases and liver carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 529–34

Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod.*2007;77:577–588. doi: 10.1095/biolreprod.106.055244. [PubMed] [Cross Ref]

Ishii T, Ohsugi K, Nakamura S, Sato K, Hashimoto M, Mikoshiba K, Sakuragawa N. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. *Neurosci Lett.* 1999;268:131–134. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00297-9. [PubMed] [Cross Ref]

Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol.*2000;165:27–34. doi: 10.1006/exnr.2000.7449. [PubMed] [Cross Ref]

Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res.* 2003;980:48– 56. doi: 10.1016/S0006-8993(03)02875-0. [PubMed][Cross Ref]

Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, et al. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg* 2001; 36(11):1662–1665.

Kerr J. B. *Atlante di istologia funzionale*. Edi.Italiana Ziparo E, Filippini A. 2001 Edi. Ambrosiana.

Klemmt P. A., Vafaizadeh V., and Groner B., “The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 11, no. 10, pp. 1297–1314, 2011.

Luchetti F., Canonico B., Biagiarelli L, Bucci L, Valentini M, Papa S. Indagini citofluorimetriche nella vitalità e morte cellulare. I. Necrosi, apoptosi e proliferazione cellulare. *Biochimica Clinica*, 2009, vol. 33.

Lyon, M. F. Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature*190, 372–373 (1961) doi:10.1038/190372a0.

Manifesto del Progetto sulla Medicina di Genere. Un motore equo di sviluppo scientifico ed economico [http://www.iss.it/binary/pres/cont/8\\_giugno\\_manifesto.pdf](http://www.iss.it/binary/pres/cont/8_giugno_manifesto.pdf)

Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, Williams ED, Sievert W.

Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl<sub>4</sub>-treated mice. *Cell Transplant.* 2010;19:1157–1168. doi: 10.3727/096368910X504496. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Marcus AJ, Coyne TM, Rauch J, Woodbury D, Black IB. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation.* 2008;76:130–144. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00194.x. [[PubMed](#)]

Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 2005; 23:1549–1559. doi: 10.1634/stemcells.2004-0357. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Miki T, Marongiu F, Ellis EC, Dorko K, Mitamura K, Ranade A, Gramignoli R, Davila J, Strom SC. Production of hepatocyte-like cells from human amnion. *Methods Mol Biol.* 2009;481:155–168. [[PubMed](#)]

Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, Vaghjiani V, Atienza D, Williams ED, Jenkin G, Wallace E, Trounson A, Manuelpillai U. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:643–651. doi: 10.1164/rccm.201001-0014OC. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Moritoki Y, Ueno Y, Kanno N, Yamagiwa Y, Fukushima K, Gershwin ME, Shimosegawa T. Amniotic epithelial cell-derived cholangiocytes in experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Hepatology Res.* 2007;37:286–294. doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00049.x. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Nakajima T, Enosawa S, Mitani T, Li XK, Suzuki S, Amemiya H, Koiwai O, Sakuragawa N. Cytological examination of rat amniotic epithelial cells and cell transplantation to the liver. *Cell Transplant.* 2001;10:423–427. [[PubMed](#)]

Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation factors that influence neuronal markers expression *in vitro* from human amniotic epithelial cells. *Eur Cell Mater.* 2010;19:22–29. [[PubMed](#)]

Ohnishi S, Murakamai T, Moriyama T, Mitamura K, Imawari M. Androgen and estrogen receptors in hepatocellular carcinoma and in the surrounding noncancerous liver tissue. *Hepatology* 1986; 6: 440–3.

Ohno, S., et al. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Experimental Cell Research* 18 , 415–418 (1959) doi:10.1016/0014-4827(59)90031-X.

Okawa H, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Sato K. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuroreport.* 2001;12:4003–4007. doi: 10.1097/00001756-200112210-00030.

[[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Pappa K. I. and Anagnou N. P., “Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum?” *Regenerative Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 423–433, 2009.

Poot M, Pierce RH. Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1999; 35: 311–317.

Priest RE, Marimuthu KM, Priest JH, Origin of cells in human amniotic fluid cultures. *Lab Invest* 1978 39:106- 109.

Prusa AR, Hengstschlager M, Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit* 2002 8:253-257.

Ray R., N.M. Novotny, et al. (2008). "Sex steroids and stem cell function." *Mol Med* 14(7-8): 493 - 501. Rosati P, Colombo R. *I tessuti*. 1997 Edi. Ermes s.r.l., Milano.

Roubelakis M. G., Pappa K. I., Bitsika V. et al., "Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells," *Stem Cells and Development*, vol. 16, no. 6, pp. 931–951, 2007.

Roubelakis M.G., Bitsika V., Dimitra Zagoura ,Ourania Trohatou , Kalliopi I. Pappa , Manousos Makridakis , Aristidis Antsaklis , Antonia Vlahou , Nicholas P. Anagnou" In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells 28 AUG 2011 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01180.x

Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, Suzuki S. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet*. 2000;45:171–176. doi: 10.1007/s100380050205. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. 1996;209:9–12. doi: 10.1016/0304-3940(96)12599-4. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Shaun M. Kunisakia, b, Myriam Armantc, Grace S. Kaoc, Kristen Stevenson, Haesook Kimd, Dario O. Fauzaa, Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials Journal of Pediatric Surgery Volume 42, Issue 6, June 2007, Pages 974–980

Singer, B.I. 1983. *Yentel the Yeshiva Boy* Farrar, Straus, Giroux.  
Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006;441:1060. doi: 10.1038/nature04954

Stadler G, Hennerbichler S, Lindenmair A, Peterbauer A, Hofer K, van Griensven M, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. Phenotypic shift of human amniotic epithelial cells in culture is associated with reduced osteogenic differentiation in vitro. *Cytotherapy*. 2008;10:743–752. doi:10.1080/14653240802345804. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Szukiewicz D, Pyzlak M, Stangret A, Rongies W, Maslinska D. Decrease in expression of histamine H2 receptors by human amniotic epithelial cells during differentiation into pancreatic beta-like cells. *Inflamm Res.* 2010;59(Suppl 2):S205–207. [[PubMed](#)]

Takahashi N, Enosawa S, Mitani T, Lu H, Suzuki S, Amemiya H, Amano T, Sakuragawa N. Transplantation of amniotic epithelial cells into fetal rat liver by in utero manipulation. *Cell Transplant.* 2002;11:443–449. [[PubMed](#)]

Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct.* 2004;29:73–84. doi: 10.1247/csf.29.73. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Toshio Miki. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2011; 2(3): 25.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol 2. *Hum Reprod* 2004; 19(6):1450–1456.

Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res.*2010;106:1613–1623. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.205260. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)].

Vitale M, Zamai L, Mazzotti G, Cataldi A, Falcieri E. Differential kinetic of propidium iodide uptake in apoptotic and necrotic thymocytes. *Histochemistry* 1993; 100: 223–229.

Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant.* 2003;12:545–552. [[PubMed](#)].

Wing, J. & O'Connor, C. (2008) Sex chromosomes in mammals: X inactivation. *Nature Education*1.

Woodbury D, Kramer BC, Reynolds K, Marcus AJ, Coyne TM, Black IB. Long-term cryopreserved amniocytes retain proliferative capacity and differentiate to ectodermal and mesodermal derivatives *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:1463–1472. doi: 10.1002/mrd.20587. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)].

Zamai L, Canonico B, Lucchetti F, Ferri P, Melloni E, Guidotti L, Cappellini A, Cutroneo G, Vitale M, Papa S, Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells.

Zamai L, Falcieri E, Gobbi P, Santi S, Falconi M, Marhefka G, Vitale M. Anti-BrdUrd labelling of newly synthesized DNA in HL-60 cells triggered to apoptosis. *Cytometry* 1996; 25: 324–332.

Zamai L, Falcieri E, Zauli G, Cataldi A, Vitale M. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry* 1993; 14: 891.