

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE
INDIRIZZO IN GENETICA MEDICA, MALATTIE METABOLICHE E NUTRIGENOMICA
(Ciclo XXVII)

"Studi molecolari sulla plasticità e differenziamento di cellule mesenchimali staminali durante l'invecchiamento in vitro"

Direttore: Prof. Andrea Piana _____

Tutore: Dott.ssa Margherita Maioli _____

Tesi di Dottorato di:
Dott. Giovanni Pigliaru
_____

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

a Charles Darwin, che la selezione non risparmiò!

Sommario

1. INTRODUZIONE 6

1.1 SENESCENZA CELLULARE 6

1.2 INVECCHIAMENTO: tante teorie un'unica certezza! 7

1.2.1 TEORIA DELLA REGOLAZIONE GENICA 7

1.2.2 TEORIA EVOLUZIONISTICA 9

1.2.3 TEORIA DEI RADICALI LIBERI 11

1.2.4 TEORIA DELLA SENESCENZA CELLULARE 14

1.2.5 TEORIA NEUROENDOCRINA 20

1.2.6 TEORIA IMMUNITARIA 22

2. LA SENESCENZA REPLICATIVA.....23

2.1. LE VIE DI CONTROLLO DELLA SENESCENZA REPLICATIVA 26

2.2. SENESCENZA REVERSIBILE O IRREVERIBILE? 27

2.3. PATHWAY P53-P21 29

2.4. PATHWAY RB-$p16^{INK4a}$ 31

2.5 PATHWAYS P53 E P16-RB: CONTROLLORI CONTROLLATI 38

3. FOCUS ON 40

3.1. REAC vs SENESCENZA: GOAL!! 40

3.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI 44

3.3 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI 48

3.3.1. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE 49

3.3.2. ADIPOSE DERIVED HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL 51

3.4 TECNOLOGIA ASMED ITALY 53

3.4.1. LA FISICA DEL B.E.N.E. 53

3.4.2. PROTOCOLLI TERAPEUTICI 55

3.5 DRAFT ESPERIMENTO E TIME COURSE 56

4. MATERIALI E METODI 58

4.1. MATERIALI 58

4.1.1. COMITATO ETICO E MODELLO CELLULARE 58

4.1.2. B.E.N.E. 58

4.2. METODI 59

4.2 ISOLAMENTO E COLTURA DELLE ADhMSCs 59
4.3. CITOFLUORIMETRIA 60
4.4 SAGGIO SA-β-GAL 62
4.5 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE 63
4.6 ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA 64
4.7 IMMUNOBLOTTING ANALYSIS 68
4.8 VALUTAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI 69
4.9 DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO, OSTEOGENICO, VASCULOGENICO 70
4.10 SPSS v.13 76
5. RISULTATI 77
5.1. LA VITALITÀ CELLULARE VIENE INFLUENZATA DAL B.E.N.E. 77
5.2 SENESCENZA, CAPACITÀ DIFFERENZIATIVA E TECNOLOGIA REAC 78
6. CONCLUSIONI 82
7. TAVOLE GRAFICHE 86
8. BIBLIOGRAFIA 97
8.1 LIBRI e TESI DI DOTTORATO 97
8.2 ARTICOLI 97

Indice delle Figure e Tabelle

Figura 1: Schema sulla correlazione tra potenziale replicativo e stress..... 23
Figura 2: Modello Beausejour et al. 27
Figura 3: Ruolo della proteina Rb nella regolazione del checkpoint G1-S d.. 32
Figura 4: Regolazione delle Pathways p53 e p16-Rb 38
Figura 5: Percorsi di differenziamento delle cellule staminali 46
Figura 6: REAC Technology. 53
Figura 7: Formula chimica del colorante Trypan Blue 63
Figura 8: Formula chimica della Alizarin Red S (ARS)..... 72
Figura 9: Test di esclusione del Trypan Blu.. 87
Figura 10: Sa-β-gal lisosomiale. 87
Figura 11: Profili di espressione genica di p16. 88
Figura 12: Profili di espressione genica di $p19^{ARF}$..... 88
Figura 13: Profili di espressione genica di p53..... 89
Figura 14: Profili di espressione genica di p21..... 89
Figura 15: Profili di espressione genica di BMI1. 90
Figura 16: Profili di espressione genica di OCT4..... 90
Figura 17: Profili di espressione genica di SOX2..... 91
Figura 18: Profili di espressione genica di Nanog. 91
Figura 19: Profili di espressione genica di cMyc..... 92
Figura 20: Profili di espressione genica di hTERT..... 92
Figura 21: Western blot Oct4, Sox2 e GAPDH. 93
Figura 22: Analisi della lunghezza dei telomeri. 94
Figura 23: Saggio del RED-Oil-O. 95
Figura 24: Saggio della Alizarin RED-S (ARS). 95
Figura 25: Differenziamento vasculogenico. 96

Tabella 1: Classificazione delle Cellule Staminali.....45
Tabella 2: Caratterizzazione delle hADSC con il FACSCalibur 61
Tabella 3: Primers specifici per i singoli differenziamenti 66

Aim: Recent evidence suggests that ageing-related diseases could result in an accelerated loss of self- renewal capability of adult stem cells, normally involved in replacing damaged cellular elements. In previous works, we highlighted that a specific treatment, named tissue optimization-regenerative (TO-RGN), of radio- electric asymmetric conveyer (REAC) technology, influenced gene expression profiles controlling stem cell differentiation and pluripotency of human skin-derived fibroblasts in vitro. The purpose of the present work was to verify whether TO-RGN may also be effective in counteracting the expression of the senescence marker beta-galactosidase and of senescence-associated gene expression patterning, engaged during prolonged culture of human adipose-derived stem cells (hADSCs). We analyzed the Characterization of hADSCs by flow cytometry Analysis, Adipogenesis, osteogenesis, and vasculogenesis in culture, Gene expression, Immunoblotting analysis and the assessment of telomere length.

Methods: According to the policy approved by the local ethical committee of the University of Bologna (title of approved project: "Assessment of mesenchymal stem cells in human adipose tissue," code number 013/2010/O/Tess, date of approval from the ethical committee: 16 February 2010), all tissue samples were obtained after informed consent. All participants, according to the consent procedure approved by the ethical committee, provided their written consent specifically dedicated to the harvesting of their abdominal fat (50 – 100 mL of lipoaspirate).

Results: TO-RGN treatment remarkably influenced cell viability, as shown by its ability to significantly enhance the number of vital cells as compared to untreated controls. SA- β – Gal staining in hADSCs cultured in the absence or presence of TO-RGN throughout an observation period of 90 days. In the present work, we analyzed the effect of TO-RGN treatment on hADSC senescence in vitro, and demonstrated that this physical treatment, without the aid of viral vectors, was able to counteract biochemical and morphological changes occurring in stem cells during aging.

Conclusion: In the present work, we analysed the effect of TO-RGN treatment on hADSC senescence in vitro, and demonstrated that this physical treatment, without the aid of viral vectors, was able to counteract biochemical and morphological changes occurring in stem cells during aging.

1. INTRODUZIONE

Maynard Smith nel 1962 ha definito l'invecchiamento come un processo che aumenta progressivamente la suscettibilità individuale verso vari fattori che possono causare il decesso (Maynard Smith J. 1962). Questo processo comporta una perdita progressiva di tutte le funzioni fisiologiche, compresa la capacità riproduttiva. D'altra parte, favorendo l'efficacia riproduttiva, la senescenza risulta essere un pilastro fondamentale della selezione naturale (Maynard Smith J. 1962).

Da un punto di vista evolutivo, la caratteristica quasi universale dell'invecchiamento nel regno del vivente, diventa dunque un interessante paradosso. Diverse Teorie evolutive hanno cercato di fornire una soluzione a questo problema, ma qualsiasi ipotesi postulata nel tentativo di rispondere alla domanda 'perché invecchiamo' deve essere periodicamente riesaminata alla luce delle nuove scoperte scientifiche (Nesse 1988).

1.1 SENESCENZA CELLULARE

La senescenza cellulare, o invecchiamento cellulare, rappresenta l'incapacità della cellula nel proliferare ulteriormente (spesso usata come sinonimo di senescenza replicativa) (Hayflick and Moorhead 1961). Essa indica il processo per cui durante la duplicazione cellulare alcune cellule perdono progressivamente la capacità di dividersi (Olovnikov 1971). In altri termini, alcune cellule si possono riprodurre, in condizioni fisiologiche normali, un numero finito di volte (orologio biologico o CPD – Divisioni Cellulari Permesse), e non all'infinito come succede per le cellule staminali embrionali (Hayflick 1965). La senescenza cellulare è anche una delle risposte possibili al danneggiamento irreparabile del DNA (insieme all'apoptosi), dovuto a stress genotossici legati ad esempio all'esposizione a luce

ultravioletta, a specie reattive dell'ossigeno (ROS), a mutageni chimici o biologici (Sherr and McCormick 2002; Collado et al. 2007) nel momento in cui i meccanismi messi in atto dalle cellule per identificare e riparare il danno non abbiano successo (Maser et al. 1997; Paull and Gellert 1999; de Jager et al. 2001; Trujillo and Sung 2001).

1.2 INVECCHIAMENTO: tante teorie un'unica certezza!

The Aging theories

Il concetto dell'invecchiamento inteso come processo multifattoriale complesso ha di fatto sostituito le precedenti teorie "monofattoriali" che consideravano una singola causa come responsabile dell'invecchiamento fisiologico (Kowald and Kirkwood 1996). Non sono state dimostrate con chiarezza le cause scatenanti l'invecchiamento, sebbene sia evidente come i meccanismi che possono interagire simultaneamente operando a diversi livelli di organizzazione funzionale, siano molteplici. Le teorie postulate per spiegare il fenomeno dell'invecchiamento sono numerose, sebbene quelle attualmente più accreditate siano:

a) teoria della regolazione genica;
b) teoria evoluzionistica;
c) teoria dei radicali liberi (RL);
d) teoria della senescenza cellulare;
e) teoria neuroendocrina;
f) teoria immunitaria.

1.2.1 TEORIA DELLA REGOLAZIONE GENICA

La Teoria della regolazione genica della senescenza si basa sull'evidenza che molti geni vanno incontro a modificazioni dell'espressione con l'età e l'invecchiamento (Kanungo 1975) e contribuiscono ad un aumento della longevità (Abbott et al. 1974; Schachter et al. 1993).

A supporto di tale teoria in uno studio sui centenari (Perls et al. 2002b) è stato osservato che la longevità sarebbe l'effetto di fattori genetici, piuttosto che ambientali o socio-economici

(Perls et al. 2002a). Diversi autori supportano l'ipotesi della presenza di geni promotori la longevità posti su un locus (D4S156) del cromosoma 4 che di fatto correlano un eccezionale longevità ad una componente genetica (Puca et al. 2001). Questo dato è suffragato da studi che hanno messo a confronto la longevità all'interno di gruppi familiari appartenenti alla stessa coorte. I fratelli dei centenari avevano una probabilità 4 volte maggiore di sopravvivere a 91 anni, rispetto al gruppo di controllo (Perls et al. 1998). L'assenza di polimorfismi predisponenti verso malattie età-correlate è fondamentale perché si raggiunga una grande longevità (Tomita-Mitchell et al. 1998).

I principali detrattori della Teoria della regolazione genica riportano evidenze sperimentali di una diminuzione della variabilità genetica in età molto avanzate. Secondo i detrattori se la variabilità genetica nello sforzo riproduttivo coinvolge la variabilità genetica nella mortalità, il declino dello sforzo riproduttivo a tarda età dovrebbe portare ad un aumento della variabilità genetica (in senescenza). È stato dimostrato che la variabilità per mortalità e fertilità declina in età avanzata (Snoke and Promislow 2003).

1.2.2 TEORIA EVOLUZIONISTICA

Da quando nel 1899 August Weismann formulò un possibile razionale per spiegare l'invecchiamento, si sono dibattute due opposte ipotesi:

- L'invecchiamento come processo adattativo (ipotesi difesa dallo stesso Weismann): la senescenza è stata selezionata positivamente per limitare la sovrappopolazione delle specie e per assicurare la diversità genetica (Skulachev 2002);
- L'invecchiamento come processo non adattativo: negli anni '50 Medawar ha postulato, sulla base di ipotesi pregresse, che l'invecchiamento è al di fuori della sfera di azione della selezione naturale (Medawar 1952). Questo è dovuto al fatto che la forza di selezione diminuisce con l'avanzare dell'età. In seguito, Williams ha proposto che alcuni geni con effetti pleiotropici favoriscono l'invecchiamento (Williams 1957). Di conseguenza, i loro effetti benefici sul giovane porterebbero verso una selezione positiva, pur essendo essi stessi la causa di effetti nocivi in tarda età. Come risultato, la senescenza sarebbe un effetto collaterale della selezione naturale. Sul finire degli anni '70 anni fu proposta un ulteriore teoria da Thomas Kirkwood, che la chiamò 'disposable soma theory' (DST) (Kirkwood 1977).

  La teoria si basa su tre punti fondamentali: in primis, l'unico scopo delle cellule somatiche è quello di trasmettere i geni alla generazione successiva, ed è il motivo per cui il soma di un organismo può essere considerato 'usa e getta'. In secondo luogo, la riproduzione ha un elevato costo energetico, così come la riparazione e manutenzione dei meccanismi delle funzioni cellulari, necessari per limitare il deterioramento cellulare. Infine, avendo limitate risorse

> energetiche la riproduzione delle cellule e la loro omeostasi tendono a competere per il consumo di energia. Dal momento che, anche con efficienti sistemi di manutenzione, gli organismi muoiono per cause esterne (fame, predatori, incidenti, ecc.), è più redditizio dare priorità agli investimenti energetici per la riproduzione, a discapito dei meccanismi di omeostasi cellulare che diventano così meno efficienti portando l'individuo all'invecchiamento ed alla morte.

Di fatto la teoria evoluzionistica attualmente in auge ipotizza che l'invecchiamento sia la conseguenza di una riduzione dell'energia investita nei processi di manutenzione e riparazione cellulare a vantaggio di una maggior allocazione dell'energia nel garantire l'efficacia riproduttiva. Poiché l'evoluzione agisce in modo da ottimizzare la fitness di una specie, la longevità è un tratto genetico che dovrebbe essere selezionato solo se è a beneficio della riproduzione. La durata della vita sarebbe, pertanto, il risultato di pressioni selettive finalizzate all'incremento delle capacità riproduttive con un ampio grado di flessibilità inter- ed intra- specie. Secondo la teoria evoluzionistica l'invecchiamento è una strategia volta al risparmio energetico in modo da destinare l'energia non utilizzata alla progenie per migliorare la sua sopravvivenza pre-riproduttiva (Zafon 2003). Tale teoria trova sostegno sull'osservazione della malattia di Huntington, o córea di Huntington, una malattia autosomica dominante e neuro degenerativa che colpisce la coordinazione muscolare e porta ad un declino cognitivo ed a problemi psichiatrici (Merideth et al. 2008). Sebbene sia fortemente sfavorevole dal punto di vista selettivo permane nella popolazione (Haldane 1941). L'insorgenza della córea di Huntington in tarda età (35-44 anni) permette al portatore di riprodursi prima di morire, rendendo la malattia non soggetta alla selezione naturale.

1.2.3 TEORIA DEI RADICALI LIBERI

La teoria dei Radicali Liberi (RL) come fattori che determinano l'invecchiamento fu proposta per la prima volta nel 1956 (Harman 1956) e venne in seguito definita Mitochondrial Free Radical Theory of Aging (MFRTA).

La teoria MFRTA si basa su diverse osservazioni (Marnett et al. 1985; Fraga et al. 1990) :

- La produzione mitocondriale di Radical Oxygen Species (ROS) aumenta con l'età a causa di un declino della funzionalità mitocondriale;
- L'attività di numerosi enzimi ROS-scavenging diminuisce con l'età;
- Mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) si accumulano durante l'invecchiamento;
- Le mutazioni somatiche del mtDNA innestano un circolo vizioso perché compromettono la funzione della Catena Respiratoria (RC), che determina a sua volta un'ulteriore aumento della produzione di ROS con conseguente danno ossidativo accumulato a carico di proteine, lipidi e DNA (compreso l'mtDNA).

Sono molteplici i dati che supportano la teoria MFRTA ed il ruolo che riveste un aumentata produzione di ROS e del danno ossidativo in diverse malattie età-associate (Balaban et al. 2005; Grunewald et al. 2010). L'ipotesi dei radicali liberi si basa sull'osservazione che la reattività dei RL non è ereditaria ma è il risultato di un danno cumulativo correlato al tempo. I radicali liberi sono infatti normalmente prodotti nelle cellule viventi, come dimostrato in studi condotti in vivo con la risonanza paramagnetica (Commoner et al. 1954). Il danno ossidativo cellulare è indiscriminato. Sono evidenti modificazioni in senso ossidativo di molecole di DNA, proteine e lipidi (Mehlhorn 2003) ad ogni livello di complessità dell'organismo invecchiato (Beckman and Ames 1998).

La base della Teoria dei RL è che tutti gli organismi vivono in un ambiente contenente ROS (Commoner et al. 1954). In particolare gli eucarioti aerobi nei quali la respirazione mitocondriale, che è alla base della produzione d'energia, genera ROS per fuoriuscita di intermedi dalla catena di trasporto degli elettroni (Finkel and Holbrook 2000). La natura universale dei RL ossidati è sottolineata anche dalla presenza di un enzima ubiquitario negli organismi aerobi, la Superossido Dismutasi (SOD), che dismuta l'anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare, svolgendo un ruolo chiave nei meccanismi di difesa cellulari dai radicali tossici dell'ossigeno (ROS) (Castellano 2006) e nell'invecchiamento (Halliwell and Gutteridge 1988). L'isolamento e la caratterizzazione di SOD anche da organismi anaerobi (Hatchikian and Henry 1977) fanno ritenere che le SOD siano enzimi con una funzione essenziale per l'evoluzione della respirazione aerobia a partire da un'antica forma di vita insensibile all'ossigeno. La produzione ed il destino delle ROS a livello dei tessuti dipende dall'equilibrio totale tra ossidazione e riduzione a livello cellulare. Le SOD generando il perossido di idrogeno (H_2O_2), normalmente trasformato in H_2O mediante reazione enzimatica catalizzata da una catalasi o dalla glutatione perossidasi, regolano tale equilibrio. Quando la produzione di anione superossido (O_2^-) o di H_2O_2 è tale da saturare completamente la capacità riduttiva, rispettivamente, delle SOD o della glutatione perossidasi, essi divengono il substrato per la formazione di molecole ad alto potenziale ossidante (attraverso la reazione di Fenton, in presenza di ferro bivalente, e/o di Haber-Weiss), responsabili di danno cellulare e tissutale. L'importanza della trasformazione del perossido di idrogeno è dovuta alla sua caratteristica di diffondere attraverso le membrane cellulari agendo in sedi più distanti (Byrne et al. 2003). Al contrario la capacità di diffusione della maggior parte delle ROS è limitata dalla loro insolubilità lipidica, e

pertanto la loro azione è generalmente confinata al compartimento intracellulare di produzione.

Secondo la teoria dei RL la produzione mitocondriale di ROS (che avviene principalmente ad opera della catena respiratoria a livello dei complessi I e II) controlla la velocità d'invecchiamento. E' stato dimostrato come disfunzioni mitocondriali (ad esempio mutazioni dell'mtDNA o disfunzioni nella catena respiratoria) causino un aumento del fenotipo progeroide nel topo (Bratic and Larsson 2013).

Sebbene sia assodato che il danno ossidativo si accumula con l'invecchiamento, non è chiaro se questo processo contribuisca all'invecchiamento in tutti gli organismi (Finkel and Holbrook 2000).

Recentemente, l'ipotesi che i ROS generati dai mitocondri giochino un ruolo nell'invecchiamento organico è stata direttamente testata sia in sistemi di modelli di invertebrati sia di mammiferi; vi sono evidenze che il trattamento con antiossidanti protegga contro il declino funzionale età-correlato, anche per quanto riguarda il deficit cognitivo (Golden et al. 2002).

La restrizione calorica è, per esempio, un intervento che prolunga la durata di vita di quasi tutti gli organismi in cui è stata attuata. In esperimenti in vitro condotti su preparazioni mitocondriali isolate ed estratte da roditori sottoposti a regime di restrizione calorica si è osservata una riduzione della genesi di ROS con attenuazione dell'accumulo di danno ossidativo (Merry 2002). In tal senso, la teoria dei RL può fornire un'affascinante spiegazione degli effetti pro-longevità osservati con la restrizione calorica (il ridotto introito calorico riduce il metabolismo e la produzione di ROS).

1.2.4 TEORIA DELLA SENESCENZA CELLULARE

Nel 1965 Hayflick descrisse la senescenza cellulare come il processo che limita il numero di divisioni cellulari normali che possono avvenire in coltura (Hayflick 1965). Egli osservò che fibroblasti umani in coltura smettevano di proliferare dopo circa 50 divisioni. Questo "limite nella capacità replicativa" si realizza dopo un caratteristico numero di divisioni cellulari (Hayflick limit) e può verificarsi anche in risposta a diversi eventi molecolari (Campisi 2003). L'assunto è che ogni tipo di cellula ha un limite intrinsecamente fissato del potenziale replicativo.

Una delle ipotesi formulate per descrivere le cause della senescenza cellulare è che un progressivo accorciamento dei telomeri durante la replicazione agisca come orologio interno, in accordo con quanto descritto da Hayflick, determinando il numero di divisioni che la cellula può avere nel corso della propria vita (Olovnikov 1971).

La perdita della funzionalità dei telomeri (Blackburn 2000) non sarebbe pertanto solo responsabile della senescenza cellulare ma sarebbe anche l'orologio molecolare che determina il numero di cicli di divisione cellulare (Wright and Shay 2001).

L'esistenza dei telomeri fu dimostrata negli studi genetici condotti da Hermann Muller nel 1938 che esponendo ai raggi X la Drosophila melanogaster osservò come le estremità dei cromosomi irradiati, al contrario del restante genoma, non presentavano alterazioni come delezioni od inversioni grazie alla presenza di un 'cappuccio' protettivo definito inizialmente "gene terminale" (Meier and Muller 1938). Due anni più tardi Barbara McClintock confermò con i suoi studi genetici sulla Zea mays quanto descritto da Muller, osservando che le estremità dei cromosomi sono incapsulate da una struttura speciale definita appunto telomero dal greco "telos" (fine) e "meros" (parte), con funzione protettiva. Tale struttura previene la fusione end-to-end e la formazione di cromosomi ad anello o dicentrici (McClintock 1941).

1.2.4.1. Telomeri e senescenza

Il telomero è costituito da regioni ripetute di DNA posizionate al terminale di ogni cromosoma ed associate a proteine con funzione di protezione delle terminazioni lineari (de Lange et al. 1990). La lunghezza delle sequenze telomeriche nelle cellule somatiche varia a seconda del numero di divisioni cellulari che una cellula ha subito (Samassekou et al. 2010). Nell'uomo la sequenza ripetuta nei telomeri è composta di sei nucleotidi $(5'\text{-}TTAGGG\text{-}3')_n$ ripetuti in tandem per una lunghezza che va da 3 a 20 chilobasi (kb) (Moyzis et al. 1988). Sono presenti 100-300 kb addizionali di ripetizioni telomero-associate, che si dispongono tra il telomero ed il resto del cromosoma (Moyzis et al. 1988).

La struttura telomerica assume la conformazione a 'cappuccio' a causa del filamento 3' che essendo ricco di G (G-strand) sporge per circa 35-600 nucleotidi (Makarov et al. 1997) e si ripiega su se stesso, legandosi con la sequenza complementare al 5' dell'altro filamento, ricco in C (C-strand) (Stewart et al. 2003). La struttura a cappuccio, o t-loop (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007) è coniugata ad un complesso di sei proteine, denominato shelterin (de Lange 2005) che svolge tre funzioni fondamentali nel meccanismo di regolazione della lunghezza e della struttura dei telomeri: determinano la struttura dell'estremità del telomero; sono implicate nella generazione e nella stabilizzazione del t-loop; controllano la sintesi del DNA telomerico (de Lange 2009) regolando l'accesso della telomerasi sui telomeri stessi attraverso un meccanismo di feedback negativo che agisce in cis (Smogorzewska and de Lange 2004).

Inizialmente si riteneva che i telomeri fossero regioni non codificanti, ma recenti scoperte hanno dimostrato che producono trascritti RNAs (TERRA). Sequenze contenenti ripetizioni di UUAGGG che formano strutture a filamenti paralleli G-quadruplex probabilmente implicate nella regolazione della telomerasi (Martadinata and Phan 2013).

Il telomero ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni (Blackburn 2000) durante la duplicazione dei cromosomi, poiché la DNA polimerasi non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione a causa del problema della replicazione terminale (Watson 1972).

L'importanza dell'integrità del telomero è dimostrata dal fatto che una disfunzione telomerica innesca la classica risposta di danno al DNA. Il DNA Damage Response (DDR) innescato (uno dei processi di riparazione del DNA che sono raggruppati come Double-Strand Break DSB), ha come risposta l'arresto cellulare o un eventuale riparazione se questa è possibile (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

In letteratura è descritto come la rigenerazione dei telomeri previene la senescenza ed immortalizza colture di cellule primarie (Bodnar et al. 1998).

1.2.4.2. Telomerasi: elisir di lunga vita

L'estensione dei telomeri avviene grazie all'enzima telomerasi, scoperto per la prima volta nel 1989 in Tetrahymena *thermophila*, un protozoo ciliato che a differenza degli altri organismi eucarioti ha in aggiunta ad un micronucleo contenente cromosomi normali, un macronucleo contenente cromosomi frammentati in porzioni di DNA contenenti i geni codificanti per l'RNA ribosomiale (Greider and Blackburn 1989). La telomerasi rappresenta una classe di retrotrascrittasi specializzate che utilizzano un filamento di RNA, che è parte integrante dell'enzima stesso, per aggiungere ripetizioni ricche di timina e guanina alla porzione terminale 3' del filamento cromosomico (Greider and Blackburn 1985).

Le telomerasi sono presenti in numerosi organismi (tra cui l'uomo), ma non in tutti e, soprattutto, non in tutte le fasi dello sviluppo. In particolare nell'uomo le telomerasi (così come nella maggior parte degli eucarioti multicellulari) sono attive solo nelle cellule della

linea germinale o anche in cellule immortali specializzate (staminali e linfociti T), che conservano pertanto telomeri lunghi o ne ritardano il deterioramento (Wright et al. 1996).

Nel 1989 è stato osservato per la prima volta (Greider and Blackburn 1989) come anche le cellule neoplastiche attivano le telomerasi (Wai 2004) o una via alternativa di allungamento del telomero, al fine di evitare la senescenza replicativa (Kim et al. 1994).

La necessità della telomerasi per raggiungere l'immortalità cellulare, associata all'osservazione che i telomeri si accorciano con l'età, ha portato ad ipotizzare che la lunghezza del telomero regoli la durata di vita replicativa della cellula in vivo, e contribuisca all'invecchiamento.

1.2.4.2. Ipotesi associate alla teoria della senescenza cellulare:

- Ipotesi dell'età del donatore:

diversi esperimenti in vitro hanno mostrato una correlazione tra longevità della prole ed età dei genitori al momento del concepimento, quindi tra potenziale replicativo ed età del donatore (Gavrilov et al. 1997). Infatti se la perdita e/o l'aumento della sequenza ripetitiva dei telomeri è identica in tutti gli individui di una stessa specie (Slagboom et al. 1994) durante la vita prenatale e postnatale, la lunghezza e l'integrità dei telomeri al momento del concepimento (telomeri nella cellula ovocita e spermatozoo) ne determina di fatto la lunghezza nelle cellule dello zigote.

La longevità della progenie dipenderebbe, di conseguenza, dalla longevità dei genitori e dalla loro età all'atto del concepimento.

Basandosi sulla teoria dell'invecchiamento correlato con i telomeri, Manestar-Blazic ha suggerito che la longevità della progenie è direttamente proporzionale alla lunghezza del telomero ed inversamente proporzionale al suo grado di integrità nello spermatozoo e nell'ovocita al momento del concepimento (Manestar-Blazic 2004). Queste due caratteristiche dei telomeri dipendono dall'età dei genitori. Durante la vita si ha infatti un accumulo delle mutazioni nel DNA e di conseguenza nei telomeri. I telomeri sono più lunghi nelle cellule germinali (Allsopp et al. 1992) rispetto alle cellule somatiche con il risultato di un minor numero di mutazioni nella parte terminale dei telomeri ed un maggior numero nella parte centrale che causano una più rapida perdita di sequenze ripetitive. Al momento del concepimento lo stato e l'integrità del telomero dei donatori non cambia e queste mutazioni sono trasmesse alla progenie. Secondo Manestar-Blazic, alla luce di quanto rilevato, vi potrebbe essere un'età ideale dei genitori per la trasmissione della longevità massima. In modo analogo, la diversa

longevità degli uomini e delle donne potrebbe parzialmente essere il risultato di differenti dinamiche dei telomeri dei cromosomi sessuali. Altri esperimenti (Rubin 2002) hanno sollevato notevoli dubbi su tali osservazioni e sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire questa divergenza di dati (Wright and Shay 2002).

- Ipotesi della disfunzione mitocondriale associata alla senescenza:

L'ipotesi trae le sue fondamenta da esperimenti condotti su lieviti, che hanno suggerito come l'alterazione dei ribosomi mitocondriali potrebbe essere una fonte potenziale di disfunzione mitocondriale età – correlata (Hipkiss 2003). E' stato osservato come le funzioni mitocondriali declinino durante l'invecchiamento con apparenti modifiche morfologiche degli organuli che appaiono più arrotondati (Shigenaga et al. 1994).

Aumentando sperimentalmente l'accuratezza dei ribosomi mitocondriali aumenta la durata di vita cellulare (Hipkiss 2003). Mutazioni nel DNA mitocondriale (mtDNA) e disfunzioni nella catena respiratoria accompagnano il normale invecchiamento, ma la prima prova sperimentale che un aumentato livello di mutazione del mtDNA contribuisce al fenotipo progeroide è da attribuirsi ad esperimenti condotti sui topi (Trifunovic et al. 2004);

- Ipotesi della senescenza indotta da stress:

L'ipotesi postula che l'invecchiamento sia la risposta fisiologica a vari elementi di stress quali: presenza di forti segnali mitogeni, danni da radiazione del DNA, espressione di oncogeni (Campisi 2003). In pratica le cellule che esprimono i marcatori di stress si accumulano con l'avanzare dell'età in molti tessuti (Dimri et al. 1995).

1.2.5 TEORIA NEUROENDOCRINA

Secondo la teoria ormonale (neuroendocrina) l'invecchiamento è regolato principalmente dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) che coordina le risposte fisiologiche necessarie per il mantenimento dell'omeostasi interna in risposta a continui cambiamenti ambientali (Cannon 1932). Gli ormoni dell'asse HPA sono coinvolti nel signaling attraverso la ben documentata pathway GH/IGF-1/PI3K/Akt/cervello che regola la longevità (Spong 2010). L'esposizione cronica a stress di varia natura può esaurire o danneggiare questa capacità di adattamento (Selye 1976) e portare ad una riduzione della responsività simpatica (Udelsman et al. 1993). Il Sistema nervoso centrale (SNC) integrerebbe i segnali provenienti da fattori ambientali e dalla dieta (teoria della restrizione calorica) e attraverso segnali endocrini attiverebbe rispettivamente la riproduzione e/o fattori pro-invecchiamento (Tatar et al. 2003).

La durata della vita sarebbe dunque regolata da segnali nervosi ed endocrini sequenziali (Timiras 2003), in un continuo equilibrio tra promotori ed inibitori dello sviluppo e dell'invecchiamento in costante cambiamento (Geraert 2004). Un esempio di questo effetto pleiotropico è stato dimostrato da Baudry nel 1986 con uno studio sulle calpaine (Baudry et al. 1986). Questa è una famiglia di proteasi neutre Ca^{2+}-dipendenti presenti in numerosi tipi cellulari ed implicate in un'ampia serie di funzioni cellulari (apoptosi, proliferazione e migrazione cellulare) (Murachi et al. 1980). È stata dimostrata una correlazione inversa tra l'attività della calpaina coinvolta nello stabilire l'organizzazione sinaptica, la plasticità ed il potenziamento a lungo termine, e la dimensione cerebrale, ed una correlazione diretta tra dimensioni cerebrali e longevità (Hofman 1983).

In pratica è stato osservato come l'attività della calpaina aumenta nel cervello senile, probabilmente come conseguenza di un deterioramento dei meccanismi inibitori,

determinando lo sviluppo di patologie età-correlate a carico di rene, cuore, tessuto connettivo, occhio, così come in miopatie, morbo di Alzheimer e molte risposte degenerative allo stress (Croall and DeMartino 1991).

Questo aumento dell'attività sembra portare a distruzione di proteine importanti per la stabilità ed il mantenimento di network neuronali (Vanderklish and Bahr 2000) avvallando di fatto quanto ipotizzato da Baudry ovvero che l'attività della calpaina sarebbe anche inversamente correlata alla massima durata di vita (Baudry et al. 1986).

Altro esempio di effetto pleiotropico è quello descritto da alcuni autori (teoria dell'invecchiamento del ciclo cellulare riproduttivo) secondo i quali la senescenza è il risultato dell'azione di ormoni che regolano la riproduzione agendo in maniera antagonistica attraverso il signaling del ciclo cellulare: in un primo momento essi promuovono la crescita e lo sviluppo precoce al fine di massimizzare lo sforzo riproduttivo, più tardivamente vanno incontro a disregolazione e portano a senescenza (Bowen and Atwood 2004).

La teoria neuroendocrina è stata recentemente supportata da studi sul nematode *Caenorhabditis elegans* che dimostrano l'interazione tra una via ancestrale dell'insulina (primordiale sistema neuroendocrino) che controlla le risposte allo stress e la longevità. Mutazioni di una serie di geni in questa via portano ad aumentata longevità (Kawano et al. 2000).

1.2.6 TEORIA IMMUNITARIA

La teoria auto immunitaria o immunologica dell'invecchiamento fu proposta più di 40 anni fa da Roy Walford (Walford 1964). La teoria suggerisce che il normale processo d'invecchiamento nell'uomo e negli animali sia un generalizzato fenomeno auto-immune (Franceschi et al. 2000) e sia patogeneticamente correlato a processi immunologici sbagliati (senescenza dei linfociti T) (Effros 2004).

Una prova indiretta della veridicità della Teoria è nell'evidenza che le attività di molti tipi di linfociti (killer naturali e cellule dendritiche, macrofagi) ed il sistema del complemento, sono ben preservate nei centenari sani (Franceschi et al. 1995).

In un recente studio longitudinale condotto sulla popolazione geriatrica svedese è stato evidenziato come la combinazione di elevati livelli di linfociti CD8 del sangue periferico (PBL), con una diminuzione di CD4 PBL, ed una scarsa risposta proliferativa alla stimolazione mitogenica sia associata ad un aumento della mortalità di 2 anni (Wikby et al. 2002). Queste caratteristiche definiscono il così detto "fenotipo immunologico a rischio" (Pawelec et al. 2003). Inoltre, è sempre più evidente che molte delle malattie definite età-correlate (ad esempio pazienti con malattia di Alzheimer) siano anche associate a disfunzione del sistema immunitario ed eccessiva infiammazione (Panossian et al. 2003).

2. LA SENESCENZA REPLICATIVA

La senescenza cellulare fu descritta per la prima volta da Hayflick e Moorfield che osservarono come colture di fibroblasti umani avevano un potenziale replicativo limitato che finiva per arrestarsi irreversibilmente (Hayflick and Moorhead 1961; Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Questo potenziale replicativo è correlato con la risposta a stimoli stressori e danni derivati da fonti esogene ed endogene, cui sono costantemente soggette le cellule (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007), al loro background genetico ed all'età (Campisi 1997) (***Figura 1***). La maggior parte delle cellule in senescenza assumono un caratteristico fenotipo (Blackburn 2001; Shay and Wright 2001; Kim Sh et al. 2002) apparendo tipicamente appiattite ed allargate, plurinucleate o con nuclei ingranditi, con un citoplasma vacuolato e l'apparato del Golgi prominente (Gonos 1998).

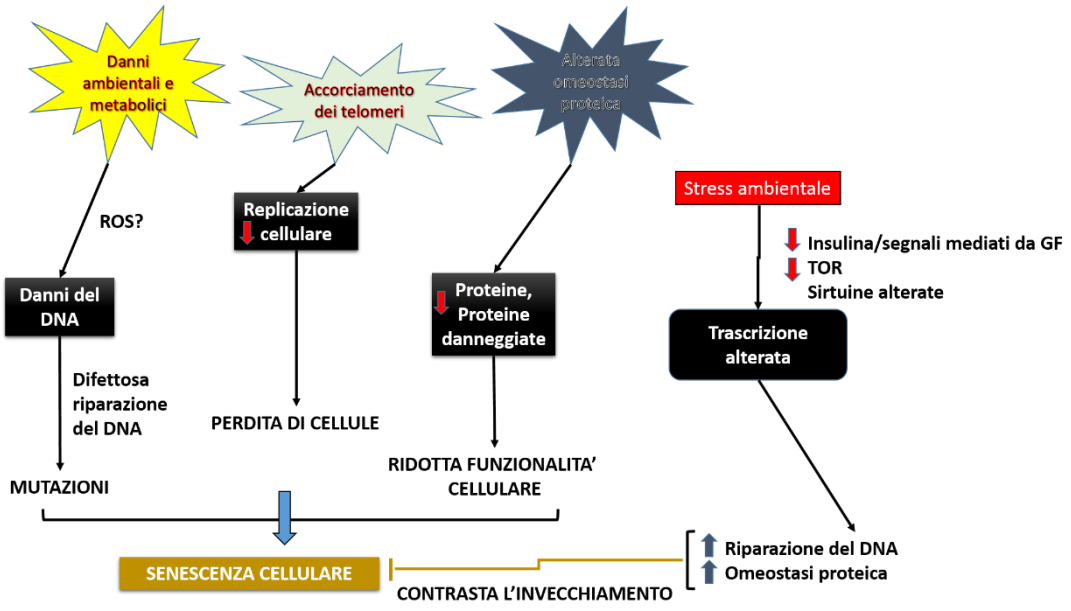


Figura 1: Il potenziale replicativo è correlato con la risposta a stress e danni da fonti esogene ed endogene cui sono soggette le cellule

I cambiamenti morfologici sono in relazione con un gran numero di fenotipi molecolari, come cambi di espressione genica e riorganizzazione della cromatina (Gonos et al. 1998; Shelton et al. 1999; Schwarze et al. 2002; Zdanov et al. 2006) e con un accumulo di alti livelli di proteine nel citoplasma e nel nucleo (De Cecco et al. 2011). Le cellule in senescenza replicativa sono bloccate soprattutto in fase G1 (Pignolo et al. 1998).

Sebbene in vitro l'arresto della crescita delle singole cellule è rapido, spesso entro la durata di un ciclo cellulare, in coltura l'arresto è tipicamente asincrono con un aumento proporzionale delle cellule in senescenza nel corso di un periodo di diverse settimane (Herbig et al. 2003; Herbig et al. 2004). Le cellule senescenti mantengono inoltre l'attività metabolica potendo rimanere vitali per lunghi periodi (Matsumura et al. 1979; Pignolo et al. 1994). Probabilmente una componente importante di questa elevata stabilità in coltura può essere la capacità delle cellule senescenti di resistere all'apoptosi (Matsumura et al. 1979; Marcotte et al. 2004; Hampel et al. 2005).

La relazione tra il numero di divisioni cellulari e l'insorgenza della senescenza è stata messa in evidenza dai primi studi condotti in vitro, ed ha portato a formulare l'ipotesi che la senescenza replicativa possa contribuire a sviluppare fenotipi progeroidi in vivo (Hayflick 1985). Questa ipotesi è stata avvalorata da studi condotti sulla differente velocità di replicazione delle cellule espiantate da donatori anziani (velocità minore) rispetto a donatori giovani (Martin et al. 1970; Le Guilly et al. 1973; Rheinwald and Green 1975; Schneider and Mitsui 1976; Bruce et al. 1986).

Il meccanismo dell'orologio molecolare caratteristico di ciascuna linea cellulare che determina il blocco della replicazione è fornito dal graduale deterioramento dei telomeri (Harley et al. 1990; Bodnar et al. 1998). In funzione di questo, inizialmente fu proposto di riservare il termine 'senescenza replicativa' solo per quei fenomeni basati su di un

meccanismo equiparabile all'orologio molecolare, in altri termini ad un ampia varietà di stimoli di stress che inducono l'arresto temporaneo o 'stasis' della crescita cellulare (Drayton and Peters 2002; Wright and Shay 2002). Recentemente il termine 'senescenza cellulare' è stato invece usato per descrivere l'arresto irreversibile del ciclo cellulare, indotto da molteplici stimoli esogeni ed endogeni (Collado et al. 2007).

È importante sottolineare come l'orologio intrinseco della capacità replicativa cellulare possa essere significativamente alterato da fattori estrinseci, come ad esempio dai ROS che accelerano la velocità di accorciamento dei telomeri (von Zglinicki 2002). Anche se le cellule senescenti presentano una serie di fenotipi che le discriminano da quelle quiescenti, è stato suggerito, per la natura del fenomeno, che la senescenza si possa considerare come una forma terminale di differenziamento (Bayreuther et al. 1988; Seshadri and Campisi 1990).

Il risultato della senescenza cellulare è l'arresto della proliferazione, questo determina la sua potenzialità di onco-soppressoria (Sager 1991; Reddel 2000; Campisi et al. 2001; Wright and Shay 2001). Dati recenti hanno dimostrato che la senescenza cellulare rappresenta anche in vivo un importante meccanismo onco soppressore in un'ampia varietà di tessuti umani e di topo (Braig et al. 2005; Chen et al. 2005; Collado et al. 2005; Ventura et al. 2007a; Xue et al. 2007).

2.1. LE VIE DI CONTROLLO DELLA SENESCENZA REPLICATIVA

I molteplici stimoli cui sono soggette le cellule possono indurre come risposta due grandi categorie di senescenza replicativa (Jeyapalan and Sedivy 2008). La prima è innescata da disfunzioni telomeriche od altre forme di stress genotossico che inducono la risposta al danno del DNA mediata primariamente dalla pathway dell'oncosoppressore p53 (d'Adda di Fagagna et al. 2003; Herbig et al. 2004).

La seconda può essere indotta da diverse fonti di stress ma non è necessariamente correlata con un danneggiamento dei telomeri o del DNA, ed è caratterizzata da una up-regolazione del gene *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A $p16^{INK4a}$) (Nobori et al. 1994; Stone et al. 1995; Jeyapalan and Sedivy 2008). Alcuni segnali (oncogene Ras) possono innescare entrambe le pathways. La distinzione tra le due categorie è in realtà complicata dal fatto che l'oncosoppressore $p16^{INK4a}$ è up-regolato da una grande varietà di stimoli stressori incluse alcune forme di danno genotossico (Jeyapalan and Sedivy 2008).

L'attivazione delle pathways P53-P21 / RB-$P16^{INK4a}$ è dunque essenziale per l'induzione della senescenza replicativa in diverse linee cellulari umane, interferendo con la progressione del ciclo cellulare o determinandone in maniera indipendente un suo arresto (Jeyapalan and Sedivy 2008).

2.2. SENESCENZA REVERSIBILE O IRREVERIBILE?

Schema introduttivo delle principali Pathways responsabili dell'arresto della crescita cellulare e della senescenza replicativa

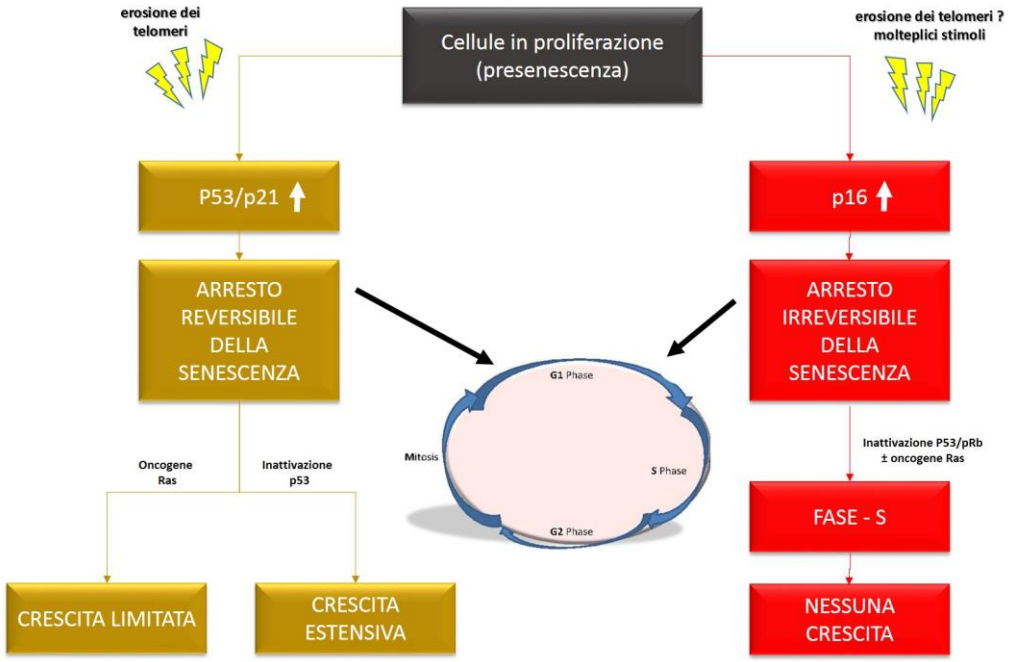


Figura 2: Il modello presentato è sviluppato su quello proposto da Beausejour et al. sulla base di studi condotti in vitro su fibroblasti umani (Beausejour et al. 2003).

Cellule umane in proliferazione (Presenescenza) possono arrestare la loro crescita e presentare il fenotipo senescente (***Figura 2***) in seguito all'attivazione della pathway p53 in risposta all'accorciamento dei telomeri (Atadja et al. 1995; Gire and Wynford-Thomas 1998; Rubbi and Milner 2003), oppure per attivazione della pathway $p16^{INK4a}$ in riposta ad una combinazione di stimoli stressori non ancora ben identificati o all'accorciamento dei telomeri (Wright and Shay 2001; Itahana et al. 2003). L'arresto della proliferazione mediato da p53 aumenta l'espressione di $p21^{WAF1}$ (Sherr and Roberts 1999) e può essere reso reversibile per inattivazione di p53 o per azione dell'oncogene Ras (Beausejour et al. 2003). L'inattivazione di p53 si traduce in un estensiva proliferazione che culmina in una crisi (stato caratterizzato da instabilità genomica) e morte cellulare con un eventuale emergere di varianti replicative immortali (Shay et al. 1993; Wei and Sedivy 1999). L'oncogene Ras (Ha-RASv12) (Shih and Weinberg 1982) delle proteine MAPK-signaling fornisce invece un

forte segnale mitogenico che induce una proliferazione cellulare limitata (Beausejour et al. 2003) ed immortalizza le cellule (Land et al. 1983).

Le cellule che invece entrano in senescenza per l'espressione di alti livelli di $p16^{INK4a}$ possono essere stimolate a sintetizzare DNA (fase-S del ciclo cellulare) per disattivazione della p53 e della proteina del retinoblastoma (pRb) oppure per disattivazione di pRb ed azione dell'oncogene Ras. Nonostante l'ingresso in fase S del ciclo cellulare le cellule non proliferano e l'arresto della senescenza risulta irreversibile nonostante vengano stimolate da mitogeni fisiologici.

2.3. PATHWAY P53-P21

Il fattore di trascrizione ed onco-soppressore p53 è spesso definito come il 'guardiano del genoma' ed è un regolatore critico della sopravvivenza cellulare in risposta a segnali di stress come danneggiamenti del DNA, attivazione di oncogeni, ipossia e infezioni virali (Rubbi and Milner 2003). In assenza di stimoli di stress la p53 viene rapidamente ubiquitinizzata da una delle numerose ligasi E3 che includono MDM2, MDM4, TOPORS, COP1 ed ARF-BP1 e successivamente degradata nel proteosoma (Haupt et al. 1997; Lee and Gu 2010). I segnali di stress invece inducono modificazioni covalenti che rompono l'interazione tra la p53 e l'ubiquitina ligasi E3 prevenendone la degradazione. Lo stress oncogenico, ad esempio, attiva l'espressione di $p14^{ARF}$, prodotto alternativo del locus INK4a, che stabilizza p53 legando ed inibendo il suo regolatore negativo MDM2. Molte evidenze sperimentali dimostrano il cruciale ruolo svolto da p53 e dal suo effettore a valle $p21^{WAF1}$ nella regolazione dell'arresto del ciclo cellulare e senescenza (Beausejour et al. 2003). La sovraespressione di p53 e $p21^{WAF1}$ può indurre in maniera autonoma la senescenza in cellule umane (Brown et al. 1997; Wang et al. 1998; Wang et al. 1999). Allo stesso modo l'inattivazione della p53 o della $p19^{ARF}$ (omologo murino della $p14^{ARF}$ umana) previene la senescenza in fibroblasti embrionali di topo (MEF) (Harvey and Levine 1991; Kamijo et al. 1999) e umani ed anche la mancanza di $p21^{WAF1}$ può avere gli stessi effetti (Brown et al. 1997).

Tuttavia sebbene l'inattivazione della pathway p53 possa addirittura, in alcune linee cellulari, invertire l'arresto del ciclo cellulare e di conseguenza la senescenza, vi sono sempre maggiori evidenze che questa reversibilità non è possibile quanto viene attivata la pathway Rb-$p16^{INK4a}$ (Sakamoto et al. 1993; Beausejour et al. 2003; Haferkamp et al. 2009).

Nonostante sia assodato il ruolo di p53 nella promozione della senescenza cellulare in risposta a numerosi stimoli esogeni ed endogeni, un recente studio condotto da Demidenko ha suggerito che le funzioni di p53 di arresto del ciclo cellulare e induzione della senescenza siano distinte, questo gli conferirebbe un apparente effetto pleiotropico, potendo anche agire, in particolari circostanze, come un inibitore della senescenza (Demidenko et al. 2010).

Sebbene i meccanismi che ne regolano il funzionamento non siano ancora pienamente compresi, l'inibizione di mTOR (target della rapamicina nei mammiferi) sembrerebbe essere coinvolta nella disattivazione della senescenza cellulare (Demidenko and Blagosklonny 2009; Demidenko et al. 2010).

2.4. PATHWAY RB-p16^{INK4a}

La pathway Rb-p16^{INK4a} è una delle vie di regolazione più importanti del ciclo cellulare ed è essenziale per iniziare e mantenere la senescenza replicativa (Jeyapalan and Sedivy 2008). Essa agisce direttamente sul principale 'freno' del ciclo cellulare, la proteina Retinoblastoma (pRb) che arresta la proliferazione nella fase G1 (Weintraub et al. 1995). Normalmente la regolazione del ciclo cellulare per mezzo di questa pathway è irreversibile, non consentendo alle cellule di riprendere la crescita (Beausejour et al. 2003; Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

2.4.1. pRB

La proteina Retinoblastoma (pRb) è spesso definita come il principale 'freno' del ciclo cellulare per il suo ruolo, nella forma defosforilata o attiva, di inibitore dei fattori di trascrizione E2F che inducono l'espressione di un gran numero di geni essenziali per la replicazione del DNA e la proliferazione cellulare (Weintraub et al. 1995). La sua inattivazione avviene ad opera di chinasi dipendenti da cicline (CDKs) che la fosforilano in modo sequenziale (Sherr and Roberts 1999). L'inizio della proliferazione cellulare è normalmente innescato da molecole esterne che fungono da ligandi per un gran numero di recettori dei fattori di crescita espressi sulla superficie cellulare, attivando così una cascata di segnali, il più visibile dei quali è la proteina chinasi attivata da mitogeno (MAPK signalling: alla cui famiglia appartengono le RAS che al termine della cascata di segnali portano all'attivazione del fattore di trascrizione ETS), e in ultima analisi, portando alla espressione di un certo numero di geni tra cui la ciclina D (Lavoie et al. 1996; Serrano et al. 1997). CDK4 e CDK6 avviano la fosforilazione di pRb in presenza della ciclina D e questo porta alla de-repressione dei geni del ciclo cellulare precoce, compresa la ciclina E e quindi

l'avvio della replicazione cellulare. Sono conosciuti due tipi principali di inibitori del ciclo cellulare, rappresentati da $p16^{INK4a}$ e $p21^{WAF1}$.

$p16^{INK4a}$ è al primo posto nell'inibizione del ciclo cellulare e agisce direttamente sulle chinasi dipendenti da ciclina D inibendo il ciclo in fase G1, mentre $p21^{WAF1}$ (attivata dalla p53) ha un meccanismo d'azione più promiscuo potendo inibire il ciclo cellulare in qualsiasi momento agendo sulle CDKs, sebbene siano necessarie diverse molecole di $p21^{WAF1}$ per ottenere un inibizione efficace delle chinasi dipendenti da ciclina D (Parry et al. 1999).

In cellule normali $p16^{INK4a}$ e $p21^{WAF1}$ lavorano in sinergia: l'accumulo di $p16^{INK4a}$ ed il legame con CDK4 e CDK6 libera le molecole di $p21^{WAF1}$ da queste chinasi che in tal modo si possono legare (inibendone la funzione) a CDK2 e CDK1 più efficacemente (McConnell et al. 1999).

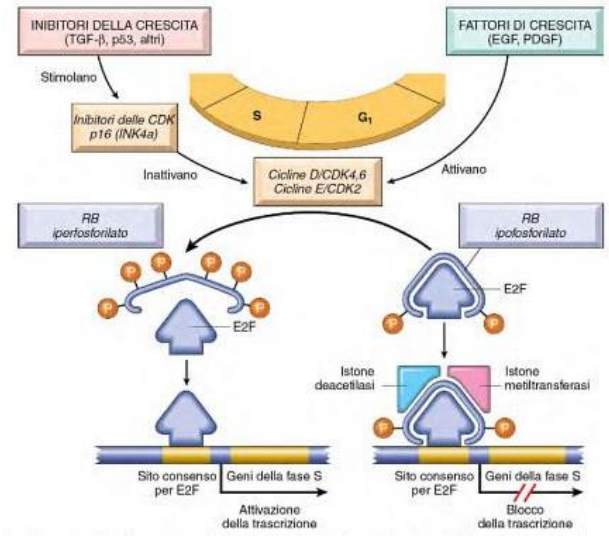


Figura 3: Ruolo della proteina Rb nella regolazione del checkpoint G1-S del ciclo cellulare. (Abbas et al., 2013).

Svolgendo la funzione di principale 'freno' del ciclo cellulare, pRb ha un ruolo importante come onco-soppressore ed alterazioni nella sua pathway sono associate con il 90% dei tumori compreso il retinoblastoma infantile (Hanahan and Weinberg 2000).

2.4.1.1. Modifiche cromatiniche e pRB

Foci di Eterocromatina Associati alla Senescenza

Il rimodellamento della cromatina gioca un ruolo importante nel programma di senescenza cellulare, infatti, durante la senescenza vengono stabilmente represse regioni sul promotore regolate da E2F mediante la formazione di eterocromatina (Becker T. and Haferkamp S. 2013). Queste regioni sono visibili al microscopio a fluorescenza quando le cellule vengono colorate con intercalanti del DNA come il DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo) ed appaiono come "Foci di Eterocromatina Associati alla Senescenza" (SAHF).

Il termine eterocromatina si riferisce ad una struttura altamente condensata di un complesso proteina-DNA, che si forma in seguito a modificazioni degli istoni e che blocca l'accesso al macchinario di trascrizione del DNA sopprimendo così l'espressione dei geni (Xu et al. 1997). La ricerca sui Foci di Eterocromatina Associati alla Senescenza è in continua evoluzione grazie sopratutto alle sempre più innovative tecniche di imaging microscopico ed alla capacità di isolare queste strutture complesse e analizzarle in modo più preciso (Becker T. and Haferkamp S. 2013). La formazione di SAHF coincide con il reclutamento di proteine dell'eterocromatina ad opera di pRb durante l'interazione con l'istone deacetilasi 1 (HDAC1) a livello dei promotori E2F-responsivi (Ferreira et al. 2001). Sono state trovate diverse modificazioni istoniche associate alla cromatina in relazione con SAHF, che includono la reversione dell'acetilazione dell'istone 3 / lisina 9 (H3K9Ac) e della trimetilazione dell'istone 3 / lisina 4 (H3K4me3) e la promozione della trimetilazione dell'istone 3 / lisina 9 (H3K9me3) e della trimetilazione dell'istone 3 / lisina 27 (H3K27me3). La trimetilazione di H3K9 è fondamentale in quanto attrae le proteine HP1 (Heterochromatin Protein 1), che svolgono diverse funzioni attraverso la formazione dell'eterocromatina (Narita et al. 2003). È importante sottolineare come la senescenza non sempre porta un aumento netto complessivo di H3K9me3, suggerendo come la formazione

dei Foci di Eterocromatina Associati alla Senescenza sia locale e quindi indirizzata via pRb ai promotori regolati dal fattore di trascrizione E2F (Funayama and Ishikawa 2007). Si pensa che H3K9me3 sia molto stabile e che sia in grado di prevenire la catalisi dell'acetilazione degli istoni da parte delle acetilasi (HATs). L'acetilazione degli istoni è comunemente associata all'eucromatina, che rappresenta le regioni di cromatina che viene trascritta attivamente. Per questo motivo si pensa che la formazione di SAHF blocchi le regioni della cromatina che codificano i geni della proliferazione regolati da E2F contribuendo al loro silenziamento in maniera efficace (Narita et al. 2003). La trimetilazione di H3K9 associata alla formazione di SAHF si pensa sia catalizzata sia dalla metiltransferasi SUV39H1, che insieme con HP1 interagisce con pRb nel silenziamento del promotore durante la senescenza mediante E2F (Nielsen et al. 2001) o la metiltransferasi RIZ1 / PRDM2 H3K9 che coopera per la respressione del gene pRb e viene inattivata nel carcinoma del colon, della mammella e gastrico (Kim et al. 2003).

Recentemente si è avanzata una nuova ipotesi sull'insorgenza e formazione degli SAHF che si pensa abbia una maggiore rilevanza nel processo di senescenza indotto dagli oncogeni coinvolgendo in maniera cruciale la Risposta al Danno del DNA (DDR) ed il corrispondente segnale ATR (Ataxia Telangiectasia mutated e Rad3) (Cortez et al. 2001). Si è osservato infatti che il blocco di ATR impedisce la formazione dei Foci di Eterocromatima SAHF durante la senescenza indotta dall'oncogene RAS (Becker T. and Haferkamp S. 2013) e che strutture somiglianti agli SAHF e non associate ai promotori target di E2F (che pertanto rimangono attivi) si presentano in modo indipendente in cellule proliferanti che esprimono oncogeni, portando alla conclusione che le strutture SAHF potrebbero non essere una caratteristica essenziale della senescenza (Di Micco et al. 2011).

Gli studi sulla formazione dei Foci di Eterocromatina Associati alla Senescenza sono ancora in evoluzione. Indipendentemente da ciò, è ormai ampiamente accettato che $p16^{INK4a}$ e pRb, nonché HMGA, che si accumulano a livello dei promotori regolati dal fattore di trascrizione E2F durante la senescenza, sono necessari per la formazione di SAHF. Per quanto riguarda $p16^{INK4a}$ si è ipotizzato che il suo ruolo specifico nella formazione di SAHF vada oltre la semplice inibizione delle CDK e quindi del mantenimento di pRb in uno stato attivo (Becker T. and Haferkamp S. 2013).

2.4.2. p16^{INK4a}

L'inibitore di chinasi dipendente da ciclina p16^{INK4a} è considerato un importante fattore nella senescenza e nei disturbi età correlati (Jeyapalan and Sedivy 2008) ormai da tempo (Hara et al. 1996). Biochimicamente p16^{INK4a} inattiva CDK4 e CDK6, attivando pRB (forma ipofosforilata). Nella forma ipofosforilata pRB si lega al fattore di trascrizione E2F disattivandolo (esso non sarà più libero di attivare i geni necessari per la proliferazione) e inibendo di fatto la progressione del ciclo cellulare in G1 (Sherr and Roberts 1999).

La regolazione di p16^{INK4a} è complessa e non acora ben chiara, sopratutto in vivo (Gil and Peters 2006). Sembrerebbe giochino un ruolo importante tre fattori trascrizionali regolatori, due effettori positivi ETS1 e JUMB ed il repressore BMI1 membro della famiglia Polycomb INK4a (Passegue and Wagner 2000; Ohtani et al. 2001; Krishnamurthy et al. 2004; Bracken et al. 2007), come suggerito anche da studi condotti su fibroblasti umani e di topo (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Per quanto concerne il gruppo di proteine Polycomb (PcG) BMI1 ('stem cell factor'), CBX7 e CBX8, queste sono capaci di ritardare l'insorgenza della senescenza in fibroblasti embrionali in topo e uomo (Jacobs et al. 1999; Gil et al. 2004; Dietrich et al. 2007). È stata dimostrata una loro correlazione con il decremento dei livelli di espressione di p16^{INK4A} e, in alcuni casi, p14^{ARF} (p19 ^{ARF} nel topo). Ciascuna di queste proteine è codificata dal locus INK4A-ARF e sono onco-soppressori che funzionano a monte delle pathways di pRB e p53 (Lowe and Sherr 2003).

Di concerto con la regolazione di p16^{INK4A} mediata da BMI1, una serie di fattori di trascrizione ne facilitano la repressione durante la vita proliferativa delle cellule. Il più importante repressore trascrizionale di p16^{INK4A} è rappresentato dalle proteine Id, delle quali la più rappresentativa è Id1 (Yates et al. 1999). Le proteine Id funzionano in due modi: legando le sequenze E-box del DNA che reprimono il promotore INK4a ed interferendo con

la formazione del complesso trascrizionale Ets (Ohtani et al. 2001). Una down-regolazione di Id1 è spesso associata con differenziamento cellulare e senescenza (Zebedee and Hara 2001).

L'espressione di $p16^{INK4a}$ è molto bassa o assente negli organismi giovani ma aumenta con l'avanzare dell'età (Zindy et al. 1997). Questo aumento si verifica principalmente a livello trascrizionale ed è stato rilevato in un ampia varietà di tessuti, e può essere ritardato dalla restrizione calorica che rallenta fortemente l'invecchiamento (Nielsen et al. 1999; Krishnamurthy et al. 2004). Per esempio una up-regolazione di $p16^{INK4a}$ è stata rilevata in fibroblasti umani in senescenza (Ressler et al. 2006) ma anche in reni umani (Melk et al. 2000; Chkhotua et al. 2003).

Poichè l'espressione di $p16^{INK4a}$ può essere up-regolata da una grande varietà di stimoli stressori (Cheng et al. 2006; Gil and Peters 2006), può essere utilizzato come utile biomarcatore per molte forme di senescenza cellulare (Michaloglou et al. 2005; Ressler et al. 2006).

2.5 PATHWAYS P53 E P16-RB: CONTROLLORI CONTROLLATI

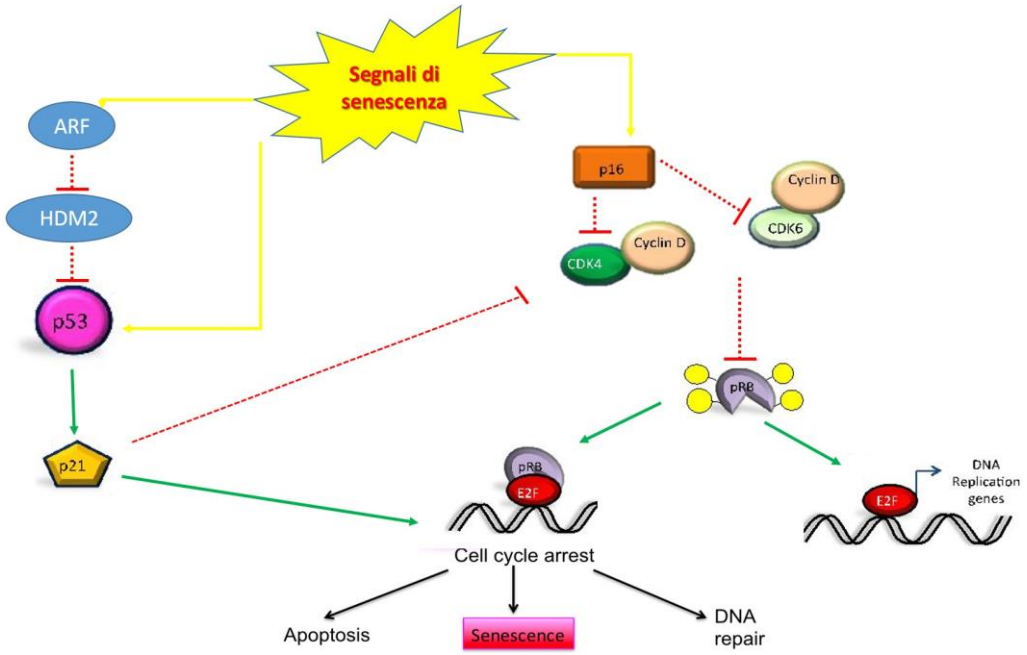


Figura 4- Regolazione delle Pathways p53 e p16-Rb (http://dx.doi.org/10.5772/54120).

Gli stimoli stressori che inducono come risposta la senescenza cellulare (***Figura 4***) sono molteplici e comprendono anche l'attivazione della Risposta al Danno del DNA (DDR) attraverso le vie di regolazione delle chinasi ATM e ATR (Marechal and Zou 2013) e la funzione ARF (Alternate-Reading-Frame protein) (Velimezi et al. 2013). Le pathways attivate come risposta di controllo sono generalmente due e definiscono due grandi categorie di senescenza replicativa (Jeyapalan and Sedivy 2008). La prima è innescata principalmente da cause che portano alla DDR ed è la pathway della p53 (d'Adda di Fagagna et al. 2003; Herbig et al. 2004).

La seconda ha diverse fonti di induzione ed è la RB-P16^{INK4a} (Jeyapalan and Sedivy 2008). Alcuni segnali (oncogene Ras) possono innescare entrambe le pathways. I controllori della senescenza vengono a loro volta controllati. La p53 ad esempio è down-regolata dalla HDM2 (E3 ubiquitin-protein ligase Mouse Double Minute 2 homolog) che ne facilita

l'ubiquitinazione. Il regolatore è a sua volta down-regolato dalla ARF. L'espressione di p53 controlla la senescenza replicativa in parte inducendo l'espressione di p21 che è un inibitore della CDK4 che inibisce la fosforilazione della pRb e quindi la sua inattivazione. L'attivazione della p53 aumenta l'effetto del controllore RB-$P16^{INK4a}$ della senescenza cellulare quando questo è attivo, agendo sulle CDK. I segnali che determinano la risposta cellulare attraverso la pathway RB-$P16^{INK4a}$ portano ad una sua up-regolazione. La $P16^{INK4a}$ inibisce le CDK4-6 che impediscono la fosforilazione di pRb che è libera di legarsi al fattore di trascrizione E2F impedendo la progressione del ciclo cellulare. E2F può indurre a sua volta l'espressione di ARF che coinvolge il pathway della p53 determinando così una regolazione reciproca tra le pathways.

3. FOCUS ON

3.1. REAC vs SENESCENZA: GOAL!!
SCOPO DEL LAVORO

L'invecchiamento è un processo complesso caratterizzato da una diminuita omeostasi tissutale ed un progressivo declino delle prestazioni fisiche e delle funzioni cognitive di tutto l'organismo. L'integrità tissutale è mantenuta fisiologicamente dalle cellule staminali residenti, che hanno la capacità di rimpiazzare le cellule danneggiate o morte (Bianco et al. 2001; Bryder et al. 2006; Maioli et al. 2014). Recenti studi suggeriscono che patologie età correlate determinano una ridotta capacità nell'autorinnovamento delle cellule staminali adulte che normalmente sono coinvolte nel rimpiazzo di elementi cellulari danneggiati (Maioli et al. 2014).

I progressi nella ricerca sulle cellule staminali hanno portato alcuni autori nel proporre un'ipotesi intrigante per quanto riguarda la senescenza: l'esaurimento delle cellule staminali può essere una causa primaria di invecchiamento (Sharpless and DePinho 2007; Sahin and Depinho 2010).

Le cellule staminali adulte (Adult Stem Cells) sono presenti nei tessuti di tutto il corpo umano, sebbene rare rispetto alla popolazione cellulare complessiva, compreso il midollo osseo ed il tessuto adiposo e persistono durante l'intero arco della vita (Wagers and Weissman 2004; Jackson et al. 2007). Queste cellule sebbene siano pluripotenti, rispetto alle staminali embrionali, hanno una capacità differenziativa limitata al mantenimento dell'omeostasi tissutale, attraverso il rimpiazzamento delle cellule danneggiate o morenti (durante l'intero arco di vita) ed esibiscono specifiche proprietà fisiologiche e biochimiche (Bryder et al. 2006; Morrison and Kimble 2006). Le cellule staminali mesenchimali (MSCs)

sono precursori non ematopoietici, altamente proliferanti ed in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule, necessarie per formare molti tessuti mesenchimali, compreso l'osso, la cartilagine, il muscolo, midollo osseo, stroma, tendini / legamenti, grasso, derma, e altri tessuti connettivi (Friedenstein et al. 1976; Jiang et al. 2002).

Inoltre le MSCs partecipano alla risposta delle lesioni con una "homing capacity" attraverso cui possono localizzare il tessuto danneggiato e secernere una vasta gamma di molecole bioattive con "attività trofica" (Wright et al. 2001).

Tuttavia la capacità rigenerativa delle MSCs è legata al tipo di tessuto da cui sono isolate (tessuto adiposo, midollo osseo, membrane placentari fetali, liquido amniotico), ed è correlata con l'età dei donatori di tessuti (Wagner et al. 2009). Il potenziale auto rigenerativo è infatti modificato da una serie di cambiamenti biochimici che accompagnano l'invecchiamento (Ho et al. 2005; Wagner et al. 2009).

Sembra che l'espressione di mediatori specifici della senescenza, possa agire attraverso meccanismi di soppressione tumorale ed arresto della crescita, giocando un ruolo importante nell'invecchiamento. Tra questi meritano particolare attenzione $p16^{INK4a}$ e ARF, inibitori delle CDK (cyclin-dependent kinase), che si accumulano significativamente in una varietà di tessuti durante il normale invecchiamento nelle cellule dei roditori ed anche nell'uomo (Alcorta et al. 1996; Zindy et al. 1997; Nielsen et al. 1999; Randle et al. 2001; Rheinwald et al. 2002; Chkhotua et al. 2003; Melk et al. 2004). L'attivazione di $p16^{INK4a}$ e di ARF induce a sua volta l'attivazione della pathway di p53, compresa l'espressione di $p21^{C1P1}$ inibitore della CDK4, portando all'arresto del ciclo cellulare (Bringold and Serrano 2000).

È generalmente accettato che le cellule staminali, che subiscono senescenza cellulare accelerata, possano contribuire allo sviluppo di malattie correlate all'età (Vijg and Campisi 2008).

Il razionale del presente lavoro trae le sue fondamenta da studi pregressi che hanno evidenziato come sia possibile, in vitro, influenzare i profili di espressione dei geni orchestratori del differenziamento/pluripotenza delle cellule staminali embrionali dei topi (Maioli et al. 2012) e di cellule staminali umane (fibroblasti), applicando stimoli fisici con uno specifico protocollo della innovativa tecnologia REAC (Radio Electic Asymmetric Conveyer), il TO-RGN (Tissue Optimization - Regenerative) (Maioli et al. 2013).

Lo scopo del presente lavoro è stato verificare se il trattamento REAC con protocollo TO-RGN potesse contrastare l'espressione del principale marker di senescenza cellulare in vitro, la beta-galattosidasi lisosomiale ed i profili di espressione dei geni associati alla senescenza, impegnati durante una coltura prolungata di cellule staminali umane derivate da tessuto adiposo (ADhMSCs) e valutare se la loro capacità differenziativa verso i fenotipi adipogenico, osteogenico e vasculogenico potesse essere influenzata in presenza/assenza dello stimolo REAC.

Abbiamo inoltre valutato l'effetto che l'esposizione delle ADhMSCs alla tecnologia REAC protocollo TO-RGN ha su due dei regolatori principali delle pathways più importanti che agiscono sul controllo del destino delle cellule staminali e della senescenza. La prima è telomerasi-dipendente la seconda è telomerasi-indipendente. Nella pathway di senescenza telomerasi-indipendente, sono implicati eventi epigenetici come ad esempio le modificazioni istoniche. Ne consegue che i geni che influenzano il rimodellamento della cromatina e la regolazione dell'espressione genica possono essere coinvolti direttamente nelle decisioni che riguardano il destino delle cellule staminali, tra cui la loro capacità di auto-rinnovamento e la senescenza (Narita et al. 2003; Roy et al. 2007).

Per valutare l'interazione della tecnologia REAC sulla pathway telomerasi-indipendente si è scelto di analizzare gli effetti del trattamento TO-RGN sui profili di espressione genica di BMI1, Oct4, Sox2, Nanog e cMyc nelle ADhMSCs trattate e non.

Bmi1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) è un membro del gruppo di repressori appartenente alle famiglie Polycomb e Trithorax, è un fattore essenziale nel regolare la capacità di auto-rinnovamento delle cellule staminali ematopoietiche murine adulte e delle cellule staminali neuronali, agendo come repressore della senescenza (Molofsky et al. 2003; Park et al. 2003).

Per valutare gli effetti del protocollo TO-RGN sulla pluripotenzialità e capacità di differenziamento delle ADhMSCs si sono analizzati i profili di espressione genica dei fattori di trascrizione della pluripotenza Oct4, Sox2, Nanog e cMyc (Molofsky et al. 2003; Guney and Sedivy 2006; Nakatake et al. 2006; Masui et al. 2007).

Per valutare l'interazione della tecnologia REAC sulla pathway telomerasi-dipendente si è scelto di analizzare gli effetti del trattamento TO-RGN sui profili di espressione del suo principale regolatore, TERT.

La telomerasi è una ribonucleoproteina specializzata composta dalla trascrittasi inversa telomerica (TERT), un modello intrinseco (stampo) di RNA (TR), e diverse proteine associate (Dimri et al. 1995). La sua principale funzione è stabilizzare i telomeri, che si accorciano durante ogni ciclo di divisione cellulare (Allsopp et al. 1992), proteggendo così i cromosomi da ricombinazioni e fusioni end-to-end. La telomerasi è espressa in cellule altamente proliferanti durante lo sviluppo dell'embrione, mentre è fortemente down-regolata nelle cellule in differenziamento, non essendo più rilevabile in molte cellule somatiche adulte (Harley et al. 1990; Lingner et al. 1997).

3.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali sono cellule primitive non specializzate, scoperte quasi 35 anni fa in embrioni murini (CES) ed isolate dalla massa cellulare interna (ICM), un piccolo gruppo di cellule della blastocisti (Evans and Kaufman 1981). Più recentemente, cellule simili sono state isolate da blastocisti umane (Thomson et al. 1998) e da cellule germinali primordiali umane (Shamblott et al. 1998).

Per definizione, una cellula staminale va incontro ad una mitosi 'asimmetrica' o differenziativa che dà origine a due cellule, una che conserva le caratteristiche di staminalità conferendole la capacità di 'self-renewal' o auto-rinnovamento mentre l'altra procede verso il differenziamento in almeno un tipo cellulare, garantendo così l'omeostasi funzionale del tessuto di origine ed il regolare turn-over cellulare.

Le CES possono essere espanse in vitro e mantenute in assenza di stimoli, in uno stato indifferenziato a tempo indeterminato (Kim et al. 2005).

Allo stesso tempo sono pluripotenti potendo potenzialmente differenziarsi, in vitro, in neuroni (Strubing et al. 1995), cellule muscolari lisce (Wartenberg et al. 1998) e scheletriche (Rohwedel et al. 1994) e cardiomiociti (Wobus 2001); in pratica in tutti i tipi di cellule somatiche dei tre strati germinali embrionali così come le cellule germinali (Smith 2001).

Queste caratteristiche hanno alimentato, fin dalla loro scoperta, una grande aspettativa nel loro possibile impiego clinico in Medicina Rigenerativa, con i relativi problemi etici che questo comporta.

Esistono molti tipi di cellule staminali, che differiscono nel loro grado di differenziazione e nella capacità di auto-rinnovamento.

Una delle classificazioni più comunemente utilizzata si basa sulla loro origine/ubicazione (***Tabella*** 1) e le distingue in due categorie: Cellule Staminali Embrionali (CES) e Cellule Staminali Tissutali (TSSC).

Classificazione delle Cellule Staminali secondo origine, potenziale differenziativo e progenie			
Nome	**Tipo Cellulare**	**Potenziale differenziativo**	**Progenie**
ESC	Cellule allo stadio di morula Cellule della massa cellulare interna allo stadio di blastocisti	**Totipotente** **Pluripotente**	Tessuti Embrionali ed extraembrionali (ESC) Tutte le cellule somatiche e geminali
ESC	Cellule dello strato epiblastico allo stadio di gastrula	**Pluripotenti**	Endoderma, Mesoderma, Ectoderma
ESC	Cellule del Endoderma, Mesoderma, Ectoderma	**Pluripotenti**	Tutte le cellule somatiche
TSSC	Cellule di tessuti specifici	**Multipotenti**	Uno o più tipi di cellule a seconda del tessuto di residenza (es cellule staminali ematopoietiche)
TSSC	Cellule residenti in un dato tessuto	**Unipotenti**	Singolo tipo cellulare (es cellule miosatelliti del muscolo)
ESC: Cellule Staminali Embrionali; TSSC: Cellule Staminali Tessuto Specifiche			

Tabella 1: Classificazione delle Cellule Staminali secondo origine, potenziale differenziativo e progenie.

La seconda classificazione delle cellule staminali è più funzionale e si basa sul loro potenziale di sviluppo, distinguendole in totipotenti, pluripotenti, multipotenti, e unipotenti (***Figura 5***).

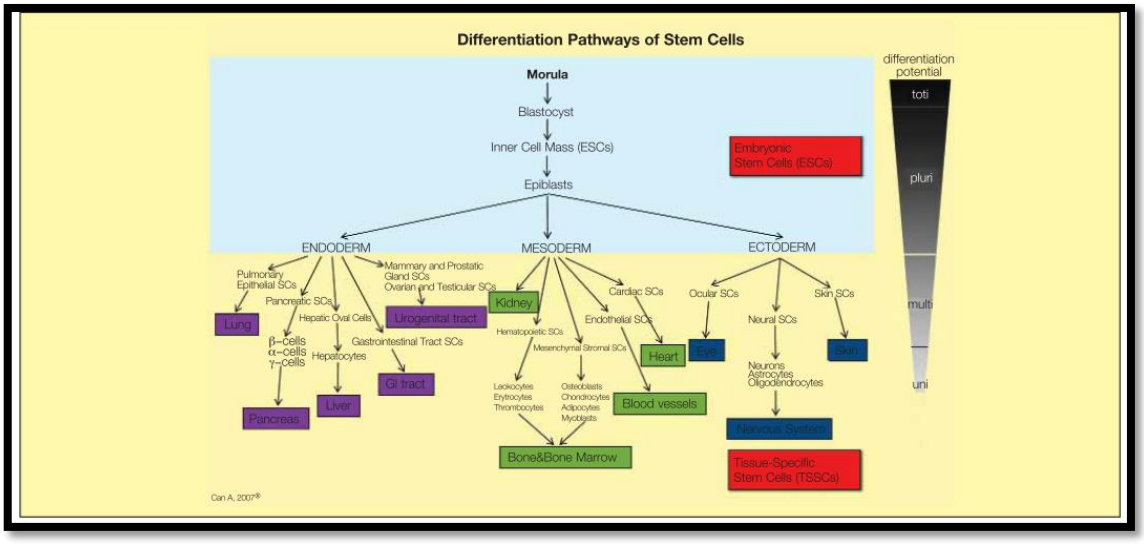


Figura 5: Percorsi di differenziamento delle cellule staminali (http://www.journalagent.com/).

Una cellula staminale totipotente può potenzialmente dare origine ad un nuovo individuo. Così, i blastomeri nella fase embrionale di morula (fino a 4-5 giorni di vita) sono totipotenti, perché ogni singola cellula può dar luogo a tutti i tessuti embrionali e fetali necessari per lo sviluppo dei mammiferi (Brook and Gardner 1997).

Possono essere mantenute in coltura allo stato indifferenziato su un "feed layer" di fibroblasti embrionali o in presenza di stimoli estrinseci come il Leukemia Inhibitory Factor (LIF) che appartiene alla famiglia delle interleuchine (IL) – di tipo 6 della classe delle citochine, che determina attraverso la sub unità comune gp130 del recettore LIFR l'attivazione delle cascate di segnali JAT/STAT (segnale di trasduzione e attivatore della trascrizione Janus chinasi) e MAPK (proteina chinasi mitogena attivata) (Suman et al. 2013).

Le cellule staminali si definiscono pluripotenti quando hanno la capacità di differenziarsi nei vari tipi di cellule dei tessuti embrionali ma non dei tessuti extra embrionali; multipotenti quando sono in grado di specializzarsi in tutti i tipi cellulari di un tessuto; oligopotenti quando sono capaci di differenziarsi in pochi tipi cellulari ed infine unipotenti quando evolvono verso un solo tipo di cellula per formare uno specifico tessuto (Young et al. 2004).

Attualmente è stata aggiunta un'altra classe che definisce le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), realizzate nel corso di un esperimento condotto dai professori Gurdon e Yamanaka, per il quale nel 2012 hanno vinto il premio Nobel per la medicina (Yamanaka 2012).

Le iPS sono cellule adulte già specializzate che subiscono un processo di riprogrammazione mediante l'uso di vettori retrovirali che trasfettano il genoma con 4 geni responsabili della pluripotenza (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) riportandole ad uno stato indifferenziato capace di orientarsi verso qualunque fenotipo cellulare (Yamanaka 2008).

3.3 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Nei tessuti di un individuo adulto una piccola popolazione residente di cellule gioca un ruolo chiave nel mantenere l'omeostasi tissutale, e combattere i processi età-correlati rimpiazzando cellule vecchie o danneggiate, sono le staminali mesenchimali (hMSCs) (Bianco et al. 2001; Bryder et al. 2006).

Le MSCs furono scoperte negli anni '70 grazie agli studi pionieristici di Friedenstein sulla popolazione cellulare nei trapianti di midollo osseo di topo in cui furono individuati precursori non ematopoietici in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule necessarie per formare molti tessuti mesenchimali (tessuto osseo, adiposo e cartilagine, stroma, tendini / legamenti, grasso, derma, e altri tessuti connettivi) (Friedenstein et al. 1966; Friedenstein et al. 1968; Friedenstein et al. 1976; Jiang et al. 2002).

La localizzazione delle MSCs comprende, di fatto, tutti gli organi e tessuti dell'individuo adulto, essendo isolabili dai tessuti connettivi come sangue periferico (Zvaifler et al 2000), dal tessuto adiposo (Pettersson et al. 1984; Deslex et al. 1987; Hauner et al. 1987; Zuk et al. 2001), dall'osso trabecolare (Sottile et al. 2002), dal derma (Chunmeng and Tianmin 2004), dalla membrana sinoviale (De Bari et al. 2003), dal liquido sinoviale (Jones et al. 2004), dai tendini (Salingcarnboriboon et al. 2003), dal muscolo scheletrico (Bosch et al. 2000), così come dal sangue, dal fegato e dal midollo osseo fetali (Campagnoli et al. 2001; in 't Anker et al. 2003a).

Recentemente sono state isolate cellule staminali mesenchimali anche da sangue e matrice di cordone ombelicale (Erices et al. 2000; Wang et al. 2004), villi placentari (Igura et al. 2004) e liquido amniotico (In 't Anker et al. 2003b).

La capacità rigenerativa delle hMSCs non è solo in relazione al tessuto di origine (adiposo, midollo osseo, membrane placentali fetali, liquido amniotico) ma anche all'età del tessuto donatore (Wagner et al. 2009), dal momento che anche le cellule staminali subiscono la senescenza cellulare, con una diminuzione della capacità di auto-rinnovamento e del potenziale differenziativo (Ho et al. 2005; Wagner et al. 2009). Tuttavia, in molti studi clinici le hMSCs sono sottoposte ad espansione in vitro per un lungo periodo di tempo, per produrre un gran numero di elementi vitali o di cellule staminali ottimizzate nel loro commitment e/o nel rilascio di fattori paracrini prima del trapianto (ad esempio con agenti chimici o fisici). A tal fine, la coltura di cellule staminali per multipli passaggi è sia un rischio che un buon modello consolidato per lo studio della senescenza in vitro (Izadpanah et al. 2008; Estrada et al. 2013).

3.3.1. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE

Diversi studi hanno dimostrato che la capacità delle cellule staminali nel rispondere alle esigenze ambientali può diminuire durante l'invecchiamento, suggerendo che le anomalie nella regolazione dell'omeostasi delle cellule staminali (proliferazione, differenziazione e sopravvivenza) possono contribuire all'invecchiamento ed alle malattie legate all'età (Bell and Van Zant 2004; Parisi et al. 2008). In termini di modulazione dell'invecchiamento, le cellule staminali sembrano svolgere un ruolo importante praticamente in tutti i tessuti, anche quelli, come la corteccia cerebrale ed il cuore, in cui il turnover cellulare negli adulti è estremamente basso (Jones and Rando 2011). Negli ultimi anni c'è stato uno sforzo sempre maggiore nello sfruttare il potenziale terapeutico delle cellule staminali per il trattamento di danni tessutali irreversibili che non possono essere curati neanche dai trattamenti farmacologici o chirurgici più avanzati. Nonostante il fatto che le hMSCs possono essere isolate da un sempre crescente numero di fonti tissutali, essi rappresentano una popolazione

cellulare numericamente scarsa nel corpo. L'analisi dei protocolli di terapia cellulare attualmente disponibili rivela che le hMSCs vengono trapiantate nei pazienti in dosi elevate di solito comprese tra 10 e 400 milioni di hMSCs per trattamento (www.clinicaltrials.gov). Di conseguenza, queste cellule devono essere espanse in vitro per più passaggi e il tempo prolungato nella coltura è mediamente di 8-12 settimane prima dell'impianto. In questo contesto, lo sviluppo di approcci innovativi in grado di contrastare la senescenza cui sono soggette le hMSC durante la loro espansione in vitro può essere di particolare rilevanza per lo sviluppo clinico di strategie di terapia cellulare.

La fonte principale di cellule staminali mesenchimali altamente proliferative ed indifferenziate, è stata per diverso tempo il midollo osseo (Pittenger et al. 1999; Kern et al. 2006). A causa della difficoltà nel recupero di donatori di campioni tessutali e per i limiti legati all'età del donatore, che si riflettono in una differente responsività cellulare, si è cercata una fonte alternativa di cellule staminali, dapprima nel sangue del cordone ombelicale, quindi e nel tessuto adiposo (Mizuno and Hyakusoku 2003; Aust et al. 2004; Kern et al. 2006)

Le hMSCs derivate da tessuto adiposo (ADhMSCs) sono sempre più usate come risorsa per la terapia cellulare in medicina rigenerativa, per la minima invasività nella raccolta del tessuto adiposo e la relativa facilità nel loro isolamento, e l'efficace multi potenza (Aust et al. 2004; Freitas and Dalmau 2006). Tuttavia le ADhMSCs subiscono una significativa senescenza dopo passaggi multipli in coltura (Gruber et al. 2012; Estrada et al. 2013; Han et al. 2014). Questa osservazione suggerisce la necessità di studiare nuove strategie di contrasto della senescenza durante l'espansione di una fonte così preziosa di cellule staminali adulte e promettente per la terapia cellulare.

3.3.2. ADIPOSE DERIVED HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL ADhMSCs

La morfologia del tessuto adiposo per molto tempo non è stata oggetto di approfonditi studi, data la sua semplice struttura ed il fatto che non è generalmente associata a gravi malattie ad eccezione del liposarcoma (Ryu et al. 2013). Tuttavia, l'interesse della comunità scientifica per questo tessuto è aumentato quando da esso sono state isolate cellule staminali mesenchimali adulte, conosciute come "cellule staminali derivate da tessuto adiposo" (ADipose human Mesenchymal Stem Cells, ADhMSCs) (Pettersson et al. 1984; Deslex et al. 1987; Hauner et al. 1987).

Le ADhMSCs sono cellule staminali multipotenti che vengono isolate dalla frazione stromale vascolare (SVF) del tessuto adiposo (Nakagami et al. 2006; Ning et al. 2006; Gimble et al. 2007; Schaffler and Buchler 2007; Psaltis et al. 2008; Wilson et al. 2011), costituita da precurcosi degli adipociti CD34+/CD31-, da cellule endoteliali CD34+/CD31+ (Allt and Lawrenson 2001; Armulik et al. 2005; Dore-Duffy and Cleary 2011) e da macrofagi (residenti o infiltrati) CD14+/CD31+ (Sengenes et al. 2005). I marcatori CD34 e CD31 sono caratteristici dei monociti/macrofaci, delle cellule endoteliali e delle piastrine, mentre il CD14 viene espresso dai granuloci e dai monociti/macrofaci.

La caratterizzazione dei markers di superficie delle ADhMSCs mostra positività verso gli epitopi CD13, CD49a, CD49b, CD49d, CD90, CD105, STRO1, CD166, CD117 e CD29, CD44, CD49 e CD54, CD34, CD133, CD144 (Lee et al. 2004)

Inoltre da un confronto tra i marcatori di superficie espressi dalle cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo con quelle derivate dal midollo osseo si trovano dei punti comune come ad esempio l'espressione dei markers CD34 e CD105 (Pittenger et al. 1999).

Secondo diversi autori le ADhMSCs isolate dalla SVF possono essere considerate probabilmente "periciti" o "cellule progenitrici perivascolari" (Caplan 2008; Crisan et al. 2008; Lin et al. 2008).

Tuttavia, non è ancora ben chiara l'origine delle ADhMSCs (Tholpady et al. 2006; Locke et al. 2011).

La popolazione cellulare eterogenea delle ADhMSCs generalmente assume una morfologia 'fibroblast-like' e presentano caratteristiche plastiche simili alle cellule staminali mesenchimali isolate dal midollo osseo (Deslex et al. 1987; Hauner et al. 1987; Gronthos et al. 2001; Zuk et al. 2001). Le ADhMSCs possono infatti orientare il loro differenziamento verso tessuti di derivazione mesodermica (cellule del tessuto cartilagineo, muscolare, cardiaco, osseo ed adiposo) e non mesodermica (cellule endoteliali, pancreatiche o neuron-like).

Dalle analisi morfologiche al miscroscopio elettronico a trasmissione (TEM) le ADhMSCs presentano un alto rapporto nucleo / citoplasma, nucleoli prominenti, organelli citoplasmatici prematuri e numerosi filipodi, caratteristiche che le accomunano alle cellule staminali derivate dal midollo osseo (Pasquinelli et al. 2007; Ryu et al. 2013).

Le cellule staminali mesenchimali isolate dal tessuto adiposo secernono alcuni fattori di crescita tipici come il fattore di crescita epatocitico (HGF), il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) ed il fattore di crescita insulinico 1 (IGF-1) (Rehman et al. 2004; Nakagami et al. 2005). I livelli dei fattori di crescita secreti, in particolare di VEGF ed HGF possono essere aumentati tramite l'esposizione delle ADhMSCs all'ipossia (Rehman et al. 2004), a fattori di differenziazione (Zeng et al. 2007), fattori di crescita o mediante induzione tramite il tumor necrosis factor-α (Wang et al. 2006).

3.4 TECNOLOGIA ASMED ITALY

Radio-electric asymmetric conveyer technology per uso terapeutico

Il REAC è una tecnologia innovativa con brevetto internazionale (WO2001EP07800, EP1301241, US7,333,859 ed altri brevetti in corso) nata specificatamente per usi terapeutici (Rinaldi and Fontani (2000) 2006; Rinaldi and Fontani (2001) 2008) e per tecniche di biostimolazione e/o bio-rinvigorimento mediante piccole correnti radio-elettriche nei tessuti che inducono una attività di riprogrammazione cellulare (Maioli et al. 2013).

Le apparecchiature elettromedicali con tecnologia REAC sono classificate come tipo IIA e certificate con i marchi CE0120 e CE0051 ed ISO 9001:2008 e 13485:2003. Queste certificazioni le rendono immediatamente disponibili per usi terapeutici di bio e neuro stimolazione in medicina umana.

3.4.1. LA FISICA DEL B.E.N.E.

B.E.N.E. Bio Enhancer – Neuro Enhancer®, ASMED, Florence, Italy

La fisica alla base del meccanismo di azione della tecnologia REAC si basa su due assunti fondamentali: quando due campi elettromagnetici oscillanti (oscillatori) interagiscono, inducono nello spazio interessato un modello oscillatorio risultante, ovvero delle correnti a radio frequenza (correnti radioelettriche); le correnti elettriche sono generate da flussi ionici e possono essere opportunamente concentrate e utilizzate per diversi scopi.



Figura 6: REAC Technology (www.irf.com).

L'uso della tecnologia REAC con il modello B.E.N.E. implica un interazione tra gli oscillatori. Uno è rappresentato dal campo elettromagnetico oscillante generato dalle cellule

o dall'intero organismo (che emette energia a radio frequenza nella banda delle microonde con frequenze che vanno da ~ 30 a ~ 300 GHz, con una potenza irradiata di ~ 0.003 W/m^2 e di ~ 0.0054 W per una superficie totale corporea di circa 1,8 m^2), e l'altro da un campo elettromagnetico più debole prodotto dall'apparecchiatura REAC (che emette energia a radio frequenza per millesimi di secondo, nella banda delle microonde con frequenze settabili a 2.4, 5.8 o 10.5 GHz, con una potenza di ~ 0.002W all'emettitore, campo elettrico E= 0.4 V/m, campo magnetico 1mA/m).

In seguito alla creazione di un tale sistema duale, si genera un campo elettromagnetico risultante che induce le cellule o l'organismo nel rispondere in modo autologo con micro correnti radio-elettriche auto-generate, probabilmente derivanti da una serie di flussi ionici cellulari. Con l'aiuto della tecnologia REAC, queste correnti radioelettriche autologhe possono essere veicolate per produrre un effetto terapeutico. Esse vengono trasportate in modo asimmetrico mediante una sonda laminare di alluminio (compresa nei claims brevettuali) su una specifica superficie selezionata dell'intero organismo o, in vitro, attraverso il medium di coltura su colonie cellulari determinando eventi trascrizionali e segnali che guidano la riprogrammazione ed il differenziando in colture cellulari isolate (staminali). Le caratteristiche uniche della tecnologia REAC forniscono così una personalizzazione completa e non invasiva dei trattamenti, in assenza di effetti collaterali, a causa della natura del trattamento stesso. Nel complesso, questi risultati aprono la strada a nuove prospettive a livello sia di scienza di base che di procedure cliniche, con protocolli specifici che sono in corso di validazione (Maioli et al. 2014).

3.4.2. PROTOCOLLI TERAPEUTICI

I protocolli terapeutici impiegati nei trattamenti con tecnologia REAC sono molteplici e ottimizzati per la 'neuro stimolazione/modulazione' e la 'bio stimolazione/modulazione'. Le loro modalità di somministrazione sono di due tipi: puntiformi o su superfici più ampie. Nel primo tipo rientrano i protocolli di Ottimizzazione Neuro Posturale (NPO) (Rinaldi et al. 2011; Mura et al. 2012) e di Ottimizzazione Neuro Psico Fisica (NPPO) (Mannu et al. 2009; Collodel et al. 2012). Entrambi i protocolli sono caratterizzati dalla somministrazione del trattamento, assolutamente indolore, sul padiglione auricolare destro. Il protocollo NPO consiste in un unico impulso di 250 ms, mentre il protocollo NPPO in sette impulsi di 500 ms secondo una precisa sequenza.

Nel secondo tipo rientrano i protocolli di Ottimizzazione Circolatoria (CO) e Metabolica (MO) ed i vari protocolli di Ottimizzazione Tissutale (TO) (Castagna et al. 2011; Maioli et al. 2012; Rinaldi et al. 2012; Collodel et al. 2013) che sono caratterizzati dalla somministrazione del trattamento su superfici ampie. I vari protocolli di TO assumono denominazioni specifiche secondo le caratteristiche di impiego e sono caratterizzati dal fatto che vengono somministrati con sonde laminari di alluminio flessibili in modo da potersi adattare al profilo delle superfici da trattare. I protocolli TO rientrano nelle tecniche di 'bio stimolazione/modulazione' e sono finalizzati alla riprogrammazione cellulare e tissutale.

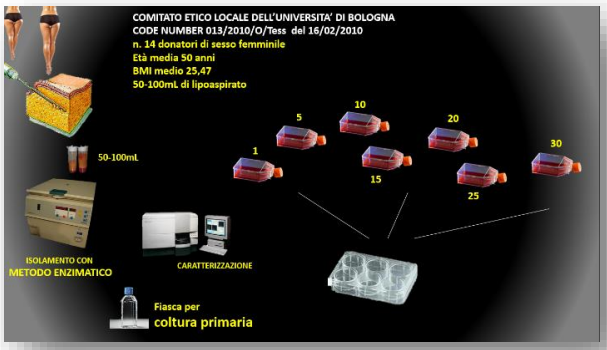
3.4.2.1. Tissue Optimization: TO-RGN

Il protocollo in uso con il modello B.E.N.E. impiegato nella presente ricerca è il REAC TO-RGN. Esso consiste in una sequenza di correnti radio elettriche alla frequenza di 250ms con un intervallo di 2,5s. Il congegno REAC è settato ad una frequenza di 2,4GHz.

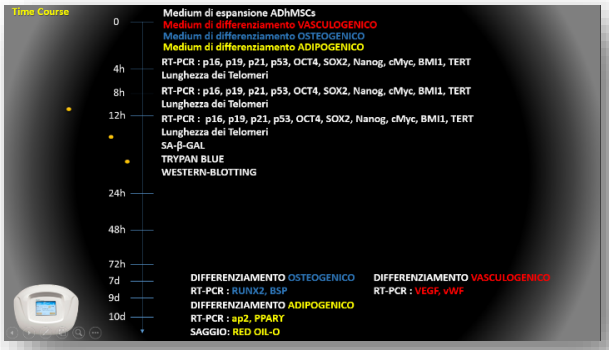
3.5 Draft esperimento e Time Course

Il draft dell'esperimento è di tipo 'Time Course' essendo stata valutata ripetutamente l'espressione genica dei principali markers associati alla senescenza cellulare al fine di comprenderne la dinamica dipendente dal tempo.

L'esperimento è stato disegnato come segue: previa firma del consenso informato si è proceduto con il prelievo di 50-100mL di lipoaspirato da 14 donatori di sesso femminile, età media di ~50 anni e BMI medio di ~25,47.



Le cellule staminali mesenchimali di derivazione da tessuto adiposo sono state isolate con metodo enzimatico e caratterizzate in citofluorimetria. Le cellule sono state seminate in fiasche di espansione e mantenute in coltura prolungata ai diversi passaggi investigati (5-10-15-20-25-30). Nel passaggio più alto le cellule sono state tenute in coltura fino a 90 giorni. I passaggi rappresentano inoltre uno stimolo di senescenza in vitro.



Sono state scelte tre finestre di stimolazione continua con la tecnologia REAC protocollo TO-RGN di 4-8-12h, che rappresentano anche tre times points di osservazione dell'interazione tra la tecnologia del Radio Electric Asymetric Conveyer ed i profili di espressione genica dei principali markers associati alla senescenza cellulare, l'espressione

della beta galattosidasi lisosomiale, la vitalità cellulare associata al test di esclusione del Trypan blue e l'accorciamento telomerico fisiologico in colture in senescenza.

Sono state scelte altre due finestre di osservazione ai 7-10d, che rappresentano i giorni in cui sono state tenute in coltura dopo la stimolazione con il REAC, per valutare l'interazione del protocollo TO-RGN con il mantenimento della capacità di differenziamente multinea delle cellule in senescenza.

4. MATERIALI E METODI

4.1. MATERIALI

4.1.1. COMITATO ETICO E MODELLO CELLULARE

I campioni tissutali sono stati ottenuti previo consenso informativo del paziente in accordo con quanto deliberato dal Comitato Etico Locale dell'Università di Bologna (titolo del progetto approvato: "Assessment of mesenchymal stem cells in human adipose tissue" code number 013/2010/O/Tess, approvato il 16 Febbraio 2010). Tutti i partecipanti hanno consegnato il consenso scritto per consentire il prelievo del loro grasso addominale (50-100 mL di lipoaspirato).

I campioni di tessuto adiposo sottocutaneo sono stati prelevati per lipoaspirazione / liposuzione da donatori di sesso femminile ed età di 50 anni (n=14). Il loro indice BMI medio era di 25,47 (leggero sovrappeso) e la loro età media di 49,57 anni.

4.1.2. B.E.N.E.

Il modello con tecnologia REAC utilizzato nel presente studio è il B.E.N.E. (Bio Enhancer – Neuro Enhancer®, ASMED, Florence, Italy) ed è stato messo a disposizione del gruppo di ricerca dal dott. Alessandro Castagna. È stato caricato uno specifico protocollo TO-REAC per i trattamenti rigenerativi in vitro, lo stesso che recentemente ha dimostrato la possibilità di guidare la pluripotenza delle cellule staminali mesenchimali adulte ed il differenziamento cellulare (Maioli et al. 2012), e di possedere un'attività di riprogrammazione cellulare (Maioli et al. 2013).

Il congegno REAC è stato posto in atmosfera controllata (5% CO_2, 98% umidità, 37°C) e settato ad una frequenza di 2,4GHz. Gli elettrodi convogliatori collegati alle sonde laminari immerse nel medium di coltura delle ADhMSCs. Come da protocollo la corrente generata dal REAC è stata di circa 2mW, il campo elettrico E=0,4 V/m, il campo magnetico 1 mA/m, la velocità specifica di assorbimento (SAR) 0.128 μ W/g; la densità della corrente radio-elettrica che attraversa il medium di coltura durante un singolo impulso radio-elettrico generato dal REAC è di J=30 μ A/cm^2.

4.2. METODI

4.2 ISOLAMENTO E COLTURA DELLE ADhMSCs

L'isolamento di cellule precursori degli adipociti è stato condotto secondo la metodica ampiamente conosciuta in letteratura (Zuk et al. 2001; Mitchell et al. 2006). Dopo un primo lavaggio in PBS, i lipoaspirati sono stati digeriti immergendoli in una soluzione contenente lo 0,2% di collagenasi A di tipo I (Sigma-Aldrich), in leggera agitazione per 45' a 37°C. Per separare la frazione vascolare dello stroma dagli adipociti, i digeriti sono stati centrifugati a 2.000g x 10' (se necessario, la frazione di ADhMSCs può essere trattata con red blood cell lysis buffer per 5' a 37°C e successivamente centrifugata). Il surnatante è stato allontanato mentre il pellet cellulare risospeso nel medium di espansione è stato seminato in fiasche di coltura T75 (BD Falcon) preventivamente attivate. Il medium di espansione è costituito da DMEM-low glucose (Lonza) supplementato con 20 % di FBS (Fetal Bovine Serum) scomplementato (inattivazione termica a 56°C per 30'), 1 % di un mix di antibiotici penicillina-streptomicina (200mM), 1 % di L-glutamina 2 mML ed incubate in atmosfera controllata a 37 °C, 85-90% di umidità e 5 % di CO_2.

Quando le colture di ADhMSCs hanno raggiunto la confluenza (~80-90%) il monostrato cellulare è stato staccato dalla superficie di adesione con un enzima proteolitico, la Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) e seminato in piastre multiwell da 6 pozzetti (densità cellulare (3×10^3cells/cm^2) all'appropriato passaggio e sottoposto (trattati) o non (controlli) al trattamento con tecnologia REAC. Lo strumento B.E.N.E. è stato quindi immesso nell'incubatore e gli elettrodi convogliatori sono stati immersi nel medium di coltura contenente le ADhMSCs ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25, 30, per 4h, 8h, 12h.

Lunghezza e dimensioni delle cellule ADhMSCs sia dei controlli che dei trattati con il TO-RGN ai differenti passaggi sono state acquisite con un microscopio invertito a fluorescenza, l'Olympus IX71 all'ingrandimento 100x (in immersione di olio). Le immagini sono state analizzate con il software "ANALYSIS" ed i dati assemblati in modo da produrre una misura media della lunghezza e dimensione delle cellule.

4.3. CITOFLUORIMETRIA

Caratterizzazione delle ADhMSCs

Le cellule ADhMSCs ottenute dai prelievi dei tessuti adiposi sono state raccolte con trattamento in tripsina-EDTA allo 0.25 % ed incubate al buio con 1μg/10^6cellulle di anticorpo coniugato con il FITC per 40' a 4 °C. Gli anticorpi utilizzati sono stati: SH2, SH3, SH4, anti-CD166, anti-CD14, anti-CD34, anti-CD44, ed anti-CD45. Dopo il lavaggio le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) raccogliendo 10.000 eventi ed i dati analizzati usando il Cell Quest Software (Becton Dickinson).

Il FACSCalibur è un citofluorimetro da banco che fornisce di serie analisi multicolore. È dotato di due laser, il primo è ad argon e raffreddato ad aria (488 nm), il secondo è un diodo a laser rosso (635 nm). I laser sono separati spazialmente per aumentare la sensibilità

necessaria per l'analisi multicolore. Possono essere usati fino a quattro fluorocromi contemporaneamente (fra questi sono la FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, e APC). I rivelatori disponibili dal laser 488 sono 530/30, 585/42, > 670, e dal laser 633, 661/16.

Le ADhMSCs sono state colorate positivamente con SH2, che identifica l'epitopo della glicoproteina endoglina (CD105), sono state riconosciute anche dagli SH3 e SH4, che identificano epitopi su colture espanse di cellule stromali e legano il CD73, una molecola coinvolta nell'attivazione di Linfociti B. Le ADhMSCs sono risultate positive per il CD29, la subunità beta di una famiglia di integrine che costituiscono uno dei principali recettori della matrice extracellulare, CD166, un hMSC marker non presente nei precursori ematopoietici, e sono risultate uniformemente positive per il recettore CD44 (acido ialuronico). Al contrario sono risultate negative per i marker ematopoietici CD14 e CD34 e per l'antigene comune ai leucociti CD45 (***Tabella 2***).

EPITOPO	+	-
SH2	✓	
SH3	✓	
SH4	✓	
CD29	✓	
CD166	✓	
CD44	✓	
CD14		✓
CD34		✓
CD45		✓

Tabella 2: caratterizzazione delle hADSC con il FACSCalibur

4.4 SAGGIO SA-β-GAL

Marker di senescenza in vitro

Oltre al classico fenotipo scenescente rappresentato dai cambiamenti delle caratteristiche morfologiche cellulari, uno dei più comuni metodi utilizzati, in vitro, per individuare le cellule in senescenza è la misurazione dell'attività della beta galattosidasi lisosomiale con un semplice saggio biochimico (Dimri et al. 1995). La beta-galactosidasi (β-GAL) è un enzima associato al metabolismo degli zuccheri. A causa di un ingrandimento dei lisosomi nelle cellule senescenti, aumenta l'attività dell'enzima β-GAL che è quindi spesso indicato come associato alla senescenza (Lee et al. 2006).

Il Saggio SA-β-GAL è stato performato utilizzando il "Senescence-associated β -Galactosidase Staining Kit " (Cell Signalling). Brevemente: le ADhMSCs sono state messe in coltura ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25 e 30 ed esposte per 12h consecutive in presenza o assenza del trattamento REAC (TO-RGN) in piastre multiwell da 6 pozzetti (alla densità di 3×10^3 cellule per pozzetto). Le cellule sono state quindi trattate con una soluzione di fissaggio (20% fomaldeide, 2% glutaraldeide in PBS 10X) per 15' a temperatura ambiente (TA) e lavate due volte con PBS 1X. È stato aggiunto 1 ml di SA-β-GAL, quindi si è parafilmata la piastra per evitare l'evaporazione della soluzione, e posta in atmosfera controllata a 37 °C overnight (in assenza di CO_2). Si è quindi proceduto con l'osservazione dei campioni.

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte. Il risultato mostrato è uno dei più rappresentativi (***Figura 10***). Le cellule sono state fotografate al microscopio invertito, ingrandimento 100x per determinare qualitativamente l'attività del SA-β-GAL. Il numero di cellule positive (blu) e negative al saggio è stato contato in cinque campi scelti casualmente con il microscopio (ingrandimento 200x), ed è stata calcolata la percentuale di cellule positive al SA-β-GAL sul totale.

4.5 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE

Le ADhMSCs sono state coltivate ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25 e 30 ed esposte per 4h-8h-12h in presenza o assenza del trattamento REAC (TO-RGN) in piastre da 6 pozzetti (densità di 6×10^3 cellule per pozzetto). La vitalità cellulare è stata determinata con il test standard di esclusione del trypan blue, utilizzando come dato rappresentativo quello relativo alle 12h (***Figura 9***) (Life Technologies, certificato ISO 13485), un colorante anionico (***Figura 7***) che è incapace di attraversare la membrana delle cellule intatte, mentre può attraversare quelle delle cellule necrotiche, ormai non più integre, accumulandosi nel citoplasma e colorandole di blu.

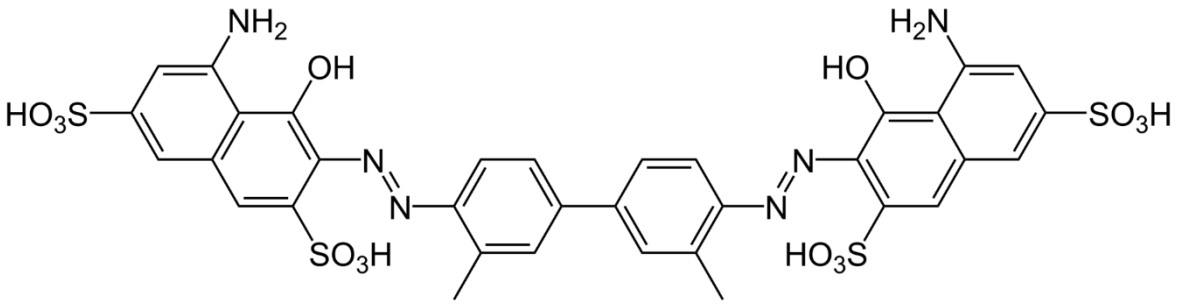


Figura 7: Formula chimica del colorante Trypan Blue

Le cellule in adesione ed in sospensione presenti in ogni pozzetto sono state contate su opportuni vetrini (Countess™ cell counting chamber slides) utilizzando il Countess™ automated cell counter (Life Technologies). Le cellule trattate e non con la tecnologia REAC, sono state staccate dalla superficie di adesione delle piastre multiwell con la tripsina-EDTA 0,25%, ed un isovolume di sospensione cellulare (10µl) è stato miscelato con Trypan blue allo 0,1% a TA. La conta e la vitalità sono state effettuate entro 5' dalla preparazione dei campioni.

4.6 ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA

La PCR quantitativa in Tempo Reale è una metodica che consente di quantificare (in maniera assoluta o relativa) una sequenza target in un campione biologico costituito da una miscela eterogenea di molecole di DNA e/o di RNA (opportunamente retrotrascritto in cDNA) (Higuchi et al. 1993). Questo avviene sfruttando la relazione tra la quantità di templato di partenza ed il prodotto di amplificazione specifico della PCR.

Per la RT-PCR™ è stato utilizzato il modello CFX96-C1000 Touch™ della BioRad (CFX96 è il rivelatore a fluorescenza mentre il C1000 è il termociclatore). Due microlitri di cDNA sono stati amplificati in un volume finale di reazione di 25µL utilizzando la Platinum Supermix UDG (Invitrogen), 10µM di ciascun primer, 10µM di fluoresceina (BioRad), e Sybr Green. Dopo un iniziale step di denaturazione a 50° per 2' e 95°C per 2', sono stati avviati i 40 cicli di amplificazione. Alla fine di ciascun step è stata letta la fluorescenza. Ogni ciclo di amplificazione è caratterizzato dalla stessa sequenza di temperature: 95°C per 15", 55 – 59°C per 30", e 60°C per 30". Per valutare la qualità del prodotto della real-time PCR, per ogni saggio è stata performata l'analisi della Curva di Melting. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold). Il delta è calcolato come differenza tra il CT del campione in analisi ed il relativo gene housekeeping, ovvero il normalizzatore che nella nostra sperimentazione è l'ipoxantina fosforibosil transferasi 1 (HPRT1), un gene espresso costitutivamente che ha la funzione primaria di portare alla sintesi dei nucleotidi a base di purina.

Il diagramma del segnale di fluorescenza è solo in linea teorica esponenziale (nessuno dei componenti della reazione è limitante). Nella realtà il diagramma di amplificazione assume un andamento di tipo sigmoide con il raggiungimento di un plateau. L'intensità di fluorescenza (asse X) è espressa in funzione del numero di cicli di amplificazione (asse Y).

I primi cicli della RT-PCR™ in cui non è misurabile un variazione della fluorescenza definiscono la baseline (linea base) del diagramma. La linea soglia o Threshold corre parallela alla baseline ed interseca le curve dei campioni nella fase iniziale di crescita esponenziale (può essere definita in vari modi, via software in maniera automatica o semi-automatica, o tramite operatore in maniera manuale). Il ciclo-soglia (Ct) rappresenta il punto in cui la linea soglia interseca la curva di amplificazione di ogni campione nella quale si registra un incremento della fluorescenza. Il valore del Ct è stato fornito dal software in dotazione allo strumento mediante l'uso dell'algoritmo del "Metodo della Derivata Seconda".

I livelli di mRNA sono stati espressi come folde of change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dei livelli di espressione genica delle cellule ADhMSCs trattate con la tecnologia REAC e protocollo TO-RGN rispetto ai relativi controlli (cellule non trattate indifferenziate) stabilendo il 5° passaggio come time 0 o inizio del trattamento.

L'RNA totale è stato estratto dalle ADhMSCs esposte o non al trattamento con tecnologia REAC e protocollo TO-RGN per 4h, 8h e 12h. L'estrazione è stata eseguita con il Trizol-reagent in accordo con il protocollo dell'azienda fornitrice (Life Technologies) e quantificato mediante lo spettrofotometro Nanodrop 2000c (Fisher Scientific SAS, Illkirch Cedex, France).

L'RNA totale è stato isolato dai controlli e dalle ADhMSCs trattate con la tecnologia REAC (tempo di esposizione 4h-8h-12h) ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25 e 30 e sono stati valutati i profili di espressione genica in RT-PCR™ usando specifici primers della Invitrogen per p16, p19, p21, p53, OCT4, SOX2, Nanog, cMyc, BMI1, TERT e HPRT1, già descritti in letteratura (Bea et al. 2001; Vandesompele et al. 2002; Isenmann et al. 2007; Maioli et al. 2012; Bianchi et al. 2013; Maioli et al. 2013).

Per valutare i profili di espressione genica delle cellule in differenziamento è stato isolato l'RNA totale dai controlli e dalle ADhMSCs trattate con la tecnologia REAC (tempo di esposizione 12h) ai passaggi 5° e 30°, differenziate verso la linea adipogenica (ai 7 e 10 giorni di coltura), osteogenica (ai 7 giorni di coltura) e vasculogenica (ai 7 giorni di coltura). L'RNA totale è stato risospeso in RNAase-free water e retrotrascritto con il kit MuMLV in un volume di reazione di 50µL (1µg di RNA totale) in accordo con il protocollo della ditta (Invitrogen) per ottenere il cDNA necessario per valutare l'espressione genica con la Real-Time PCR™ (RT-PCR™).

Sono stati usati primers specifici per il differenziamento osteogenico quali: Core Binding Factor Alpha 1 (CBFA1/RUNX-2), e BSP, già descritti (Polini et al. 2011); primers specifici per l'angiogenesi come VEGF anch'essi già descritti in letteratura (Ventura et al. 2007b).

Sono stati usati primers specifici per il differenziamento adipogenico (aP2 e PPAR γ) e vascolare (vWF) (***Tabella 3***).

PRIMER	SEQUENZA
aP2 - forward	5 ′- AGACATTCTACGGGCAGCAC -3 ′
aP2 - reverse	5 ′- TCATTTTCCCACTCCAGCCC - 3 ′
PPAR γ - forward	5 ′- GCAAACCCCTATTCCATGCTG -3 ′
PPAR γ - reverse	5 ′- GCAGGCTCCACTTTGATTGC - 3 ′
vWF - forward	5 ′- GCCTGTGGGAGCAGTGCCAG - 3 ′
vWF - reverse	5 ′- GGGCGTACTCCAGGAGGGCA - 3 ′

Tabella 3: Primers specifici per il differenziamento adipogenico e vasculogenico.

Per valutare la specificità del prodotto amplificato per ogni singolo campione, a fine analisi è stata eseguita, come parte integrante dell'intero protocollo analitico, una valutazione della

Curva di Dissociazione (Melting Curve) che identifica la temperatura di "melting" (Tm) di ogni amplificato (eliminando così eventuali aspecifici, dimeri di Primers ecc.).

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato. In ogni reazione sono stati inclusi due controlli negativi.

4.7 IMMUNOBLOTTING ANALYSIS

Le ADhMSCs coltivate ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25 e 30 sono state esposte per 4-8-12 ore in presenza/assenza del trattamento REAC TO-RGN in piastre multiwell da 6 pozzetti (semina alla densità di $3x10^3$ cellule/pozzetto). Le cellule sono state staccate dalla piastra con Tripsina-EDTA 0,25%, raccolte in PBS 1X e centrifugate a 2000g per 10'. Il pellet cellulare è stato risospeso in tampone di estrazione (Invitrogen) al fine di lisare le ADhMSCs ed estrarne le proteine. Le proteine sono state separate secondo il loro peso molecolare con l'analisi dell'Immunoblotting per cataforesi in gel di poliacrilammide con 10% Novex Tris-glicina (Invitrogen). Il tampone di corsa è in MOPS SDS, utilizzando un SureLock XcellTM Mini-Cell in accordo con le istruzioni del costruttore. Dopo il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa (PVDF) (Invitrogen), saturazione delle membrane con BSA 3% e lavaggio in PBX-Tween 20 0,1%, le proteine sono state esposte alla reazione immunologica primaria per 1 ora a TA in presenza di anticorpi primari contro Oct4 (Santa Cruz), Sox2 (Sigma) e GAPDH (Santa Cruz) diluiti 1:1000. Dopo lavaggi per eliminare un eventuale eccesso di primario la membrana è stata esposta alla reazione immunologica secondaria con gli anticorpi secondari anti-rabbit coniugati con la perossidasi di rafano (HRP) (PIERCE). La presenza delle proteine bersaglio è stata quantificata con il sistema di rilevazione della chemioluminescenza (ECL Western blotting detection reagents) (***Figura 21***).

4.8 VALUTAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il Qiamp DNA mini kit (Qiagen), ai passagi 5, 15, 20, 25 e 30 dalle cellule ADhMSCs di controllo e da quelle esposte alla tecnologia REAC per 4, 8 e 12 ore. La lunghezza dei telomeri è stata calcolata usando il kit Telo TAGGG telomere lenght assay (Roche) in accordo con il protocollo del produttore. Brevemente: il DNA genomico è stato digerito con una miscela dei più frequenti enzimi di restrizione. I frammenti di DNA digerito sono stati separati tramite elettroforesi su gel e trasferiti nella membrana di nylon tramite Southern blotting. I frammenti di DNA così trasferiti sono stati ibridizzati con una sonda marcata con Dygoxigenin (DIG), specifica per le ripetizioni telomeriche ed incubata con uno specifico anticorpo anti-DIG accoppiato covalentemente con la fosfatasi alcalina. Alla fine la fosfatasi alcalina dell'anticorpo metabolizza il CDP-star, un substrato chemiluminescente altamente sensibile. In questo modo si produce un segnale visibile che indica la locazione delle sonde immobilizzate nel telomero (e quindi i Frammenti di Restrizione Terminale dei Telomeri che sono stati tagliati (TRF) nel blot). La lunghezza media dei TRF è stata determinata confrontando la posizione della TFR sulla membrana in relazione ad uno standard dal peso molecolare conosciuto. Il segnale di chemioluminescenza è stato acquisito utilizzando lo strumento VersaDoc Imaging System (BioRad). La lunghezza media dei TRF è stata definita in base alla seguente formula:

$$TRF = \frac{\Sigma(\mathrm{ODi})\text{positive control (cell at passage1)}}{\Sigma(\mathrm{ODi/Li})}$$

dove Odi è il segnale chemioluminescente e Li è la lunghezza del TRF alla posizione i.

4.9 DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO, OSTEOGENICO, VASCULOGENICO

4.9.1. ADIPOGENESI

Per testare la capacità multipotente delle cellule staminali derivate da tessuto adiposo, le ADhMSCs sono state esposte e non esposte per 12h al trattamento con tecnologia REAC, protocollo TO-RGN, ai passaggi 5 e 30 , ed orientate verso i fenotipi adipogenico, osteogenico e vascolare.

Per indurre il differenziamento adipogenico le cellule sono state seminate in piastre multiwell da 24 pozzetti alla densità di $3\times10^3/cm^2$ e coltivate in un medium di induzione (Millipore) composto da DMEM-lowglucose, supplementato con 10 % di FBS scomplementato (inattivazione termica a 56°C per 30'), ed un cocktail ormonale costituito da 0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX), 200 μM indomethacin, 1 μM dexamethasone (DXM), e 10 μg/mL di insulina. Il medium è stato sostituito ogni 2 – 3 giorni. Alle finestre temporali dei 7 e 10 giorni di differenziamento, è stato estratto l'RNA totale, retrotrascritto e con PCR in real time sono stati valutati i profili di espressione genica di due geni markers del differenziamento, il 'peroxisome proliferator-activated receptor γ' (PPAR γ) e la 'adipocyte Protein 2' (aP2). Il PPAR γ fa parte della superfamiglia di recettori nucleari dei fattori di trascrizione ligando-attivati e la sua espressione è un prerequisito per il differenziamento verso la linea adipocitica (Farmer 2006; Kajimura et al. 2008). La proteina di legame degli acidi grassi 4 (FABP4), comunemente nota come aP2 (Banaszak et al. 1994), è utilizzata estensivamente come marker per adipociti differenziati (Shan et al. 2013) essendo espressa anche da preadipociti (Soukas et al. 2001; Tchoukalova et al. 2004).

Dopo 2-3 settimane di coltura le cellule sono state lavate con DPBX 1X e fissate in formalina al 10% (Sigma) per 30' a TA. Rimossa la formalina le cellule sono state lavate con acqua sterile. Prima di aggiungere la soluzione colorante (oil red-O) le cellule sono lavate con

isopropanolo al 60% (incubazione di 5’ a TA) e colorate con una soluzione preparata fresca di oil red-O. La soluzione red-O è stata preparata a partire da uno stock in polvere puro di oil red al quale sono stati aggiunti 100 ml di isopropanolo assoluto (99%). La soluzione così preparata è stabile per circa un anno. Quindi è stata diluita in rapporto di 3:2 (3 parti di red-O e due di H_2O deionizzata) ed incubata per 10’ a TA prima di venir utilizzata. La working solution rimane stabile per non più di 2 ore dalla preparazione.

4.9.2. OSTEOGENESI

Per indurre il differenziamento osteogenico le ADhMSCs sono state seminate alla densità di $10\times10^3/cm^2$ in piastre multiwell da 6 pozzetti e coltivate per 2-3 settimane in un medium di induzione (Millipore) composto da DMEM-low glucose, supplementato con 10 % di FBS scomplementato (inattivazione termica a 56°C per 30'), 10mM β-glicerolfosfato, 0.2 mM acido ascorbico (come risorsa di fosfati), e 10nM dexametasone (Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit, Millipore). Il Medium è stato sostituito ogni 2-3 giorni. Per evidenziare il differenziamento osteogenico, le cellule sono state fissate e colorate con la soluzione di Alizarin Red S (ARS) (Puchtler et al. 1969) (***Figura 8***). Il saggio ARS è particolarmente versatile in quanto il colorante, che mette in evidenza i depositi di calcio indicativi di una funzione osteocitaria colorandoli di rosso-arancio, può essere allontanato dal monostrato colorato che risulta così pronto per essere analizzato al microscopio ottico e fotografato.

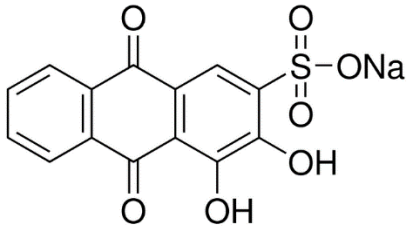


Figura 8: Formula chimica della Alizarin Red S (ARS)

Per la colorazione con Alizarin Red S, le cellule sono state fissate in formaldeide al 4% per 15' a TA. La formaldeide è stata allontanata e le cellule sono state lavate (4 volte) con acqua deionizzata , incubandole per 15' con l'ARS. Si è proceduto con la rilevazione fotografica dei depositi di calcio in rosso-arancio mediante l'ausilio di un microscopio ottico rovesciato (Leica, ingrandimento 100X).

Per valutare i profili di espressione genica dei due geni markers principali indicatori del differenziamento osteogenico, il fattore di trascrizione Runt 2 (RUNX-2) e la sialoproteina

ossea (BSP), è stato estratto l'RNA totale, retrotrascritto in cDNA e amplificato con la PCR in real time.

Il 'Runt-related transcription factor 2', Runx-2 (Cbfa1/PEBP2αA/AML-3/Osf2), fa parte della famiglia Runt di fattori di trascrizione e codifica una proteina nucleare essenziale per il differenziamento osteoblastico (Banerjee et al. 1997; Ducy et al. 1997).

Runx-2 interagisce con altre proteine native: C/EBPδ, pRB, proteine omeodominio, Ets1, fattori Smad e LEF-1 (Westendorf and Hiebert 1999; Kahler and Westendorf 2003), insieme al suo partner di legame CBFβ (Kundu et al. 2002; Miller et al. 2002; Yoshida et al. 2002). È un complesso multi-componente che lega le regioni promotore della maggior parte dei geni deputati all'osteogenesi. Ciò consente a Cbfa1 di stimolare direttamente i geni come: osteocalcina, osteopontina, collagene I, collagenasi 3, sialoproteina ossea, TGFβ receptore 1 della fosfatasi alcalina (ALP), C/EBPδ, e RANKL (recettore attivatore del ligando del fattore nucleare kappa B) (Ducy et al. 1997; Newberry et al. 1997; Selvamurugan et al. 1998; Harada et al. 1999; Kern et al. 2001; Shimizu-Sasaki et al. 2001).

Il secondo gene utilizzato come marker del differenziamento osteogenico e di cui è stato osservato il profilo di espressione genica è la sialoproteina ossea (Bone Sialoprotein, BSP). Essa è una delle glicoproteine non collagene più importanti della matrice extracellulare mineralizzata (ECM) ed è espressa abbondantemente nei tessuti mineralizzati (Gordon et al. 2007). Sebbene le proteine non collagene ed i proteoglicani contribuiscono in piccola misura alla massa totale della ECM, modulano un'ampia varietà di funzioni specifiche dell'osso tra cui la regolazione della mineralizzazione (Boskey et al. 1989; Harris et al. 2000), l'adesione cellulare (Horton et al. 1995; Roche et al. 1999; Harris et al. 2000) ed il riassorbimento / rimodellamento osseo. L'espressione di BSP è influenzata positivamente da RUNX-2 (Kirkham & Cartmell, 2007).

4.9.3. VASCULOGENESI

Esponendo le ADhMSCs ad un mix di molecole naturali quali l'acido ialuronico (H), butirrico (B) e retinoico (R), come dimostrato in letteratura, è possibile aumentare sensibilmente l'espressione dei geni della vasculogenesi, includendo i Fattori Vascolari di Crescita Endoteliali (VEGF) ed il fattore di von Willebrand (vWF) (Cavallari et al. 2012; Bianchi et al. 2013). Nel presente lavoro abbiamo esposto le cellule per 24-72h di un mix contenente H (2 mg/mL), B (5 mM), e R (1 μM) per indurre l'espressione del gene vasculogenico VEGF (Fattore Vascolare Endoteliale di Crescita) e del marker vascolare vWF.

L'analisi della formazione di una struttura capillary-like è stata performata utilizzando Cultrex® Basement Membrane Extract (BME, Thema), una forma solubile di membrana basale (BM) purificata dal tumore Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), che a 37°C forma una BM ricostituita. Strutture simili a capillari sono state osservate dopo 12-24h e fotografate utilizzando un microscopio ottico rovesciato equipaggiato con una fotocamera digitale della Nikon (100X).

In letteratura è riportato in un gran numero di studi il ruolo di VEGF come promotore della proliferazione, migrazione e sopravvivenza delle cellule endoteliali (Leung et al. 1989; Ferrara et al. 2003; Kowanetz and Ferrara 2006). Il Fattore Vascolare Endoteliale di Crescita (VEGF spesso definito VEGF-A), è un mitogeno selettivo per cellule endoteliali ed è un importante fattore di crescita vascolare e di angiogenesi (Liang et al. 2001) il cui gene VEGF è costituito da sette esoni separati da sei introni (Tischer et al. 1991). La via del segnale di trasduzione di VEGF ha un ruolo critico nella vasculogenesi embrionale e nell'angiogenesi (rispettivamente nella formazione e germinazione dei vasi sanguigni), durante il quale sia Flt-1 che FLK-1 (importanti nella formazione di precursori di cellule ematopoietiche e/o

endoteliali) risultano espressi nelle cellule endoteliali (Breier et al. 1992; Millauer et al. 1993; Quinn et al. 1993; Yamaguchi et al. 1993; Breier et al. 1995; Dumont et al. 1995; Flamme et al. 1995; Fong et al. 1995; Cleaver et al. 1997; Fouquet et al. 1997; Liao et al. 1997).

Il fattore di von Willebrand (vWF) è uno dei fattori che interagiscono nella cascata biochimica della coagulazione; è una glicoproteina ematica di circa 250kDa sintetizzata principalmente dalle cellule endoteliali e per questo utilizzata spesso come marker del differenziamento vasculogenico (Sadler 1998).

4.10 SPSS v.13

Statistical Package for Social Science, version 13

L'analisi statistica è stata effettuata con l'ausilio dello Statistical Package for Social Science, version 13. Per il presente studio sono stati utilizzati test statistici non parametrici: il Friedman e Wilcoxon-signed rank test. Il primo è stato utilizzato per rilevare le differenze nei trattamenti; il secondo è stato usato per valutare, nello stesso gruppo, le differenze (delta Ct) tra i dati rilevati in un periodo di osservazione relativo alle cellule trattate e non trattate. I risultati del test sono tutti considerati statisticamente significativi con un $P < 0,05$.

5. RISULTATI

5.1. LA VITALITÀ CELLULARE VIENE INFLUENZATA DAL B.E.N.E.

Il trattamento delle cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo con la tecnologia REAC del modello B.E.N.E., procotollo TO-RGN ha notevolmente influenzato la vitalità cellulare.

Ciò è stato dimostrato dalla sua capacità di migliorare notevolmente il numero di cellule vitali nelle ADhMSCs sottoposte al trattamento rispetto a quelle non trattate definite controlli (***Figura 9***). Il saggio della SA-β–Gal effettuato sulle ADhMSCs coltivate in assenza/presenza dello stimolo TO-RGN durante il periodo di osservazione di 90 giorni è posto in evidenza in ***Figura 10***.

Il numero di cellule positive al SA-β–Gal (blu) è risultato significativamente ridotto nel 5 passaggio delle ADhMSCs trattate con la tecnologia REAC rispetto a quelle che non hanno subito il trattamento.

Questa tendenza è diventata ancora più evidente ai passaggi più alti con un progressivo incremento nel numero di cellule che risultavano positive al SA-β–Gal tra i controlli rispetto alle cellule esposte al protocollo TO-RGN (***Figura 10*** pannelli A – F). Si sottolinea inoltre che agli ultimi passaggi si è evidenziata una rimarchevole differenza tra controlli e trattati, nel numero di cellule positive al saggio e nell'intensità di colorazione.

Un'analisi separata della morfologia cellulare ha rivelato che a differenza delle cellule di controllo, che hanno sviluppato una morfologia sofferente negli ultimi passaggi, le cellule esposte al protocollo TO-RGN conservano la classica morfologia fibroblast-like, anche ai passaggi più alti, 25 e 30.

In particolare, il rapporto lunghezza/larghezza è risultato maggiore nelle cellule trattate con la tecnologia REAC, compresa tra 8,078 ± 0,6 e 5,043 ± 0,55 (media ± SD calcolata su dieci colture diverse cellulari esposte al REAC ai passaggi 25 e 30), rispetto alle cellule non trattate, nelle quali il rapporto si è rilevato compreso tra 5,025 ± 0,35 e 3,993 ± 0,33 (media ± SD calcolata su dieci colture diverse cellulari di controllo non esposte al REAC ai passaggi 25 e 30).

5.2 SENESCENZA E CAPACITÀ DIFFERENZIATIVA SONO INFLUENZATE DALLA TECNOLOGIA REAC

5.2.1. SENESCENZA

5.2.1.1. $p16^{INK4}$, ARF, p53 e p21

I profili di espressione genica di $p16^{INK4}$, ARF, p53 e p21 nelle ADhMSCs ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25, e 30 trattate o meno con protocollo TO-RGN per 4, 8, o 12 h, sono mostrati in ***Figure 11-12-13-14***. L'espressione dei geni p16, p53 ARF e p21 è risultata maggiore nelle ADhMSCs non trattate rispetto a quelle sottoposte alla tecnologia REAC, in tutti i passaggi di coltura, con particolare rilievo per gli ultimi, il 25 ed il 30. Si è mostrato inoltre come le ADhMSCs ai passaggi 5 e 30 trattate con protocollo TO-RGN hanno una capacità di differenziazione superiore rispetto alle cellule non trattate, verso il fenotipo adipogenico, osteogenico, e la linea vascolare.

5.2.1.2. BMI1: il regolatore della pathway telomerasi-indipendente

È stata valutata l'espressione genica di BMI1 attraverso Real-Time PCR sia nelle cellule controllo che nelle ADhMSCs esposte al trattamento fisico per 4h-8h- e 12h ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25 e 30. Nelle cellule non esposte, i livelli di trascrizione diminuiscono progressivamente nei passaggi più alti (***Figura 15***, pannelli A-F). Al contrario, il trattamento

REAC TO-RGN contrasta in modo significativo la down-regolazione della trascrizione di BMI1 passaggio-dipendente, in tutte le finestre di osservazione dell'esperimento (***Figura 15***, pannelli A-F).

5.2.1.3. hTERT: il regolatore della pathway telomerasi-dipendente

L'espressione genica della sub unità catalitica della telomerasi (TERT) è stata valutata mediante Real-time PCR nelle ADhMSCs coltivate ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25, e 30 in assenza o presenza del trattamento REAC per 4, 8 o 12 ore. L'espressione di TERT è diminuita durante i passaggi di coltura indagati nelle ADhMSCs di controllo, mentre si è mantenuta ad alti livelli nelle cellule esposte al trattamento REAC TO-RGN in tutti i passaggi esaminati (***Figura 20*** pannelli A-F). Tale risposta trascrizionale non è stata significativamente influenzata dal periodo di esposizione durante i primi passaggi, quando già un trattamento di 4 ore era sufficiente per raggiungere un massimo aumento dei livelli di mRNA TERT (***Figura 20*** pannelli A, B). Nei passaggi più alti, compresi il 25 e 30, era richiesta una più prolungata esposizione allo stimolo, 8h-12h per raggiungere il massimo incremento nella trascrizione di TERT (***Figura 20*** pannelli C-F). Dall'analisi della lunghezza dei telomeri (***Figura 22***) emerge come la lunghezza dei telomeri è diminuita sia nelle cellule esposte alla tecnologia REAC che in quelle non esposte, all'aumentare dei passaggi in particolare tra il 5-20 mentre nelle ADhMSCs esposte al trattamento REAC protocollo TO-RGN si è osservato un significativo, sebbene incompleto, recupero della lunghezza dei telomeri, in particolare nei passaggi più alti, 20, 25 e 30 rispetto al controllo di base (***Figura 22*** pannelli G, H). Nelle cellule ADhMSCs controllo, non trattate, si ha dunque una progressiva riduzione della lunghezza dei telomeri nei passaggi più alti, rispetto alle ADhMSCs coltivate al passaggio 1 (definito come " condizione basale").

5.2.1.4. Il REAC stimola i geni della 'giovinezza'

La tecnologia REAC TO-RGN influenza l'espressione dei geni che controllano la pluripotenza delle cellule staminali.

L'analisi trascrizionale dei passaggi più alti ha dimostrato che l'esposizione alla tecnologia REAC TO-RGN è in grado di regolare con precisione la trascrizione dei geni principali che regolano la staminalità. In particolare, durante un periodo di esposizione di 4h-12h l'espressione genica di Oct4, Sox2, Nanog, e cMyc era significativamente aumentata nelle ADhMSCs esposte al REAC nei passaggi 10, 15, 20, 25 e 30, rispetto alle cellule non esposte (***Figura 16***, ***Figura 17***, ***Figura 18***, ***Figura 19***). Quanto evidenziato dai profili di espressione genica è stato confermato dall'analisi al Western blotting che ha rivelato come il trattamento REAC aumentati l'espressione delle proteine di Oct4 e Sox2.

5.2.2. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

Il differenziamento adipogenico ha mostrato molteplici cellule adipocitiche multivacuolate, la cui dimensione è aumentata con il tempo di induzione (***Figura 23***). Inoltre, le ADhMSCs esposte al protocollo TO-RGN al 30 passaggio hanno mostrato profili di espressione genica dei marker dell'adipogenesi, aP2 e PPAR γ, maggiori rispetto alle cellule di controllo (***Figura 23***, pannello a) ai 7d.

5.2.3. DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

Il differenziamento osteogenico si è rivelato già a partire dalla prima settimana di induzione con l'osservazione di variazioni morfologiche e, alla fine del periodo di induzione, dalla formazione di matrice e di depositi di calcio mineralizzati come dimostrato mediante colorazione con l'Alizarin Red (***Figura 24***, pannelli b). L'analisi di espressione genica dei marker associati all'osteogenesi, RUNX2 e BSP ha rivelato livelli di espressione più elevati

di entrambi i fattori nelle ADhMSCs trattate con TO-RGN, rispetto alle cellule di controllo (***Figura 24***, pannelli b) ai 7d.

5.2.4 DIFFERENZIAMENTO VASCULOGENICO

Il differenziamento vasculogenico è stato valutato nei controlli e nelle ADhMSCs trattate con protocollo TO-RGN e coltivate per 24 ore in terreno semisolido, ai passaggi 5 e 30 (***Figura 25***, pannelli c). Il trattamento con la tecnologia REAC ha aumentato sia il numero di capillari che l'aggregazione, rispetto alle cellue non esposte (***Figura 25***, pannelli c). La maggiore capacità differenziativa dei trattati rispetto ai controlli è stata desunta anche dalla maggiore espressione dei geni associati alla vasculogenesi: VEGF e vWF (***Figura 25***, pannelli c).

6. CONCLUSIONI

I dati rilevati dal presente lavoro confermano come la capacità rigenerativa delle cellule staminali isolate da pazienti anziani sia minore rispetto ai soggetti giovani (Lapasset et al. 2011). Queste alterazioni età dipendenti, insieme ad un ridotto potenziale auto rigenerativo delle cellule staminali adulte, possono essere osservate anche durante la coltura in vitro delle cellule per un lungo periodo (Chambers and Goodell 2007).

Pertanto, l'individuazione di una strategia che possa ripristinare i segnali molecolari di controllo della senescenza nelle cellule staminali, in vitro, può rappresentare un progresso importante per lo sviluppo di una futura terapia cellulare.

In effetti, progressi in un prospettico impiego in medicina rigenerativa sono stati ottenuti invertendo il fenotipo senescente di cellule staminali mediante l'impiego di vettori virali (Sawada et al. 2007). Un analogo ringiovanimento cellulare è stato osservato dopo coltura in ambiente ipossico (Malladi et al. 2007; Leontieva et al. 2012; De Barros et al. 2013), una condizione che influenza la proliferazione ed il destino delle cellule (Malladi et al. 2007; Mohyeldin et al. 2010), sebbene si sia osservato come l'ipossia induce apoptosi nelle cellule staminali derivate da midollo osseo (Zhu et al. 2006).

Nel presente lavoro abbiamo analizzato gli effetti del trattamento con l'innovativa tecnologia REAC e procollo TO-RGN sulle ADhMSCs in senescenza in vitro, e dimostrato che questo trattamento fisico, senza l'ausilio di vettori virali, è capace di contrastare i cambiamenti biochimici e morfologici che si verificano nelle cellule staminali durante l'invecchiamento.

Tale conclusione è stata dedotta da un certo numero di osservazioni correlate, tra cui:

(1) l'efficacia della tecnologia REAC con protocollo di stimolazione TO-RGN nel diminuire sia il numero di cellule positive al saggio della SA-β–Gal che l'intensità della loro colorazione;

(2) la capacità delle cellule trattate con il protocollo TO-RGN nel mantenere la tipica morfologia delle ADhMSCs fibroblast-like, rispetto al tipico fenotipo senescente acquisito dalle cellule mantenute in coltura prolungata e non esposte alla trattamento;

(3) il notevole mantenimento del potenziale di differenziamento multilinea nelle cellule ADhMSCs esposte al trattamento con protocollo TO-RGN. Si è osservato come le cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo e stimolate con la tecnologia REAC mantenevano anche nei passaggi più alti la loro capacità di differenziare verso i fenotipi adipogenico, osteogenico, e vascologenico. Dato importante se raffrontato al calo della multi-potenzialità osservato nelle cellule ADhMSCs non esposte al trattamento, in particolare nei passaggi più alti.

Abbiamo inoltre osservato come il trattamento con tecnologia REAC TO-RGN abbia la capacità di antagonizzare in modo efficiente la down-regolazione della trascrizione di BMI1 durante i passaggi multipli delle ADhMSCs in vitro e questo suggerisce la possibilità di utilizzare un 'ambiente fisico' per controllare una parte del patterning molecolare che regola la senescenza cellulare durante i processi di rimodellamento della cromatina.

La rilevanza di un tale risultato è evidenziata dall'osservazione che BMI1 è trascrizionalmente down-regolata quando le cellule sono soggette a senescenza replicativa (Bianco et al. 2001; Itahana et al. 2003; Molofsky et al. 2003).

Abbiamo osservato come l'esposizione al REAC TO-RGN abbia incrementato anche la trascrizione dei geni della staminalità Oct4, Sox2, Nanog, e cMyc. Quest'ultimo è un importante regolatore positivo del gene BMI1(Guney and Sedivy 2006), e migliora l'espressione delle proteine correlate con la staminalità tra cui Oct4 e Sox2. Queste osservazioni indicano che la tecnologia REAC interferisce attivamente con un circuito molecolare complesso responsabile del controllo della capacità delle cellule staminali di auto-rinnovarsi e che coinvolge sia la regolazione della senescenza cellulare telomerasi-indipendente (via BMI1) che la pluripotenza cellulare.

Abbiamo dimostrato inoltre che l'esposizione alla tecnologia REAC TO-RGN delle ADhMSCs ha influenzato anche i meccanismi di senescenza telomerasi-dipendente, migliorando l'espressione trascrizionale di TERT, e contrastando l'accorciamento dei telomeri.

In questo studio, abbiamo osservato che, mentre nel corso del primo passaggio l'aumento della trascrizione di TERT REAC-mediato non si verifica in funzione del tempo di esposizione, nei passaggi tardivi (dal 20 al 30) si rileva una risposta trascrizionale massima come conseguenza del tempo di esposizione al trattamento REAC TO-RGN. Questo è probabilmente dovuto all'intervallo di tempo necessario per contrastare la flessione dell'espressione dei geni anti-aging che diventa sempre più accentuata nei passaggi più alti. Da segnalare che il trattamento REAC TO-RGN, pur non esercitando un effetto apprezzabile sull'accorciamento dei telomeri che si verifica spontaneamente ai passaggi brevi, è al contrario in grado di contrastare l'accorciamento dei telomeri che si sviluppa nei passaggi più alti, quando la senescenza delle cellule in coltura diventa più pronunciata.

E' ormai evidente come la senescenza sia regolata anche da specifici geni mediatori, che si accumulano durante la vita delle cellule, tra cui $p16^{INK4}$, $p19^{ARF}$, p53, e $p21^{CIP1}$. In particolare $p16^{INK4}$ ed ARF inibiscono l'attività delle cicline chinasi 4-6 (CDK4-6) essenziali per la progressionede del ciclo cellulare in fase G1 mentre p53 regola l'espressione di $p21^{CIP1}$, che inibisce la ciclina dipendente della chinasi 2 (CDK2), un regolatore della fase S (Zou et al. 2002).

Abbiamo osservato come l'esposizione delle cellule alla terapia TO-RGN è anche efficace nel contrastare l'up-regolazione progressiva di questi geni che si verifica durante passaggi multipli in coltura che simulano la senescenza cellulare.

Queste osservazioni supportano un futuro impiego clinico della tecnologia REAC come strumento potenziale per limitare le malattie degenerative legate all'età. Ulteriori studi sono in corso per comprendere meglio i meccanismi molecolari che stanno alla base dell'effetto della tecnologia REAC TO-RGN nel contrastare la senescenza cellulare in vitro, e per valutare l'azione del REAC TO-RGN in modelli animali con disturbi geriatrici in vivo.

7. TAVOLE GRAFICHE

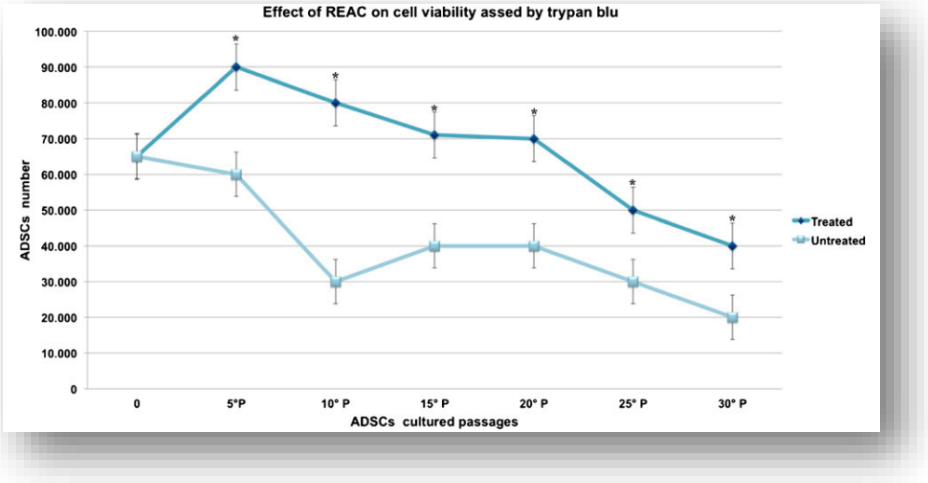


Figura 9: Test di esclusione del Trypan Blu. Effetti della tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN applicato per 12h continuative *(giudicato il più rappresentativo tra i tempi di esposizione allo stimolo fisico)* sulla vitalità cellulare di ADhMSCs sottoposte (Treated) e non (Untreated) al trattamento.

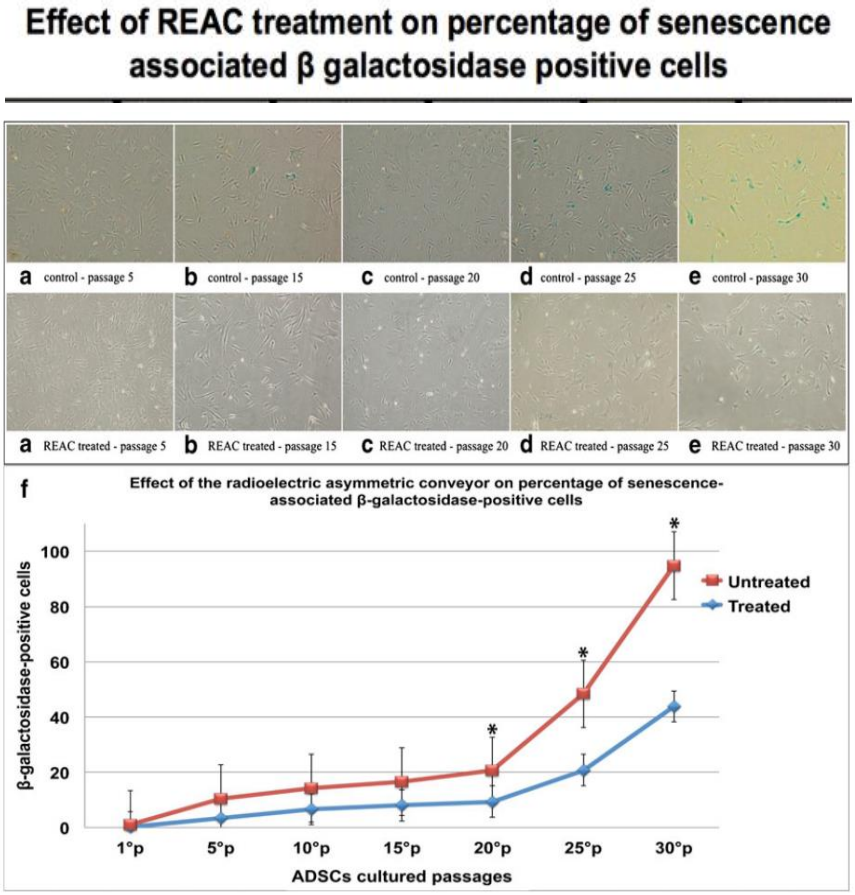


Figura 10: Sa-β-gal. Effetti della tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN applicato per 12 ore continuative *(giudicato il più rappresentativo tra i tempi di esposizione allo stimolo fisico)* sulla percentuale di senescenza cellulare di ADhMSCs sottoposte (Treated) e non (Untreated) al trattamento, associata alla beta galattosidasi lisosomiale.



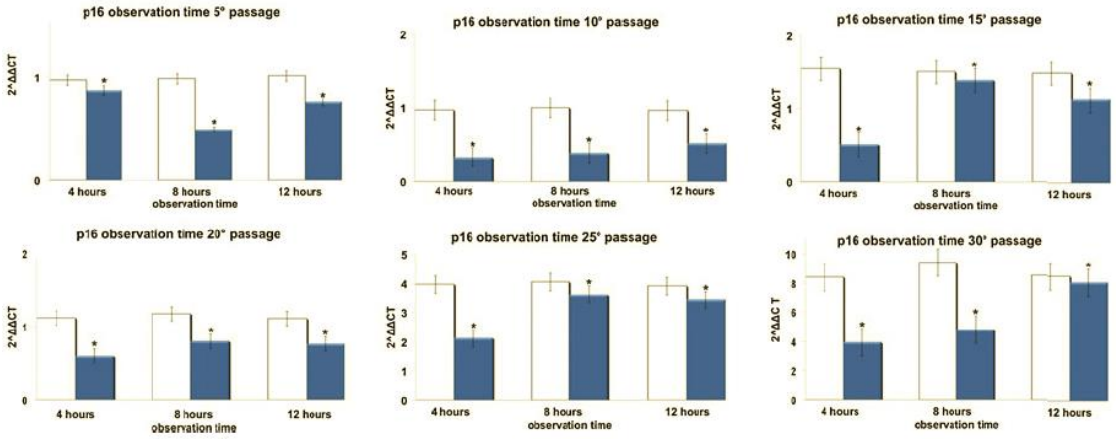


Figura 11: Profili di espressione genica dell'inibitore delle chinasi cicline dipendenti p16 in cellule ADhMSCs sottoposte (istogrammi in colore) o non (istogrammi in bianco) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold). Il delta è calcolato come differenza tra il CT del campione in analisi ed il relativo gene housekeeping, ovvero il normalizzatore che nella nostra sperimentazione è l'ipoxantina fosforibosil transferasi1 (HPRT1), un gene espresso costitutivamente che ha la funzione primaria di portare alla sintesi dei nucleotidi a base di purina. I livelli di mRNA sono stati espressi come folde of change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dei livelli di espressione genica delle cellule ADhMSCs trattate con la tecnologia REAC e protocollo TO-RGN rispetto ai relativi controlli (cellule non trattate) stabilendo il 5° passaggio come time 0 o inizio del trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata con l'ausilio dello Statistical Package for Social Science, version 13. Per il presente studio sono stati utilizzati test statistici non parametrici: il Friedman e Wilcoxon-signed rank test. Il primo è stato utilizzato per rilevare le differenze nei trattamenti; il secondo è stato usato per valutare, nello stesso gruppo, le differenze (delta Ct) tra i dati rilevati in un periodo di osservazione relativo alle cellule trattate e non trattate. Gli asterischi di significatività sono stati inseriti per P_{value} <0,05.

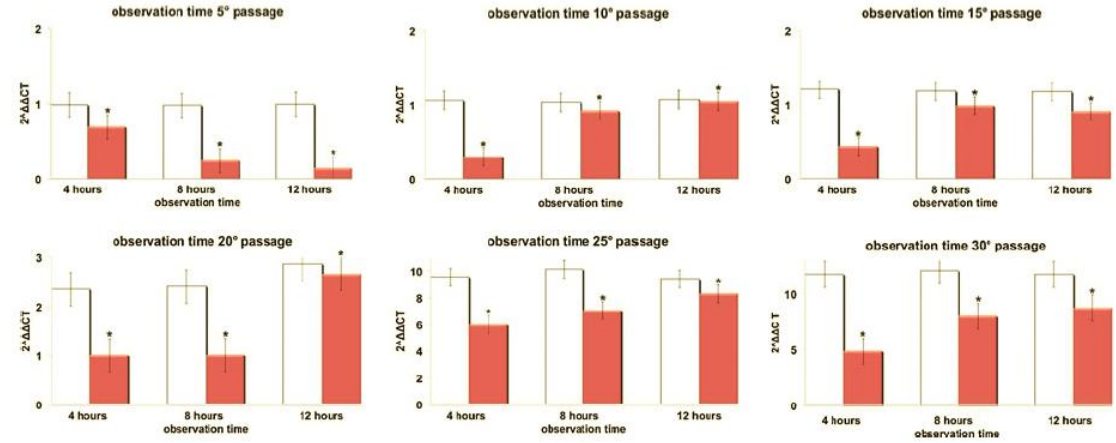


Figura 12: Profili di espressione genica di $p19^{ARF}$ in cellule ADhMSCs sottoposte (istogrammi in colore) o non (istogrammi in bianco) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold). L'analisi statistica è stata effettuata con l'ausilio dello Statistical Package for Social Science, version 13. Per il presente studio sono stati utilizzati test statistici non parametrici: il Friedman e Wilcoxon-signed rank test. Il primo è stato utilizzato per rilevare le differenze nei trattamenti; il secondo è stato usato per valutare, nello stesso gruppo, le differenze (delta Ct) tra i dati rilevati in un periodo di osservazione relativo alle cellule trattate e non trattate. Gli asterischi di significatività sono stati inseriti per P_{value} <0,05.



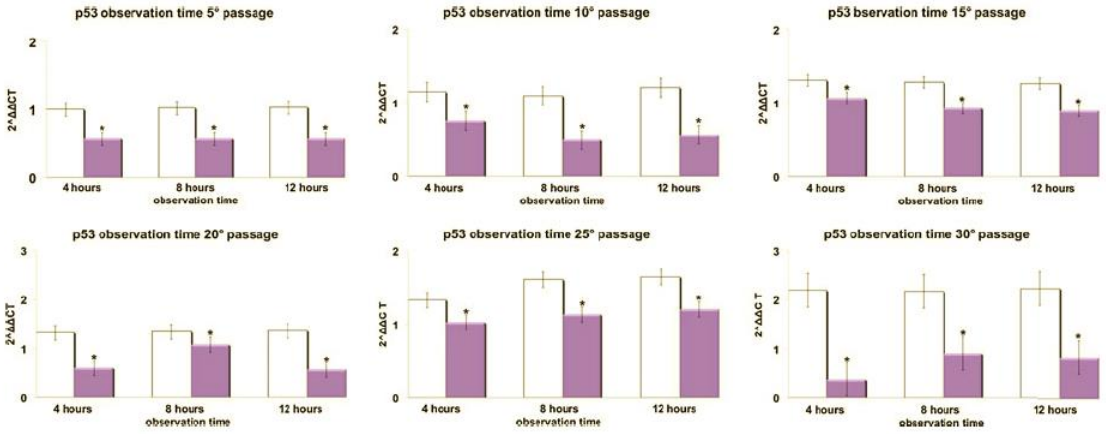


Figura 13: Profili di espressione genica dell'oncosoppressore 'guardiano del genoma' p53 in cellule ADhMSCs sottoposte (istogrammi in colore) o non (istogrammi in bianco) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold). L'analisi statistica è stata effettuata con l'ausilio dello Statistical Package for Social Science, version 13. Per il presente studio sono stati utilizzati test statistici non parametrici: il Friedman e Wilcoxon-signed rank test. Il primo è stato utilizzato per rilevare le differenze nei trattamenti; il secondo è stato usato per valutare, nello stesso gruppo, le differenze (delta Ct) tra i dati rilevati in un periodo di osservazione relativo alle cellule trattate e non trattate. Gli asterischi di significatività sono stati inseriti per P_{value} <0,05

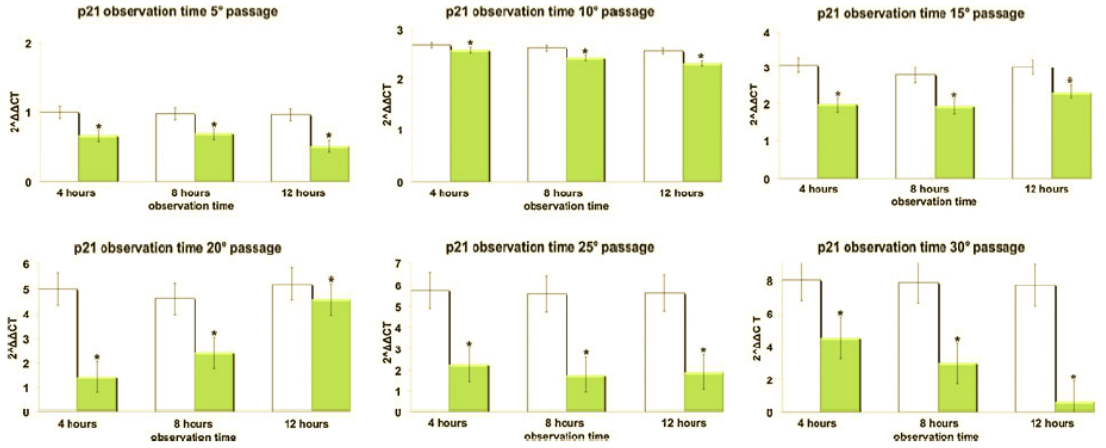


Figura 14: Profili di espressione genica di p21 in cellule ADhMSCs sottoposte (istogrammi in colore) o non (istogrammi in bianco) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold). L'analisi statistica è stata effettuata con l'ausilio dello Statistical Package for Social Science, version 13. Per il presente studio sono stati utilizzati test statistici non parametrici: il Friedman e Wilcoxon-signed rank test. Il primo è stato utilizzato per rilevare le differenze nei trattamenti; il secondo è stato usato per valutare, nello stesso gruppo, le differenze (delta Ct) tra i dati rilevati in un periodo di osservazione relativo alle cellule trattate e non trattate. Gli asterischi di significatività sono stati inseriti per P_{value} <0,05.



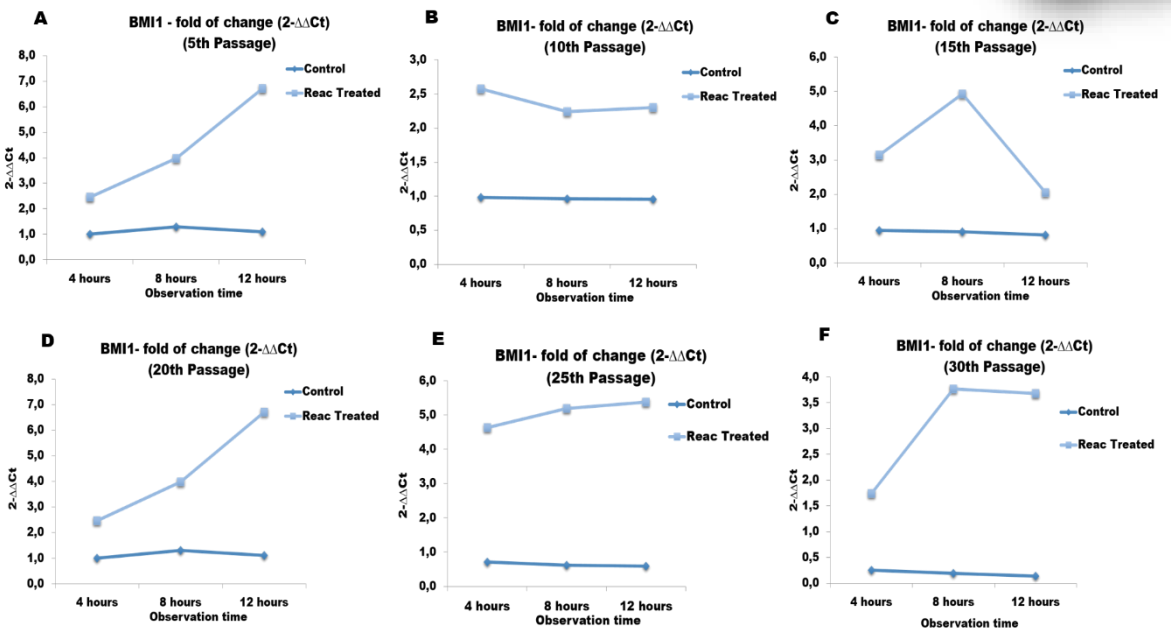


Figura 15: Profili di espressione genica di BMI1 in cellule ADhMSCs sottoposte (linee chiare) o non (linee scure) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold). L'analisi statistica è stata effettuata con l'ausilio dello Statistical Package for Social Science, version 13.

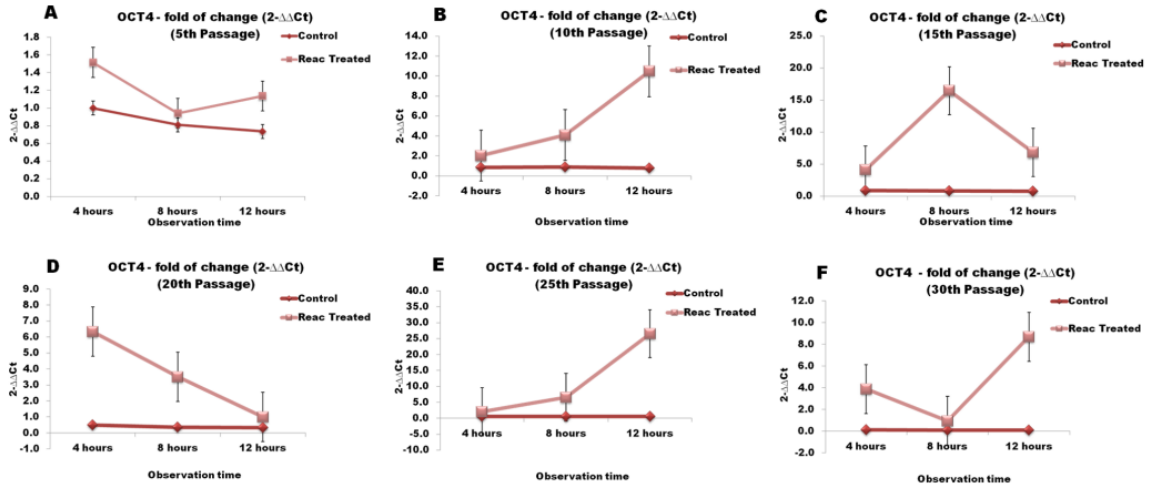


Figura 16: Profili di espressione genica di OCT4 in cellule ADhMSCs sottoposte (linee chiare) o non (linee scure) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold).



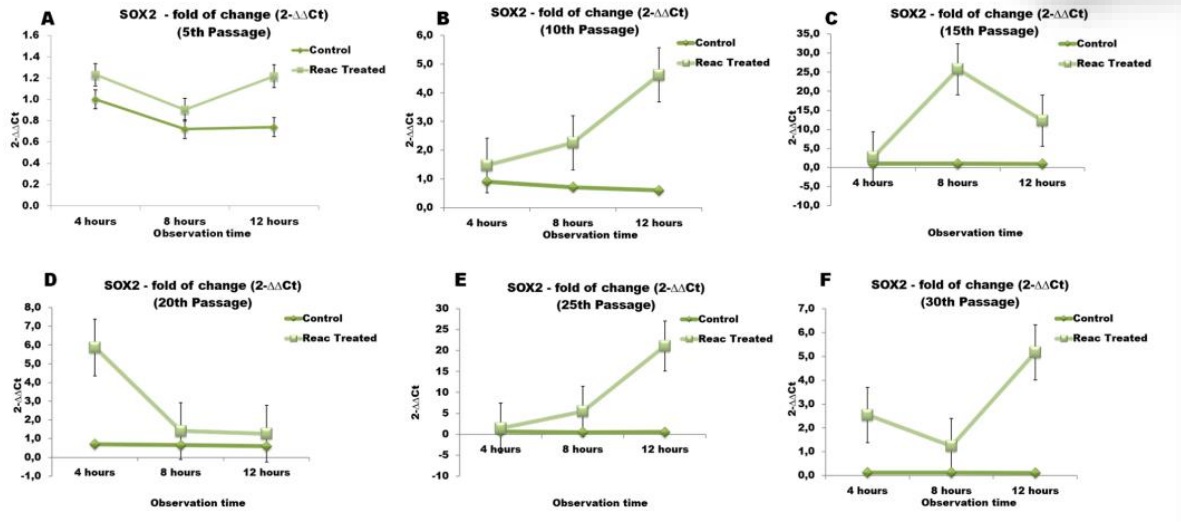


Figura 17: Profili di espressione genica di SOX2 in cellule ADhMSCs sottoposte (linee chiare) o non (linee scure) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold).

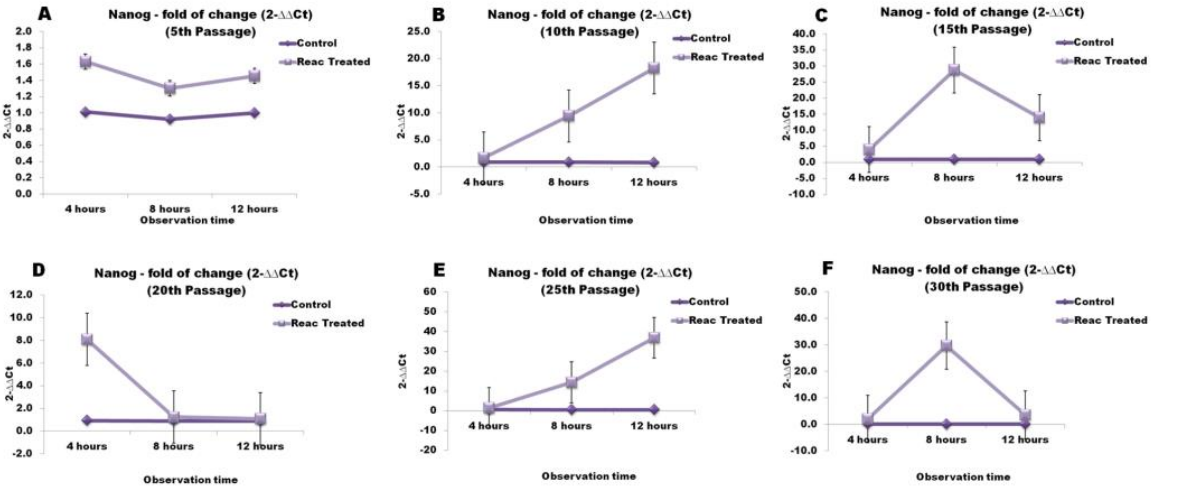


Figura 18: Profili di espressione genica di Nanog in cellule ADhMSCs sottoposte (linee chiare) o non (linee scure) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold).



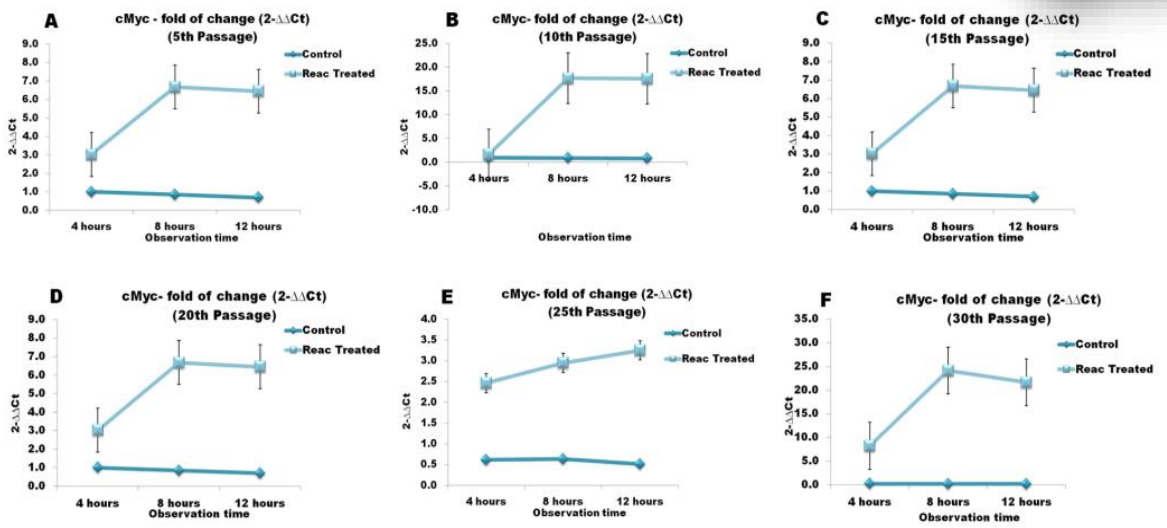


Figura 19: Profili di espressione genica di cMyc in cellule ADhMSCs sottoposte (linee chiare) o non (linee scure) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold).

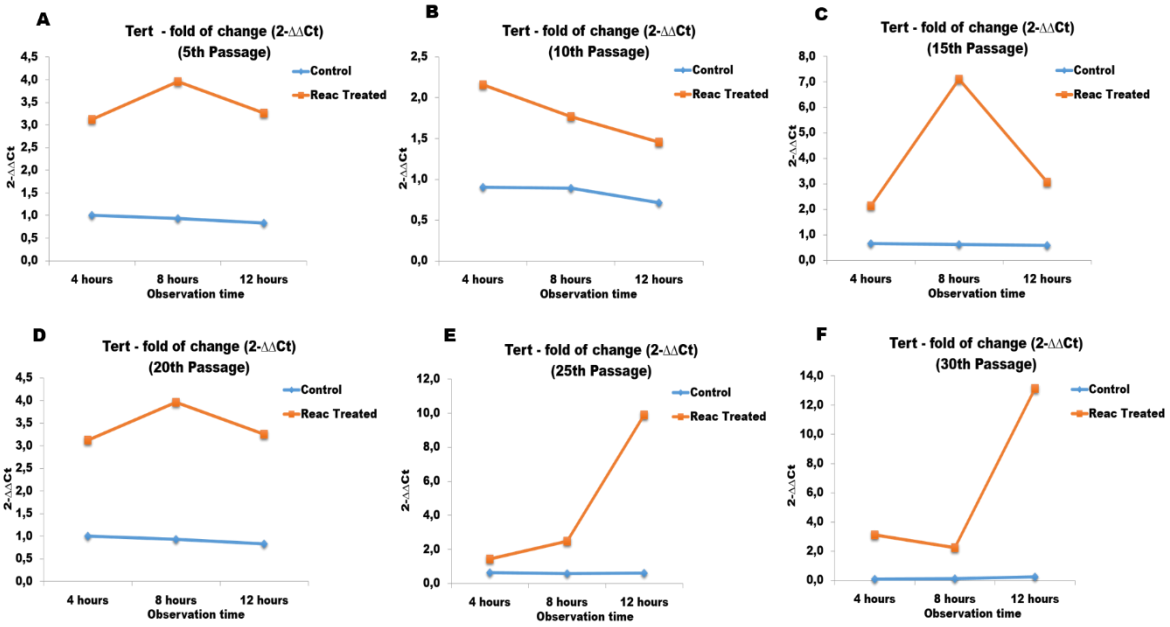


Figura 20: Profili di espressione genica di hTERT in cellule ADhMSCs sottoposte (linee rosse) o non (linee blu) al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 4h-8h-12h continuative ai passaggi 5-10-15-20-25-30. L'espressione genica è stata determinata usando il metodo del "delta-CT" (Cycle Threshold).

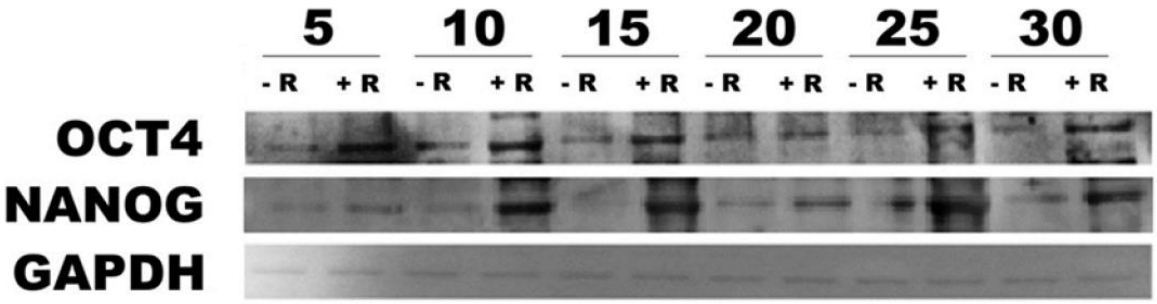


***Figura 21*: Effetto del trattamento con tecnologia REAC protocollo TO-RGN sull'espressione proteica di Oct4 e Sox2. È stato isolato il lisato totale dalle ADhMSCs esposte per 12h (giudicato il più rappresentativo tra i tempi di esposizione allo stimolo fisico) in presenza (+R) o assenza (-R) dello stimolo REAC, ai passaggi 5, 10, 15, 20, 25 e 30. I campioni sono stati analizzati con la tecnica del Western blot, usando anticorpi policlonali anti Oct4, Sox2 e GAPDH. La dimensione delle bande è stata determinata utilizzando un marker proteico specifico. Il dato rappresentato è il più rappresentativo dei cinque esperimenti indipendenti effettuati.**

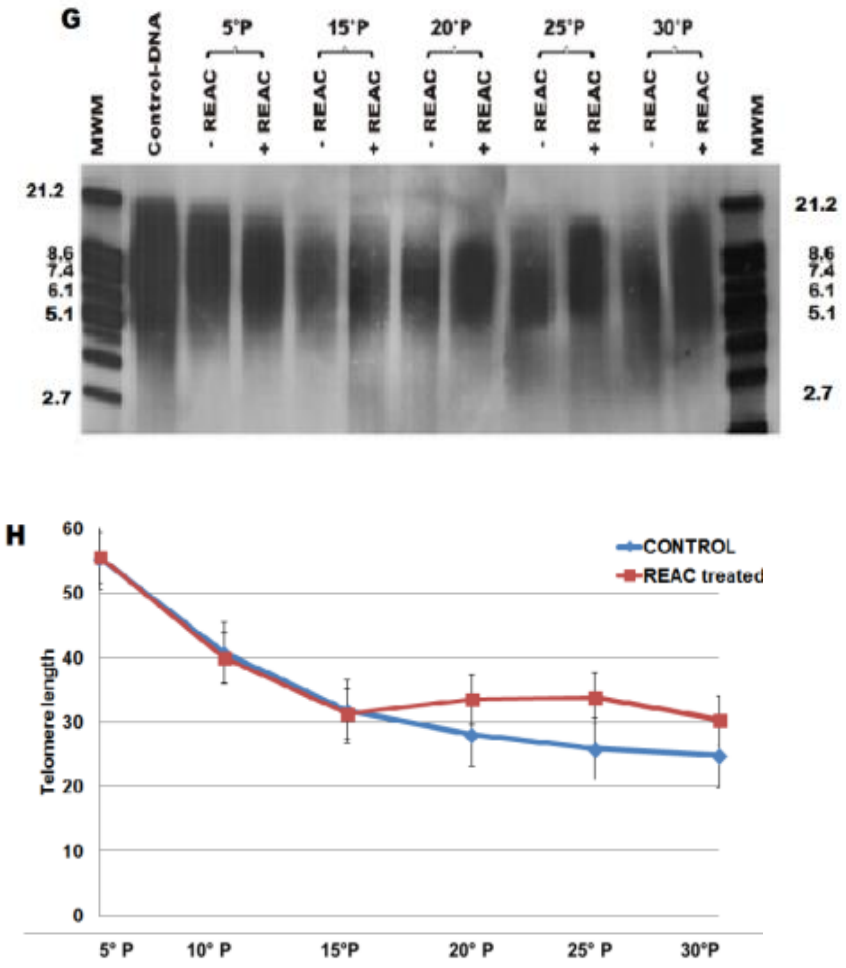


Figura 22: Analisi della lunghezza dei telomeri nelle cellule ADhMSCs sottoposte o non al trattamento con tecnologia REAC, protocollo di stimolazione TO-RGN per 12h continuative (giudicato il più rappresentativo tra i tempi di esposizione allo stimolo fisico) ai passaggi 5-10-15-20-25-30 con kit Telo TAGGG telomere lenght assay (Roche) in accordo con il protocollo del produttore. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il Qiamp DNA blood mini kit (Qiagen), ai passaggi 5, 15, 20, 25 e 30 dalle cellule ADhMSCs controllo (REAC -) e da quelle esposte (REAC +) alla tecnologia REAC per 12 ore continuative. Pannello G: la lunghezza media dei TRF è stata determinata confrontando la posizione della TRF sulla membrana in relazione ad uno standard dal molecolare conosciuto. Il segnale di chemioluminescenza è stato acquisito utilizzando lo strumento VersaDoc Imaging System (BioRad). La lunghezza media dei TRF è stata definita in base alla formula definita nel kit. Pannello H: i dati densitometrici calcolati con il software dedicato della Quantit-One sono stati trasposti in un grafico che ha evidenziato come la tecnologia REAC non influenzi significativamente l'accorciamento fisiologico dei telomeri nelle cellule ai primi passaggi, sia trattate (linea blu) che non trattate (linea rossa) con lo stimolo fisico. Nei passaggi più alti, al contrario la stimolazione con il protocollo TO-RGN per 12h continuative delle ADhMSCs in senescenza determina un parziale ripristino della lunghezza dei telomeri.

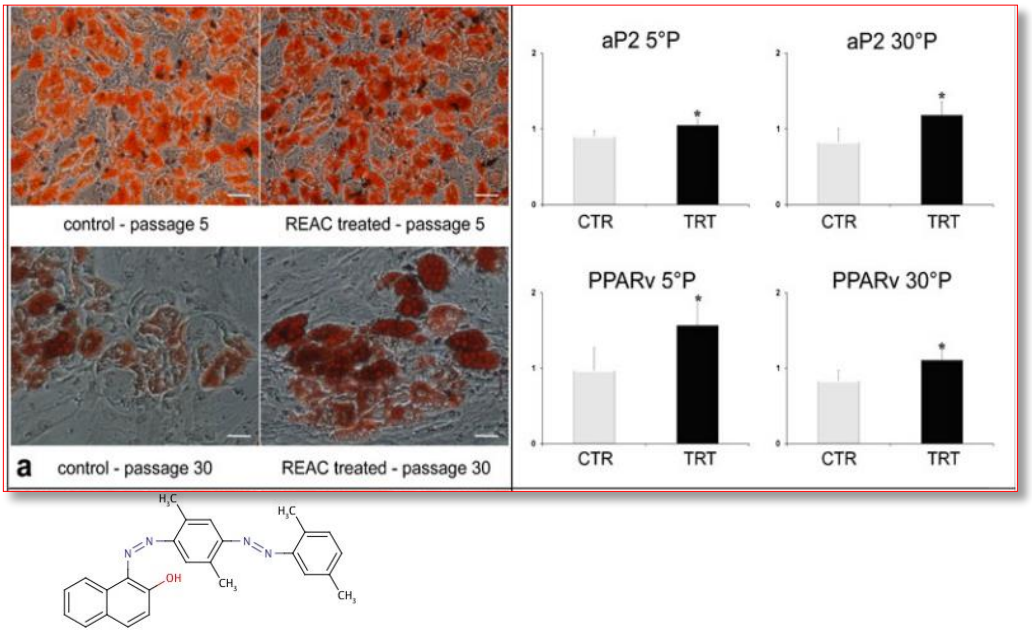


Figura 23: Saggio del RED-Oil-O per evidenziare il mantenimento della capacità di differenziamento adipogenico in ADhMSCs trattate (REAC treated) e non (control) con il protocollo TO-RGN per 12h continuative (giudicato il più rappresentativo tra i tempi di esposizione allo stimolo fisico) ai passaggi 5 e 30. Profili di espressione genica dei principali marker per il differenziamento adipogenico: aP2 e PPAR γ.

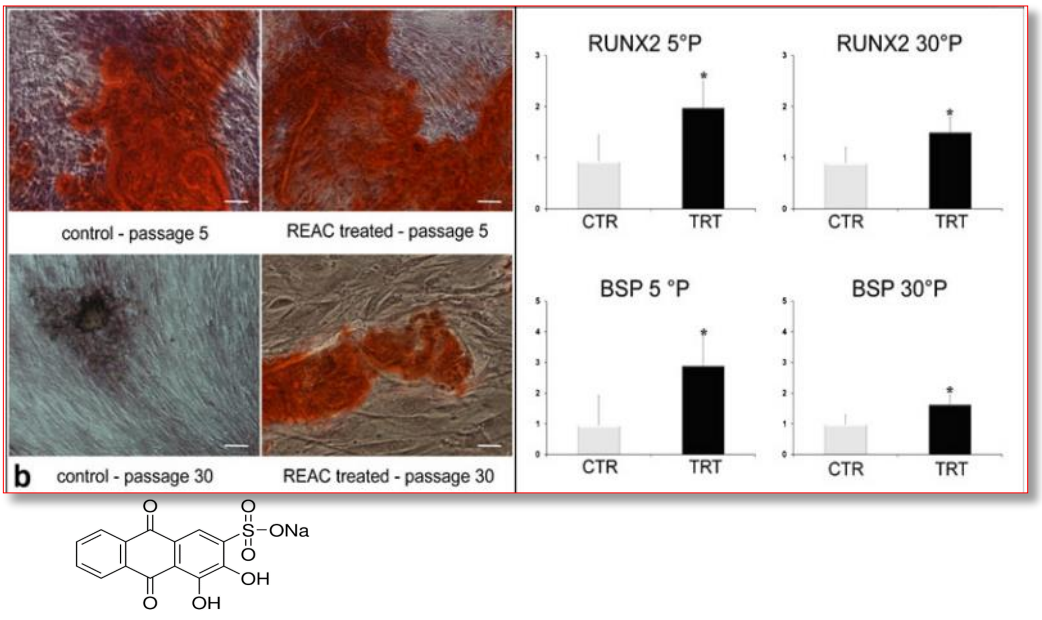


Figura 24: Saggio della Alizarin RED-S (ARS) per evidenziare il mantenimento della capacità di differenziamento osteogenico in ADhMSCs trattate (REAC treated) e non (control) con il protocollo TO-RGN per 12h continuative (giudicato il più rappresentativo tra i tempi di esposizione allo stimolo fisico) ai passaggi 5 e 30. Profili di espressione genica dei principali marker per il differenziamento osteogenico: RUNX e BSP.

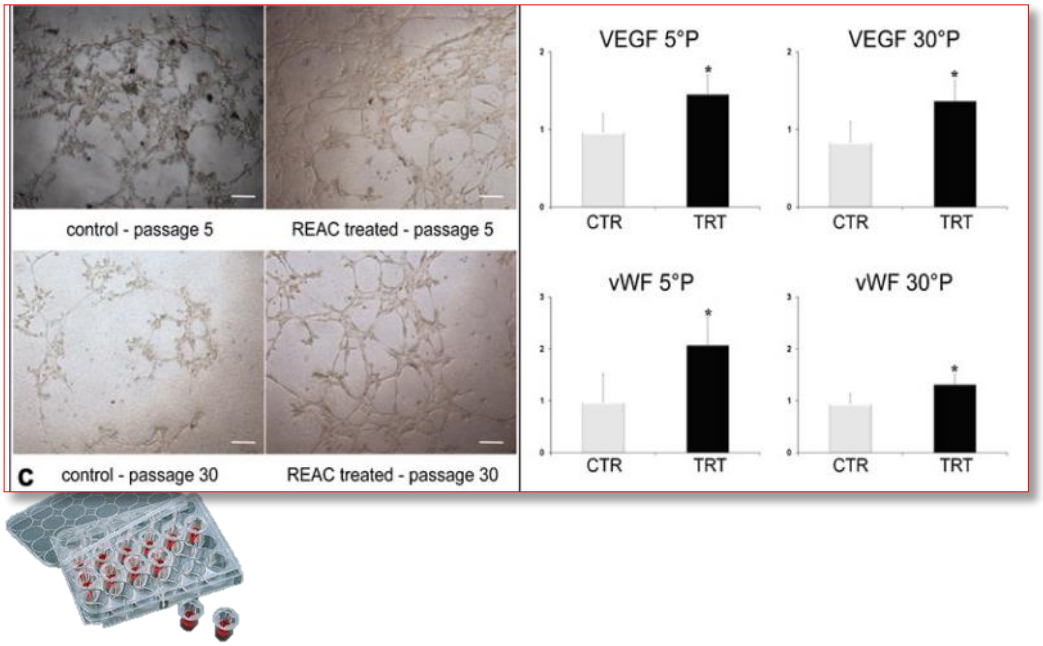


Figura 25: Il differenziamento vasculogenico è stato valutato con l'analisi della formazione di una struttura capillary-like performata utilizzando Cultrex® Basement Membrane Extract (BME, Thema), e con l'analisi dei profili di espressione genica dei principali marker per il differenziamento osteogenico: VEGF e vWF.

8. BIBLIOGRAFIA

8.1 LIBRI e TESI DI DOTTORATO

Abbas A.K, Aster J.C, Kumar V. Edra Masson, 2013: Robbins – Fondamenti di Patologia e Fisiopatologia. Pag 26,27.

Becker T., Haferkamp S. Molecular Mechanisms of Cellular Senescence, Chapter 2, Senescence and Senescence-Related Disorders, 2013

Castellano , I. (2006). Caratterizzazione biochimica della superossido dismutasi dall'eubatterio psicrofilo pseudoalteromonas haloplanktis: ruolo regolatorio di un residuo di cisteina molto reattivo.

Kirkham G. & Cartmell S. Genes and Osteogenesis , Chapter 13, Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007.)

Timiras PS. Physiological Basis of Aging and Geriatrics. Third ed. Boca Raton: CRC Press 2003.

8.2 ARTICOLI

Abbott MH, Murphy EA, Bolling DR, Abbey H. 1974. The familial component in longevity. A study of offspring of nonagenarians. II. Preliminary analysis of the completed study. *The Johns Hopkins medical journal* **134**: 1-16.

Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 13742-13747.

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 10114-10118.

Allt G, Lawrenson JG. 2001. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs* **169**: 1-11.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research* **97**: 512-523.

Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K. 1995. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8348-8352.

Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. 2004. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* **6**: 7-14.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-495.

Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. 1994. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Advances in protein chemistry* **45**: 89-151.

Baudry M, DuBrin R, Beasley L, Leon M, Lynch G. 1986. Low levels of calpain activity in Chiroptera brain: implications for mechanisms of aging. *Neurobiology of aging* **7**: 255-258.

Bayreuther K, Rodemann HP, Francz PI, Maier K. 1988. Differentiation of fibroblast stem cells. *Journal of cell science Supplement* **10**: 115-130.

Bea S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernandez S, Fernandez PL, van Lohuizen M, Colomer D, Campo E. 2001. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer research* **61**: 2409-2412.

Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal* **22**: 4212-4222.

Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* **78**: 547-581.

Bell DR, Van Zant G. 2004. Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene* **23**: 7290-7296.

Bianchi F, Maioli M, Leonardi E, Olivi E, Pasquinelli G, Valente S, Mendez AJ, Ricordi C, Raffaini M, Tremolada C et al. 2013. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell transplantation* **22**: 2063-2077.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* **19**: 180-192.

Blackburn EH. 2000. Telomere states and cell fates. *Nature* **408**: 53-56.

-. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**: 661-673
.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**: 349-352.

Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD, Huard. 2000. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **18**: 933-944.

Bowen RL, Atwood CS. 2004. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology* **50**: 265-290.

Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, Theilgaard-Monch K, Minucci S, Porse BT, Marine JC et al. 2007. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & development* **21**: 525-530.

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA. 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**: 660-665.

Bratic A, Larsson NG. 2013. The role of mitochondria in aging. *The Journal of clinical investigation* **123**: 951-957.

Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. 1992. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* **114**: 521-532.

Breier G, Clauss M, Risau W. 1995. Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **204**: 228-239.

Bringold F, Serrano M. 2000. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Experimental gerontology* **35**: 317-329.

Brook FA, Gardner RL. 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 5709-5712.

Brown JP, Wei W, Sedivy JM. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**: 831-834.

Bruce SA, Deamond SF, Ts'o PO. 1986. In vitro senescence of Syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between in vivo donor age and in vitro proliferative capacity. *Mechanisms of ageing and development* **34**: 151-173.

Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. 2006. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *The American journal of pathology* **169**: 338-346.

Byrne JA, Grieve DJ, Cave AC, Shah AM. 2003. Oxidative stress and heart failure. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* **96**: 214-221.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**: 2396-2402.

Campisi J. 1997. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* **33**: 703-709.

-. 2003. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Experimental gerontology* **38**: 5-11.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 729-740.

Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. 2001. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Experimental gerontology* **36**: 1619-1637.

Caplan AI. 2008. All MSCs are pericytes? *Cell stem cell* **3**: 229-230.

Castagna A, Fontani V, Rinaldi S, Mannu P. 2011. Radio electric tissue optimization in the treatment of surgical wounds. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* **4**: 133-137.

Cavallari G, Olivi E, Bianchi F, Neri F, Foroni L, Valente S, La Manna G, Nardo B, Stefoni S, Ventura C. 2012. Mesenchymal stem cells and islet cotransplantation in diabetic rats: improved islet graft revascularization and function by human adipose tissue-derived stem cells preconditioned with natural molecules. *Cell transplantation* **21**: 2771-2781.

Chambers SM, Goodell MA. 2007. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. *Stem cell reviews* **3**: 201-211.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W et al. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**: 725-730.

Cheng D, Kim WY, Min SK, Nautiyal T, Kim KS. 2006. Magic structures and quantum conductance of silver nanowires. *Physical review letters* **96**: 096104.

Chkhotua AB, Gabusi E, Altimari A, D'Errico A, Yakubovich M, Vienken J, Stefoni S, Chieco P, Yussim A, Grigioni WF. 2003. Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **41**: 1303-1313.

Chunmeng S, Tianmin C. 2004. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplantation proceedings* **36**: 1578-1581.

Cleaver O, Tonissen KF, Saha MS, Krieg PA. 1997. Neovascularization of the Xenopus embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **210**: 66-77.

Collado M, Blasco MA, Serrano M. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130**: 223-233.

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M et al. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**: 642.

Collodel G, Fioravanti A, Pascarelli NA, Lamboglia A, Fontani V, Maioli M, Santaniello S, Pigliaru G, Castagna A, Moretti E et al. 2013. Effects of regenerative radioelectric asymmetric conveyer treatment on human normal and osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1beta. A biochemical and morphological study. *Clinical interventions in aging* **8**: 309-316.

Collodel G, Rinaldi S, Moretti E, Fontani V, Castagna A, Iacoponi F, Terzuoli G, Cubeddu F, Careddu GM, Cossu I et al. 2012. The effect of radio electric asymmetric conveyer treatment on sperm parameters of subfertile stallions: a pilot study. *Reproductive biology* **12**: 277-284.

Commoner B, Townsend J, Pake GE. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* **174**: 689-691.

Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. 2001. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**: 1713-1716.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L et al. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* **3**: 301-313.

Croall DE, DeMartino GN. 1991. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiological reviews* **71**: 813-847.

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**: 194-198.

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *The Journal of cell biology* **160**: 909-918.

De Barros S, Dehez S, Arnaud E, Barreau C, Cazavet A, Perez G, Galinier A, Casteilla L, Planat-Benard V. 2013. Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **21**: 399-408.

De Cecco M, Jeyapalan J, Zhao X, Tamamori-Adachi M, Sedivy JM. 2011. Nuclear protein accumulation in cellular senescence and organismal aging revealed with a novel single-cell resolution fluorescence microscopy assay. *Aging* **3**: 955-967.

de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. 2001. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular cell* **8**: 1129-1135.

de Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* **19**: 2100-2110.

-. 2009. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* **326**: 948-952.

de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Molecular and cellular biology* **10**: 518-527.

Demidenko ZN, Blagosklonny MV. 2009. Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential. *Aging* **1**: 1008-1016.

Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. 2010. Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 9660-9664.

Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. 1987. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *International journal of obesity* **11**: 19-27.

Di Micco R, Sulli G, Dobreva M, Liontos M, Botrugno OA, Gargiulo G, dal Zuffo R, Matti V, d'Ario G, Montani E et al. 2011. Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature cell biology* **13**: 292-302.

Dietrich N, Bracken AP, Trinh E, Schjerling CK, Koseki H, Rappsilber J, Helin K, Hansen KH. 2007. Bypass of senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-ARF locus. *The EMBO journal* **26**: 1637-1648.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 9363-9367.

Dore-Duffy P, Cleary K. 2011. Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol* **686**: 49-68.

Drayton S, Peters G. 2002. Immortalisation and transformation revisited. *Current opinion in genetics & development* **12**: 98-104.

Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. 1995. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **203**: 80-92.

Effros RB. 2004. From Hayflick to Walford: the role of T cell replicative senescence in human aging. *Experimental gerontology* **39**: 885-890.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology* **109**: 235-242.

Estrada JC, Torres Y, Benguria A, Dopazo A, Roche E, Carrera-Quintanar L, Perez RA, Enriquez JA, Torres R, Ramirez JC et al. 2013. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell death & disease* **4**: e691.

Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156.

Farmer SR. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism* **4**: 263-273.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* **9**: 669-676.

Ferreira R, Naguibneva I, Mathieu M, Ait-Si-Ali S, Robin P, Pritchard LL, Harel-Bellan A. 2001. Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO reports* **2**: 794-799.

Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.

Flamme I, Breier G, Risau W. 1995. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Developmental biology* **169**: 699-712.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**: 66-70.

Fouquet B, Weinstein BM, Serluca FC, Fishman MC. 1997. Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Developmental biology* **183**: 37-48.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4533-4537.

Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. 1995. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunology today* **16**: 12-16.

Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G. 2000. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Experimental gerontology* **35**: 879-896.

Freitas CS, Dalmau SR. 2006. Multiple sources of non-embryonic multipotent stem cells: processed lipoaspirates and dermis as promising alternatives to bone-marrow-derived cell therapies. *Cell and tissue research* **325**: 403-411.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* **4**: 267-274.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**: 230-247.

Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology* **16**: 381-390.

Funayama R, Ishikawa F. 2007. Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* **116**: 431-440.

Gavrilov LA, Gavrilova NS, Semenova VG, Evdokushkina GN, Krut'ko VN, Gavrilova AL, Evdokushkina NN, Lapshin EV. 1997. [Maternal age and lifespan of the offspring]. *Doklady Akademii nauk / [Rossiiskaia akademii nauk]* **354**: 569-572.

Geraert E. 2004. Constant and continuous growth reduction as a possible cause of ageing. *The International journal of developmental biology* **48**: 271-274.

Gil J, Bernard D, Martinez D, Beach D. 2004. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nature cell biology* **6**: 67-72.

Gil J, Peters G. 2006. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 667-677.

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* **100**: 1249-1260.

Gire V, Wynford-Thomas D. 1998. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Molecular and cellular biology* **18**: 1611-1621.

Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. 2002. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging cell* **1**: 117-123.

Gonos ES. 1998. Expression of the growth arrest specific genes in rat embryonic fibroblasts undergoing senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* **851**: 466-469.

Gonos ES, Derventzi A, Kveiborg M, Agiostratidou G, Kassem M, Clark BF, Jat PS, Rattan SI. 1998. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Experimental cell research* **240**: 66-74.

Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**: 405-413.

-. 1989. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**: 331-337.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology* **189**: 54-63.

Gruber HE, Somayaji S, Riley F, Hoelscher GL, Norton HJ, Ingram J, Hanley EN, Jr. 2012. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* **87**: 303-311.

Grunewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, Hemmelmann C, Lohmann K, Orolicki S, Ramirez A, Schapira AH et al. 2010. Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PloS one* **5**: e12962.

Guney I, Sedivy JM. 2006. Cellular senescence, epigenetic switches and c-Myc. *Cell Cycle* **5**: 2319-2323.

Haferkamp S, Tran SL, Becker TM, Scurr LL, Kefford RF, Rizos H. 2009. The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging* **1**: 542-556.

Haldane JBS. 1941. *New paths in genetics*. G. Allen & Unwin ltd., London,.

Halliwell B, Gutteridge JM. 1988. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human toxicology* **7**: 7-13.

Hampel B, Wagner M, Teis D, Zwerschke W, Huber LA, Jansen-Durr P. 2005. Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging cell* **4**: 325-330.

Han SM, Han SH, Coh YR, Jang G, Chan Ra J, Kang SK, Lee HW, Youn HY. 2014. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Experimental & molecular medicine* **46**: e101.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and cellular biology* **16**: 859-867.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460.

Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* **11**: 298-300.

Harvey DM, Levine AJ. 1991. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes & development* **5**: 2375-2385.

Hatchikian EC, Henry YA. 1977. An iron-containing superoxide dismutase from the strict anaerobe Desulfovibrio desulfuricans (Norway 4). *Biochimie* **59**: 153-161.

Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. 1987. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **64**: 832-835.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**: 296-299.

Hayflick L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research* **37**: 614-636.

-. 1985. Theories of biological aging. *Experimental gerontology* **20**: 145-159.

Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* **25**: 585-621.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell* **14**: 501-513.

Herbig U, Wei W, Dutriaux A, Jobling WA, Sedivy JM. 2003. Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene CDKN1A in replicative cellular senescence. *Aging cell* **2**: 295-304.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1026-1030.

Hipkiss AR. 2003. Errors, mitochondrial dysfunction and ageing. *Biogerontology* **4**: 397-400.

Ho AD, Wagner W, Mahlknecht U. 2005. Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO reports* **6 Spec No**: S35-38.

Hofman MA. 1983. Energy metabolism, brain size and longevity in mammals. *The Quarterly review of biology* **58**: 495-512.

Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. 2004. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* **6**: 543-553.

in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. 2003a. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* **88**: 845-852.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. 2003b. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* **102**: 1548-1549.

Isenmann S, Cakouros D, Zannettino A, Shi S, Gronthos S. 2007. hTERT transcription is repressed by Cbfa1 in human mesenchymal stem cell populations. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **22**: 897-906.

Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beausejour C, Jacobs JJ, Van Lohuizen M, Band V, Campisi J, Dimri GP. 2003. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Molecular and cellular biology* **23**: 389-401.

Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, Bunnell BA. 2008. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer research* **68**: 4229-4238.

Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. 2007. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of postgraduate medicine* **53**: 121-127.

Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. 1999. The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**: 164-168.

Jeyapalan JC, Sedivy JM. 2008. Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of ageing and development* **129**: 467-474.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M et al. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**: 41-49.

Jones DL, Rando TA. 2011. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nature cell biology* **13**: 506-512.

Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. 2004. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis and rheumatism* **50**: 817-827.

Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, Chin S, Tempst P, Lazar MA, Spiegelman BM. 2008. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes & development* **22**: 1397-1409.

Kamijo T, van de Kamp E, Chong MJ, Zindy F, Diehl JA, Sherr CJ, McKinnon PJ. 1999. Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function. *Cancer research* **59**: 2464-2469.

Kanungo MS. 1975. A model for ageing. *Journal of theoretical biology* **53**: 253-261.

Kawano T, Ito Y, Ishiguro M, Takuwa K, Nakajima T, Kimura Y. 2000. Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode Caenorhabditis elegans. *Biochemical and biophysical research communications* **273**: 431-436.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**: 1294-1301.

Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW et al. 2005. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**: 1228-1233.

Kim KC, Geng L, Huang S. 2003. Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers. *Cancer research* **63**: 7619-7623.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015.

Kim Sh SH, Kaminker P, Campisi J. 2002. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* **21**: 503-511.

Kowald A, Kirkwood TB. 1996. A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutation research* **316**: 209-236.

Kowanetz M, Ferrara N. 2006. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**: 5018-5022.

Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation* **114**: 1299-1307.

Land H, Parada LF, Weinberg RA. 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**: 596-602.

Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N, Leschik J, Pellestor F, Ramirez JM, De Vos J et al. 2011. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & development* **25**: 2248-2253.

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *The Journal of biological chemistry* **271**: 20608-20616.

Le Guilly Y, Simon M, Lenoir P, Bourel M. 1973. Long-term culture of human adult liver cells: morphological changes related to in vitro senescence and effect of donor's age on growth potential. *Gerontologia* **19**: 303-313.

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell* **5**: 187-195.

Lee JT, Gu W. 2010. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell death and differentiation* **17**: 86-92.

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **14**: 311-324.

Leontieva OV, Natarajan V, Demidenko ZN, Burdelya LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. 2012. Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 13314-13318.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**: 1306-1309.

Liang D, Chang JR, Chin AJ, Smith A, Kelly C, Weinberg ES, Ge R. 2001. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mechanisms of development* **108**: 29-43.

Liao W, Bisgrove BW, Sawyer H, Hug B, Bell B, Peters K, Grunwald DJ, Stainier DY. 1997. The zebrafish gene cloche acts upstream of a flk-1 homologue to regulate endothelial cell differentiation. *Development* **124**: 381-389.

Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS. 2008. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem cells and development* **17**: 1053-1063.

Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**: 561-567.

Locke M, Feisst V, Dunbar PR. 2011. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* **29**: 404-411.

Lowe SW, Sherr CJ. 2003. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Current opinion in genetics & development* **13**: 77-83.

Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Delitala A, Lotti Margotti M, Bagella L, Fontani V, Ventura C. 2014. Anti-senescence efficacy of radio-electric asymmetric conveyer technology. *Age (Dordr)* **36**: 9-20.

Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Gualini S, Cavallini C, Fontani V, Ventura C. 2013. Radio electric conveyed fields directly reprogram human dermal skin fibroblasts toward cardiac, neuronal, and skeletal muscle-like lineages. *Cell transplantation* **22**: 1227-1235.

Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Gualini S, Fontani V, Ventura C. 2012. Radiofrequency energy loop primes cardiac, neuronal, and skeletal muscle differentiation in mouse embryonic stem cells: a new tool for improving tissue regeneration. *Cell transplantation* **21**: 1225-1233.

Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**: 657-666.

Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. 2007. Hypoxia inducible factor-1alpha deficiency affects chondrogenesis of adipose-derived adult stromal cells. *Tissue engineering* **13**: 1159-1171.

Manestar-Blazic T. 2004. Hypothesis on transmission of longevity based on telomere length and state of integrity. *Medical hypotheses* **62**: 770-772.

Mannu P, Rinaldi S, Fontani V, Castagna A, Margotti ML. 2009. Radio electric treatment vs. Es-Citalopram in the treatment of panic disorders associated with major depression: an open-label, naturalistic study. *Acupuncture & electro-therapeutics research* **34**: 135-149.

Marcotte R, Lacelle C, Wang E. 2004. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mechanisms of ageing and development* **125**: 777-783.

Marechal A, Zou L. 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**.

Marnett LJ, Hurd HK, Hollstein MC, Levin DE, Esterbauer H, Ames BN. 1985. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104. *Mutation research* **148**: 25-34.

Martadinata H, Phan AT. 2013. Structure of human telomeric RNA (TERRA): stacking of two G-quadruplex blocks in K(+) solution. *Biochemistry* **52**: 2176-2183.

Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. 1970. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **23**: 86-92.

Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. 1997. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* **17**: 6087-6096.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA et al. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology* **9**: 625-635.

Matsumura T, Zerrudo Z, Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *Journal of gerontology* **34**: 328-334.

McClintock B. 1941. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* **26**: 234-282.

McConnell BB, Gregory FJ, Stott FJ, Hara E, Peters G. 1999. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Molecular and cellular biology* **19**: 1981-1989.

Meier R, Muller R. 1938. A new arrangement for the registration of diaphragm movements. *The Journal of physiology* **94**: 227-231.

Melk A, Ramassar V, Helms LM, Moore R, Rayner D, Solez K, Halloran PF. 2000. Telomere shortening in kidneys with age. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **11**: 444-453.

Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. 2004. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney international* **65**: 510-520.

Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B et al. 2008. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *The New England journal of medicine* **358**: 592-604.

Merry BJ. 2002. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *The international journal of biochemistry & cell biology* **34**: 1340-1354.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**: 720-724.

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**: 835-846.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G et al. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **24**: 376-385.

Mizuno H, Hyakusoku H. 2003. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi* **70**: 300-306.

Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell* **7**: 150-161.

Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. 2003. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**: 962-967.

Morrison SJ, Kimble J. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**: 1068-1074.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 6622-6626.

Mura M, Castagna A, Fontani V, Rinaldi S. 2012. Preliminary pilot fMRI study of neuropostural optimization with a noninvasive asymmetric radioelectric brain stimulation protocol in functional dysmetria. *Neuropsychiatric disease and treatment* **8**: 149-154.

Murachi T, Tanaka K, Hatanaka M, Murakami T. 1980. Intracellular Ca2+-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Advances in enzyme regulation* **19**: 407-424.

Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T et al. 2005. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**: 2542-2547.

Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. 2006. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **13**: 77-81.

Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, Masui S, Takahashi K, Yagi R, Yagi K, Miyazaki J, Matoba R, Ko MS et al. 2006. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **26**: 7772-7782.

Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**: 703-716.

Nesse RM. 1988. Life table tests of evolutionary theories of senescence. *Experimental gerontology* **23**: 445-453.

Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Shaw J, Roy JE, Koh J, Louis DN. 1999. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **79**: 1137-1143.

Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE et al. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**: 561-565.

Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. 2006. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. *Differentiation; research in biological diversity* **74**: 510-518.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**: 753-756.

Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G, Hara E. 2001. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**: 1067-1070.

Olovnikov AM. 1971. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Doklady Akademii nauk SSSR* **201**: 1496-1499.

Panossian LA, Porter VR, Valenzuela HF, Zhu X, Reback E, Masterman D, Cummings JL, Effros RB. 2003. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiology of aging* **24**: 77-84.

Parisi S, Passaro F, Aloia L, Manabe I, Nagai R, Pastore L, Russo T. 2008. Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Journal of cell science* **121**: 2629-2634.

Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**: 302-305.

Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E. 1999. Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Molecular and cellular biology* **19**: 1775-1783.

Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R, Orrico C, Foroni L, Stella A, Alviano F et al. 2007. Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastructural pathology* **31**: 23-31.

Passegue E, Wagner EF. 2000. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *The EMBO journal* **19**: 2969-2979.

Paull TT, Gellert M. 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes & development* **13**: 1276-1288.

Pawelec G, Ouyang Q, Wagner W, Biol D, Wikby A. 2003. Pathways to a robust immune response in the elderly. *Immunology and allergy clinics of North America* **23**: 1-13.

Perls T, Kunkel L, Puca A. 2002a. The genetics of aging. *Current opinion in genetics & development* **12**: 362-369.

Perls TT, Bubrick E, Wager CG, Vijg J, Kruglyak L. 1998. Siblings of centenarians live longer. *Lancet* **351**: 1560.

Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, Joyce E, Brewster S, Kunkel L, Puca A. 2002b. Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 8442-8447.

Pettersson P, Cigolini M, Sjostrom L, Smith U, Bjorntorp P. 1984. Cells in human adipose tissue developing into adipocytes. *Acta medica Scandinavica* **215**: 447-451.

Pignolo RJ, Martin BG, Horton JH, Kalbach AN, Cristofalo VJ. 1998. The pathway of cell senescence: WI-38 cells arrest in late G1 and are unable to traverse the cell cycle from a true G0 state. *Experimental gerontology* **33**: 67-80.

Pignolo RJ, Rotenberg MO, Cristofalo VJ. 1994. Alterations in contact and density-dependent arrest state in senescent WI-38 cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal* **30A**: 471-476.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**: 143-147.

Polini A, Pisignano D, Parodi M, Quarto R, Scaglione S. 2011. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PloS one* **6**: e26211.

Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. 2008. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* **26**: 2201-2210.

Puca AA, Daly MJ, Brewster SJ, Matise TC, Barrett J, Shea-Drinkwater M, Kang S, Joyce E, Nicoli J, Benson E et al. 2001. A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10505-10508.

Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. 1969. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **17**: 110-124.

Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. 1993. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7533-7537.

Randle DH, Zindy F, Sherr CJ, Roussel MF. 2001. Differential effects of p19(Arf) and p16(Ink4a) loss on senescence of murine bone marrow-derived preB cells and macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9654-9659.

Reddel RR. 2000. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**: 477-484.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**: 1292-1298.

Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Durr P, Wlaschek M. 2006. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging cell* **5**: 379-389.

Rheinwald JG, Green H. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**: 331-343.

Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, De Luca M, Catricala C, O'Toole KM. 2002. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Molecular and cellular biology* **22**: 5157-5172.

Rinaldi S, Fontani V, Castagna A. 2011. Brain activity modification produced by a single radioelectric asymmetric brain stimulation pulse: a new tool for neuropsychiatric treatments. Preliminary fMRI study. *Neuropsychiatric disease and treatment* **7**: 649-654.

Rinaldi S, Maioli M, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Gualini S, Margotti ML, Carta A, Fontani V, Ventura C. 2012. Regenerative treatment using a radioelectric asymmetric conveyor as a novel tool in antiaging medicine: an in vitro beta-galactosidase study. *Clinical interventions in aging* **7**: 191-194.

Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. 1994. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental biology* **164**: 87-101.

Roy NS, Chandler-Militello D, Lu G, Wang S, Goldman SA. 2007. Retrovirally mediated telomerase immortalization of neural progenitor cells. *Nature protocols* **2**: 2815-2825.

Rubbi CP, Milner J. 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *The EMBO journal* **22**: 6068-6077.

Ryu YJ, Cho TJ, Lee DS, Choi JY, Cho J. 2013. Phenotypic characterization and in vivo localization of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Molecules and cells* **35**: 557-564.

Sadler JE. 1998. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual review of biochemistry* **67**: 395-424.

Sager R. 1991. Senescence as a mode of tumor suppression. *Environmental health perspectives* **93**: 59-62.

Sahin E, Depinho RA. 2010. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* **464**: 520-528.

Sakamoto K, Howard T, Ogryzko V, Xu NZ, Corsico CC, Jones DH, Howard B. 1993. Relative mitogenic activities of wild-type and retinoblastoma binding-defective SV40 T antigens in serum-deprived and senescent human diploid fibroblasts. *Oncogene* **8**: 1887-1893.

Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. 2003. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental cell research* **287**: 289-300.

Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J. 2010. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **192**: 284-291.

Sawada R, Ito T, Tsuchiya T. 2007. [Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **127**: 851-856.

Schachter F, Cohen D, Kirkwood T. 1993. Prospects for the genetics of human longevity. *Human genetics* **91**: 519-526.

Schaffler A, Buchler C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* **25**: 818-827.

Schneider EL, Mitsui Y. 1976. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 3584-3588.

Schwarze SR, DePrimo SE, Grabert LM, Fu VX, Brooks JD, Jarrard DF. 2002. Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 14877-14883.

Sengenes C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A. 2005. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *Journal of cellular physiology* **205**: 114-122.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593-602.

Seshadri T, Campisi J. 1990. Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* **247**: 205-209.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13726-13731.

Shan T, Liu W, Kuang S. 2013. Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**: 277-287.

Sharpless NE, DePinho RA. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 703-713.

Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y, Wright WE. 1993. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Experimental cell research* **209**: 45-52.

Shay JW, Wright WE. 2001. Ageing and cancer: the telomere and telomerase connection. *Novartis Foundation symposium* **235**: 116-125; discussion 125-119, 146-119.

Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Current biology : CB* **9**: 939-945.

Sherr CJ, McCormick F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* **2**: 103-112.

Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* **13**: 1501-1512.

Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10771-10778.

Shih C, Weinberg RA. 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**: 161-169.

Skulachev VP. 2002. Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Annals of the New York Academy of Sciences* **959**: 214-237.

Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. 1994. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *American journal of human genetics* **55**: 876-882.

Smith AG. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology* **17**: 435-462.

Smogorzewska A, de Lange T. 2004. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual review of biochemistry* **73**: 177-208.

Snoke MS, Promislow DE. 2003. Quantitative genetic tests of recent senescence theory: age-specific mortality and male fertility in Drosophila melanogaster. *Heredity* **91**: 546-556.

Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. 2002. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* **30**: 699-704.

Soukas A, Socci ND, Saatkamp BD, Novelli S, Friedman JM. 2001. Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry* **276**: 34167-34174.

Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. 2003. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nature genetics* **33**: 492-496.

Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. 1995. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer research* **55**: 2988-2994.

Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM. 1995. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mechanisms of development* **53**: 275-287.

Suman P, Malhotra SS, Gupta SK. 2013. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *Jak-Stat* **2**: e25155.

Tatar M, Bartke A, Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299**: 1346-1351.

Tchoukalova YD, Sarr MG, Jensen MD. 2004. Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *American journal of physiology Regulat*

Tholpady SS, Llull R, Ogle RC, Rubin JP, Futrell JW, Katz AJ. 2006. Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clinics in plastic surgery* **33**: 55-62, vi.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry* **266**: 11947-11954.

Tomita-Mitchell A, Muniappan BP, Herrero-Jimenez P, Zarbl H, Thilly WG. 1998. Single nucleotide polymorphism spectra in newborns and centenarians: identification of genes coding for rise of mortal disease. *Gene* **223**: 381-391.

Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R et al. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**: 417-423.

Trujillo KM, Sung P. 2001. DNA structure-specific nuclease activities in the Saccharomyces cerevisiae Rad50*Mre11 complex. *The Journal of biological chemistry* **276**: 35458-35464.

Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, Li DG, Putney DJ, Holbrook NJ. 1993. Vascular heat shock protein expression in response to stress. Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. *The Journal of clinical investigation* **91**: 465-473.

Vanderklish PW, Bahr BA. 2000. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *International journal of experimental pathology* **81**: 323-339.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**: RESEARCH0034.

Velimezi G, Liontos M, Vougas K, Roumeliotis T, Bartkova J, Sideridou M, Dereli-Oz A, Kocylowski M, Pateras IS, Evangelou K et al. 2013. Functional interplay between the DNA-damage-response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer. *Nature cell biology* **15**: 967-977.

Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T. 2007a. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**: 661-665.

Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F et al. 2007b. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *The Journal of biological chemistry* **282**: 14243-14252.

Vijg J, Campisi J. 2008. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* **454**: 1065-1071.

von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences* **27**: 339-344.

Wagers AJ, Weissman IL. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**: 639-648.

Wagner W, Bork S, Horn P, Krunic D, Walenda T, Diehlmann A, Benes V, Blake J, Huber FX, Eckstein V et al. 2009. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PloS one* **4**: e5846.

Wai LK. 2004. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review. *MedGenMed : Medscape general medicine* **6**: 19.

Walford RL. 1964. The Immunologic Theory of Aging. *The Gerontologist* **4**: 195-197.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **22**: 1330-1337.

Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. 2006. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by

a p38 MAPK-dependent mechanism. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **291**: R880-884.

Wang Y, Blandino G, Givol D. 1999. Induced p21waf expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. *Oncogene* **18**: 2643-2649.

Wang Y, Blandino G, Oren M, Givol D. 1998. Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene* **17**: 1923-1930.

Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H. 1998. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **78**: 1301-1314.

Watson JD. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology* **239**: 197-201.

Wei W, Sedivy JM. 1999. Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Experimental cell research* **253**: 519-522.

Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC. 1995. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**: 812-815.

Wikby A, Johansson B, Olsson J, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson F. 2002. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Experimental gerontology* **37**: 445-453.

Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. 2011. Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. *Cell proliferation* **44**: 86-98.

Wobus AM. 2001. Potential of embryonic stem cells. *Molecular aspects of medicine* **22**: 149-164.

Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. 2001. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* **294**: 1933-1936.

Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics* **18**: 173-179.

Wright WE, Shay JW. 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Current opinion in genetics & development* **11**: 98-103.

-. 2002. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nature biotechnology* **20**: 682-688.

Xu HJ, Zhou Y, Ji W, Perng GS, Kruzelock R, Kong CT, Bast RC, Mills GB, Li J, Hu SX. 1997. Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* **15**: 2589-2596.

Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**: 656-660.

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. 1993. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* **118**: 489-498.

Yamanaka S. 2008. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **363**: 2079-2087.

-. 2012. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell stem cell* **10**: 678-684.

Yates PR, Atherton GT, Deed RW, Norton JD, Sharrocks AD. 1999. Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. *The EMBO journal* **18**: 968-976.

Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, Ericson K, Terracio L, Asahara T, Masuda H et al. 2004. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell biochemistry and biophysics* **40**: 1-80.

Zafon C. 2003. Ageing purpose: another thrifty genotype. *Medical hypotheses* **61**: 482-485.

Zdanov S, Debacq-Chainiaux F, Remacle J, Toussaint O. 2006. Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS letters* **580**: 6455-6463.

Zebedee Z, Hara E. 2001. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* **20**: 8317-8325.

Zeng Q, Li X, Beck G, Balian G, Shen FH. 2007. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro. *Bone* **40**: 374-381.

Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. 2006. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**: 416-425.

Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**: 203-211.

Zou X, Ray D, Aziyu A, Christov K, Boiko AD, Gudkov AV, Kiyokawa H. 2002. Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes & development* **16**: 2923-2934.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* **7**: 211-228.

