



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Sistema Sanitario Regione Lombardia



FONDAZIONE
INTERNAZIONALE
MENARINI



UNA VITA CHE NASCE FA CRESCERE LA VITA

DONAZIONE,
DIVULGAZIONE
E UTILIZZAZIONE
DEL SANGUE
DEL CORDONE
OMBELICALE

9 giugno 2012
ore 9.00

Auditorium del Palazzo dei Congressi
Provincia di Milano

Via Corridoni, 16 - Milano

ABSTRACT BOOK



SCOPO DEL CONVEGNO

Il sangue del neonato che rimane nella placenta al termine del parto - e che in passato veniva eliminato insieme alla placenta - viene oggi prelevato dai vasi sanguigni del cordone ombelicale mediante una semplice procedura eseguita dopo il taglio del cordone, che non pone alcun rischio né per la mamma né per il neonato. Questo particolare tipo di sangue - il "sangue placentare"- contiene preziose cellule staminali che da oltre 20 anni vengono utilizzate a scopo di trapianto per i pazienti affetti da gravi malattie del sangue (leucemie, linfomi, talassemie, malattie del sistema immunitario, difetti metabolici). Oltre due milioni di famiglie hanno già donato il sangue placentare a scopo solidaristico, contribuendo a creare un patrimonio mondiale di oltre 600.000 donazioni conservate a temperatura inferiore a -150°C in oltre 140 banche pubbliche in tutto il mondo. Con questo patrimonio sono stati realizzati finora circa 25.000 trapianti.

Dato che il successo di questo tipo di trapianto è significativamente correlato al numero di cellule contenute nel sangue placentare e alla compatibilità fra donatore e ricevente, è necessario sviluppare ulteriormente gli attuali programmi di raccolta solidaristica per consentire a tutti i pazienti di ricevere una donazione con un elevato numero di cellule in relazione al peso corporeo del ricevente e con un ottimo livello di compatibilità. A tal fine, gli esperti hanno indicato l'obiettivo di triplicare l'inventario disponibile, ovvero passare per l'Italia da un patrimonio attuale di circa 30.000 a un inventario definitivo di 90.000 donazioni.

Obiettivo di questo convegno è fare il punto sulla donazione solidaristica del sangue placentare e sulla ricerca sulle cellule staminali, allo scopo di promuovere la migliore sinergia fra clinici, ricercatori e associazioni di utilità sociale nel promuovere una corretta informazione alla cittadinanza su questi temi e un corretto uso di questo prezioso materiale biologico.

Paolo Rebullà, Pierluigi Vasilotta e Paolo Di Lavore

ORGANIZZATO DA:

- Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano
- The International Association of Lions Clubs Distretto Lions 108 Ib4



CON IL PATROCINIO DI:



Presidente del Convegno

Paolo Rebullà

Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Segretari Scientifici

Pierluigi Vasilotta

Specialista Oncologo
Senologia

Paolo Di Lavore

Specialista
in Cardiologia

The International Association of Lions Clubs
Distretto Lions 108 Ib4

PROMOSSO DA:

Fondazione Internazionale Menarini
Via W. Tobagi, 8
20068 Peschiera Borromeo (Milano)

Tel.: +39 02 55308110

Fax: +39 02 55305739

E-mail: milan@fondazione-menarini.it

www.fondazione-menarini.it

PROGRAMMA

09.00 *Apertura del Convegno*

Saluto del Governatore Distretto Lions108 Ib4
Eugenio Gallera

Saluti:

Onorevole Guido Podestà, Presidente Provincia di Milano

Dott. Bruno Dapei, Presidente Consiglio Provinciale di Milano

Avv. Giulio Gallera, Vice Presidente ANCI Lombardia

(Associazione Nazionale Comuni Italiani)

Dott.ssa Cristina Stancari, Assessore Pari Opportunità Provincia Milano

Dott. Luciano Bresciani, Assessore Sanità Regione Lombardia

Dott. Giuseppe Bonfiglio, Vice Presidente Ordine Medici e Odontoiatri Milano

09.15 *Presentazione del Convegno*

Paolo Rebullà, Pierluigi Vasilotta, Paolo Di Lavore

Sessione I

09.30 **Lorenza Lazzari** (Milano)

La cellula staminale

10.00 **Paolo Rebullà** (Milano)

L'anemia di Fanconi e la bomba atomica

10.30 **Laura Salvaneschi** (Pavia)

Raccolta, caratterizzazione e bancaggio del sangue placentare

11.00 *Discussione*

11.30 *Coffee break*

Sessione II

12.00 **Marco Zecca** (Pavia)

Il trapianto del sangue placentare

12.30 **Tiziana Montemurro** (Milano)

Applicazioni non ematologiche del sangue placentare

13.00 **Paolo Rebullà** (Milano)

Quale futuro per le cellule staminali?

13.30 *Discussione*

14.00 *Conclusione del Convegno*

Lorenza Lazzari

Cell Factory, Unità di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Dipartimento di Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Un organismo vivente complicato come l'uomo richiede un continuo rinnovamento che si realizza attraverso l'aiuto di cellule che si dividono e differenziano. Ad esempio a livello ematopoietico, ogni giorno miliardi di cellule senescenti vengono sostituite da nuove cellule generate nel midollo osseo.

A sostenere quest'enorme processo di rinnovamento cellulare vi è un piccolo compartimento di cellule staminali, funzionalmente eterogenee e morfologicamente indifferenziate.

Le cellule staminali sono conosciute come embrionali o adulte. Le prime sono presenti nell'embrione dopo circa sette giorni di sviluppo e sono totipotenti, cioè sono in grado di differenziarsi in qualsiasi tessuto del corpo umano. Mentre le cellule staminali adulte possono essere sia pluripotenti che multipotenti, con capacità di auto-rinnovamento, in quanto danno vita solo ad alcuni tipi cellulari. Esse sono in grado al tempo stesso sia di generare progenitori indirizzati verso una o due linee cellulari (committed), sia di dare origine ad altre cellule con identiche capacità proliferative e di sviluppo.

All'interno delle cellule staminali adulte troviamo due importanti popolazioni cellulari: le cellule staminali ematopoietiche e le cellule staminali mesenchimali. Le prime danno origine a tutte le cellule del sangue, le seconde alle cellule che supportano la riparazione di organi e tessuti. Molto si conosce nel campo delle cellule staminali ematopoietiche sia dal punto di vista della ricerca che dell'applicazione clinica. Ma è soprattutto nel campo delle cellule staminali mesenchimali che si stanno focalizzando gli sforzi della ricerca in quanto queste cellule staminali mesenchimali sono il futuro della medicina rigenerativa, cioè la scienza che studia la riparazione dei tessuti a seguito di danni acuti e cronici.

Paolo Rebulla

Milano Cord Blood Bank, Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia; Dipartimento di Medicina Rigenerativa, Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

La realizzazione di importanti scoperte e innovazioni può essere talvolta associata all'occorrenza a diversi fattori favorevoli in particolari periodi storici, aree geografiche o contesti sociali ed economici. Anche lo sviluppo di una terapia risolutiva per il trattamento dell'anemia di Fanconi - una grave malattia del sangue caratterizzata da fragilità dei cromosomi e conseguente sviluppo di leucemie e simili alterazioni secondarie - successivamente estesa e oggi applicata con successo al trattamento delle leucemie, dei linfomi, delle talassemie, di alcune immunodeficienze e di alcune patologie metaboliche, è, almeno in parte, riconducibile al particolare contesto psicologico della guerra fredda che ha caratterizzato fino a qualche decennio fa i rapporti fra Stati Uniti e Unione Sovietica e al reciproco timore di un attacco nucleare da parte dei cittadini di questi due Paesi.

In questo contesto, all'inizio degli anni '70 del secolo scorso, alcuni ricercatori nordamericani dedicarono particolare attenzione alla identificazione di cellule 'staminali' nei diversi distretti dell'organismo. Al di là dello scopo e dell'interesse biomedico, queste ricerche erano sostenute dall'aspettativa che la raccolta di un tessuto 'ricco di staminalità emopoietica' potesse servire a riparare il midollo osseo danneggiato da radiazioni nucleari.

Questi studi consentirono di dimostrare che il sangue che rimane nella placenta al termine del parto (il sangue 'placentare' o 'del cordone ombelicale') contiene un numero elevato di cellule staminali emopoietiche, sufficienti per eseguire un trapianto nell'uomo. Grazie alla convergenza degli interessi scientifici di Hal Broxmeyer dell'Indiana University e di Arlene Auerbach della Rockefeller University di New York - responsabile del registro internazionale dell'anemia di Fanconi - e alla competenza clinica di Eliane Gluckman dell'Ospedale Saint Louis di Parigi fu possibile realizzare con successo il primo trapianto di sangue placentare nel 1988 in un paziente affetto da questa grave malattia.

Questo tipo di sangue rappresenta oggi una preziosa sorgente terapeutica utilizzata in oltre il 20% dei pazienti per i quali un donatore di midollo osseo familiare compatibile non è disponibile. In termini assoluti, questo tipo di trapianto è stato eseguito in circa 25.000 casi negli ultimi 20 anni.

Bibliografia

- 1) Gluckman E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Blood Rev* 2011;25:255-9.
- 2) Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy*. 2005;7:219-27.
- 3) Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas G, Cooper S, Falkenburg JH, Bard J, Boyse EA. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells*. 1991;17:313-29.
- 4) Gluckman E, Devergié A, Bourdeau-Esperou H, Thierry D, Traineau R, Auerbach A, Broxmeyer HE. Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1990;32:423-5.
- 5) Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A, Douglas GW, Friedman H, Cooper S, Hangoc G, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning*. 1990;8 Suppl 1:76-89.
- 6) Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174-8.

Raccolta, caratterizzazione e bancaggio del sangue placentare

L. Salvaneschi

PVCB Bank, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Le banche del sangue del cordone ombelicale

La raccolta del sangue del cordone ombelicale si esegue quando:

- un paziente pediatrico affetto da patologie per le quali vi è l'indicazione per il trapianto di progenitori emopoietici (ad esempio: LLA in seconda remissione, linfomi, neuroblastomi, insufficienze midollare o immunodeficienze) ha la possibilità di disporre del sangue cordonale di un fratello (donazione dedicata o riservata);
- viene organizzata la sistematica raccolta e conservazione di unità di sangue del cordone ombelicale allogeniche (unrelated cioè per non consanguinei) da parte di una struttura, autorizzata dalla Regione di appartenenza, che assume le funzioni di Banca.

Fino dai primi trapianti effettuati fu evidente che:

- il sangue cordonale poteva essere criopreservato, caratterizzato e conservato in strutture apposite, le Banche di cordone,
- che la creazione di tali banche avrebbe permesso di rendere disponibile, a richiesta, unità di cellule staminali a tipizzazione HLA nota, indipendentemente dai limiti geografici in cui le Banche stesse si trovano ad operare.

Il primo passo per la realizzazione di Banche di sangue del cordone ombelicale è stata la formulazione di criteri scientifici oggettivi con cui esse devono operare. La prima Banca fu organizzata al New York Blood Center nel 1992; l'Italia si è distinta per l'organizzazione della prima Banca al Policlinico di Milano e per aver individuato l'esigenza di creare anche un centro di riferimento, GRACE (Gruppo per la Raccolta ed Amplificazione di Cellule Emopoietiche), per coordinare l'attività di altre Banche che volessero avviare questa attività nel Paese. Dal febbraio 2007, il coordinamento delle Banche Italiane e del processo di ricerca di unità di sangue cordonale da parte di Centri sia italiani che esteri è stato assunto da IBMDR (Registro Italiano dei Donatori di Midollo Osseo), in analogia al processo di unificazione e semplificazione delle strutture deputate al reperimento di donatori di cellule staminali iniziato da altre nazioni sia europee che extraeuropee.

A livello internazionale è operativa un'organizzazione, denominata NETCORD, che svolge il compito di coordinare la formulazione e la diffusione di criteri operativi razionali, la definizione e l'aggiornamento di standard comuni e l'accreditamento per tutte le Banche di sangue placentare.

La raccolta, caratterizzazione e bancaggio

Queste procedure si eseguono rispettando quanto previsto dalle Linee guida per l'accreditamento delle Banche SCO (Accordo Stato-Regioni del 20 aprile 2011) e dagli Standard nazionali ed internazionali.

Al momento del parto, immediatamente dopo il clampaggio e la resezione del cordone ombelicale, con placenta in situ, è eseguito il prelievo di sangue del cordone ombelicale (CB) dal personale addetto, adeguatamente istruito per tale pratica, identificato nelle figure professionali dell'ostetrica presente in sala parto, del ginecologo o del medico del Servizio Trasfusionale. Il prelievo può essere eseguito anche in occasione di parto cesareo.

Fino al momento del trasporto, le unità di sangue cordonale vengono conservate nelle sedi di raccolta, in luogo e condizioni idonee al mantenimento della loro integrità, secondo quanto specificato nelle relative istruzioni.

Il trasporto del sangue placentare dalla sala parto al centro di congelamento viene eseguito in condizioni idonee e nel più breve tempo possibile e, comunque, entro le 48 ore dal prelievo.

L'unità di sangue placentare viene presa in consegna dal personale della Banca ed accettata secondo precise e codificate norme operative interne.

Gestione delle unità di sangue cordonale che pervengono alla Banca

La gestione comprende:

- controllo al ricevimento di CB provenienti dai reparti di Ostetricia fornitori della Banca;
- controllo della corretta manipolazione dei CB: prima, durante e dopo il congelamento;
- controllo della conservazione e del corretto immagazzinamento del CB;
- controllo dell'assegnazione corretta sulla base delle richieste (compatibilità con il ricevente).

Le unità di CB gestite all'interno della Banca necessitano di condizioni di manipolazione, immagazzinamento e conservazione controllate al fine di garantire la qualità dei prodotti finali erogati. Pertanto l'efficacia della gestione di tali attività è affidata al puntuale, sistematico, controllo delle sue fasi critiche.

Il Medico della Banca organizza le ulteriori fasi di manipolazione e conservazione delle unità, sulla base delle loro caratteristiche qualitative e quantitative. Infatti, le unità di CB, secondo le modalità riportate nelle procedure tecniche adottate dalla Banca, possono:

- essere avviate immediatamente alla lavorazione e successivo congelamento;
- essere scartate.

Prima del congelamento, l'unità prelevata viene esaminata, dapprima mediante semplice ispezione (atta a valutare la corretta etichettatura piuttosto che l'even-

tuale presenza di coaguli) e successivamente secondo i seguenti parametri: valutazione dell'anamnesi materna, volume, cellularità totale (minimo accettato 1.500 x 10⁶), vitalità. Se l'unità è considerata idonea, viene avviata al congelamento, in occasione del quale vengono eseguiti i prelievi per il gruppo sanguigno, le prove batteriologiche, la tipizzazione HLA, la determinazione delle cellule progenitrici CD 34+ e la conta delle NRBC (eritroblasti), le colture cellulari. Inoltre un campione di sangue materno viene sottoposto a tipizzazione HLA per la conferma dell'aplotipo e alle indagini per lo screening infettivologico.

Le unità idonee per il congelamento sono sottoposte a riduzione di volume. Il campione ridotto di volume, viene opportunamente caratterizzato per verificare che rispetti i requisiti necessari allo stoccaggio (cellularità totale: maggiore o uguale a 1.200 x 10⁶)

La criopreservazione dell'unità di sangue placentare viene effettuata entro 48 ore dal prelievo, seguendo una procedura che prevede l'impiego di DMSO come criopreservante e la discesa programmata della temperatura. Lo stoccaggio avviene in azoto liquido a temperatura inferiore a -150°C in appositi contenitori riservati alla Banca di sangue placentare, in locale dedicato, dotato dei sistemi di sicurezza necessari.

Per documentare la qualità del prodotto effettivamente destinato al trapianto, si procede alla caratterizzazione dell'unità di CB (valutazione del potenziale clonogenico, conteggio delle cellule CD34+ e determinazione della vitalità, emogruppo), unitamente ad un nuovo controllo della cellularità totale, su un campione ottenuto dopo la riduzione del volume e prima della criopreservazione.

La validazione dell'unità di CB si traduce nella possibilità che la stessa venga inserita nella Banca e sia resa disponibile per l'impiego clinico. Fino alla validazione le unità di CB sono conservate in quarantena.

Le unità di sangue placentare sono etichettate con codice a barre, riportante il numero di prelievo mediante il quale l'unità viene caricata nel sistema informatico e identificata in tutte le successive manipolazioni. Tale etichetta viene posta anche sui campioni biologici di accompagnamento, indispensabili per l'esecuzione degli esami di validazione dell'unità.

Le unità criopreservate sono dislocate in contenitori criogenici e la posizione all'interno del contenitore stesso viene riportata su un'apposita scheda sia cartacea che informatica, che permette la rintracciabilità delle unità stoccate.

Comunicazione dei dati delle unità di SP a IBMDR

Periodicamente viene aggiornato il software gestionale SCO di ITCBN (Italian Cord Blood Network), gestito da IBMDR (Italian Bone Marrow Donor Registry), con l'inserimento e la conferma della finalità allogeneico-solidaristica delle unità di CB validate, che mediante IBMDR viene reso disponibile nel circuito internazionale.

Bibliografia

- 1) E. Gluckman, H.E. Broxmeyer, A.D. Auerbach et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 321 (1989), pp. 1174–1178.
- 2) P. Rubinstein, R.D. Rosenfield, J.W. Adamson, C.E. Stevens. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 81 (1993), pp. 1679–1690.
- 3) H.E. Broxmeyer, G.W. Gordon, G. Hangoc et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 (1989), pp. 3828–3832.
- 4) H.E. Broxmeyer, G. Hangoc, S. Cooper et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (1992), pp. 4109–4113.
- 5) A.D. Auerbach, O. Liu, R. Ghosh et al. Prenatal identification of potential donors for umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia. *Transfusion*, 30 (1990), pp. 682–687.
- 6) P.W. Wernet. The International NETCORD Foundation in Cord blood. H.E. Broxmeyer (Ed.), *Biology, immunology, banking and clinical transplantation*, AABB Press, Bethesda Maryland (2004), pp. 429–435.
- 7) E. Gluckman, V. Rocha, A. Boyer Chammard et al. Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med*, 337 (1997), pp. 373–381.
- 8) J.E. Wagner, J.N. Barker, T.E. DeFor et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and non malignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, 100 (2002), pp. 1611–1618.
- 9) M.S. Cairo, J.E. Wagner. Placental and/or umbilical cord blood an alternative source of haemopoietic stem cells for transplantation. *Blood*, 90 (1997), pp. 4665–4678.

10) M. Eapen, P. Rubinstein, M.J. Zhang et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukemia: a comparison study. *Lancet*, 369 (2007), pp. 1947–1954.

11) V. Rocha, M. Labopin, G. Sanz, for the Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant group and Eurocord-Netcord registry et al. Comparison of outcomes after unrelated umbilical cord versus unrelated bone marrow transplants in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*, 351 (2004), pp. 2276–2285.

12) M.J. Laughlin, M. Eapen, P. Rubinstein, J.E. Wagner, M.J. Zhang, R.E. Champlin et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*, 351 (2004), pp. 2265–2275.

13) S. Takahashi, J. Ooi, A. Tomonari et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood*, 109 (2007), pp. 1322–1330.

Il trapianto del sangue placentare

Marco Zecca

Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

Il primo trapianto allogenico di cordone ombelicale (cord blood transplantation, CBT) è stato eseguito con successo nel 1988 in un bambino affetto da anemia di Fanconi, trapiantato utilizzando le cellule staminali emopoietiche del sangue cordonale della sorella sana HLA-identica (1). Da allora il CBT è stato utilizzato in molti pazienti pediatrici ed adulti affetti da patologie ematologiche maligne e non maligne, immunodeficienze congenite e tumori solidi, e si stima che almeno il 20% dei trapianti allogenici eseguiti in pazienti con età inferiore a 20 anni siano CBT (2). Negli ultimi anni si è, inoltre, assistito ad un significativo incremento dei CBT da unità bancate.

Tra i vantaggi di questa procedura nei confronti del trapianto di cellule staminali emopoietiche da precursori midollari o periferici (TCSE-BM), si segnalano una ridotta incidenza e gravità di malattia del trapianto contro l'ospite (graft-versus host disease, GVHD) acuta e cronica, dovuta alle particolari caratteristiche immunologiche dei linfociti del sangue placentare, una pronta disponibilità e facilità di prelievo del CB, e la possibilità di impiegare donatori con disparità HLA verso il ricevente (2).

Diversi studi hanno confrontato i risultati di CBT e TCSE-BM. I risultati ottenuti nelle coorti di pazienti con malattie ematologiche non maligne evidenziano che, in condizioni ottimali, il CBT offre una probabilità di successo paragonabile a quella ottenuta tramite il trapianto di midollo osseo (3). Per quanto riguarda le patologie ematologiche maligne, nonostante il minor numero di cellule staminali infuse, e la minor incidenza di GVHD, che abitualmente correla direttamente con l'attività antitumorale, sia il rischio di recidiva di malattia che il tasso di sopravvivenza complessiva sono paragonabili nei pazienti pediatrici riceventi un CBT o un TCSE-BM da donatore non consanguineo. Tuttavia, i riceventi di CBT hanno una più alta incidenza di complicanze infettive precoci, soprattutto se trapiantati con unità a bassa cellularità. In tutti gli studi pubblicati, emerge come il parametro più importante nell'influenzare l'esito del trapianto è la dose di cellule per chilogrammo di peso del ricevente, espressa in termini di numero totale di cellule nucleate o di cellule CD34+. In particolare, una dose non inferiore a $2,5-3 \times 10^7$ cellule nucleate/kg di peso del ricevente correla con un miglior attecchimento del trapianto, con la minor frequenza di eventi avversi correlati al trapianto e con la probabilità di sopravvivenza (4,5). Sebbene la possibilità di utilizzare unità di sangue cordonale con alcune

disparità HLA rispetto al ricevente sia tra i vantaggi del CBT, l'influenza della disparità HLA nella coppia donatore/ricevente sui risultati del CBT da donatore non consanguineo non è ancora pienamente stabilita, anche a causa dell'eterogeneità delle casistiche valutate e della frequente assenza di tipizzazione molecolare degli antigeni HLA nelle unità bancate. La cellularità e il grado di mismatch HLA possono reciprocamente influenzare i risultati del CBT. È stato, infatti, osservato come una più alta dose cellulare possa in parte ovviare al ruolo negativo del mismatch HLA (6). Sebbene non sia ancora chiarito quale tipo di disparità HLA abbia l'impatto maggiore sull'outcome del CBT, il match per HLA-DRB1 sembra cruciale in caso di trapianto da unità con 2 incompatibilità.

Nonostante il relativo ritardo con cui si ottiene l'attecchimento del trapianto, studi condotti dal nostro gruppo hanno dimostrato che la ricostituzione del sistema immunitario dopo CBT è simile a quella osservata dopo TCSE-BM (7). Inoltre, abbiamo potuto osservare che durante le prime fasi del post-trapianto, linfociti del ricevente sopravvissuti al condizionamento possono contribuire alla risposta immune specifica fino alla piena ripresa dell'immunità del donatore.

Avendo evidenziato il ruolo importante della cellularità dell'unità cordonale sui risultati clinici del CBT, gli sforzi della ricerca sono stati rivolti alla possibilità di aumentare il numero dei precursori emopoietici nelle unità di sangue placentare e di favorirne l'homing a livello midollare, al fine di consentire l'impiego di questa fonte di cellule staminali anche a pazienti adulti o in generale per pazienti di peso superiore a 40-50 kg. Questo obiettivo è stato perseguito mediante i) espansione ex-vivo di cellule cordonali; ii) infusione di due unità di sangue cordonale nello stesso ricevente (8); somministrazione del CBT mediante infusione intra-ossea (9).

Infine, per ridurre il rischio di infezioni virali, è stata recentemente descritta la possibilità di ottenere cellule T virus-specifiche da cellule cordonali.

Bibliografia

1) Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anaemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-1178.

2) Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol.* 2011;154:441-7.

3) Lisini D, Zecca M, Giorgiani G, et al. Donor/recipient mixed chimerism does not predict graft failure in children with beta-thalassemia given allogeneic cord blood transplantation from an HLA-identical sibling. *Haematologica* 2008; 93: 1859-67.

4) Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL, et al. Results of the cord blood transplantation study: clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood* 2008; 112: 4318-4327.

5) Gluckman E, Rocha V, Locatelli F, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004; 32: 397-407.

6) Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 2007; 369:1947-54.

7) Moretta A, Maccario R, Fagioli F, et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol*. 2001;29:371-9.

8) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Transplantation of two partially HLA matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematological malignancy. *Blood* 2005; 105: 1343-1347.

9) F. Frassoni, F. Gualandi, M. Podestà, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2009; 9: 831-839.

Applicazioni non ematologiche del sangue placentare

Tiziana Montemurro

Cell Factory "Franco Calori", Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Dipartimento di Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Il sangue di cordone ombelicale, per anni considerato materiale di scarto, ha suscitato i più vivi interessi dei ricercatori come sorgente di cellule staminali ematopoietiche da impiegare a scopi trapiantologici in campo ematologico, ma la recente scoperta delle cellule mesenchimali presenti in questa fonte ha permesso di considerarla una valida opportunità terapeutica anche per applicazioni non ematologiche.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono state isolate da colture di sangue midollare per la prima volta nel 1976 da Friedenstein e collaboratori (1). Diversi autori hanno poi dimostrato come queste cellule, simili morfologicamente ai fibroblasti e capaci di aderire su plastica, siano caratterizzate da un alto potenziale proliferativo e capaci di differenziare in vitro in diversi tipi cellulari di origine mesodermica (2, 3). Oltre che dal sangue midollare, le MSC possono essere isolate anche da altri fonti, tra cui il sangue di cordone ombelicale (CB) (4), ma anche dal muscolo scheletrico (5), dal tessuto adiposo (6), dal liquido sinoviale (7), dalla polpa dentaria (8), dal liquido amniotico (9) così come da diversi organi fetali quali il sangue, il fegato e i polmoni (10).

Le cellule staminali presenti nel sangue di cordone ombelicale svolgono fisiologicamente il loro ruolo come componenti della nicchia staminale dove agiscono mediante fenomeni di interazione che necessitano di contatto cellula-cellula mediati da numerose molecole di adesione.

Sebbene fenotipicamente simili, le MSC isolate da CB ed espanse tramite coltura, hanno mostrato eterogeneità nel potenziale di differenziamento. Diversi lavori, infatti, hanno dimostrato, sia dal punto di vista morfologico che dal punto di vista molecolare, la peculiarità di queste cellule di essere molto primitive esprimendo geni di carattere embrionale come: Oct-4, Nanog, Sox-2, Runx-1 e proponendosi come cellule con una elevata capacità proliferativa e differenziativa (11).

Saggi ELISA svolti sul surnatante prodotto dalle CB MSC in coltura, hanno anche consentito di rilevare la capacità di queste cellule a funzionare come drugstores (12), serbatoi di molecole utili al supporto ematopoietico (13) piuttosto che alla formazione di vasi, secernendo molecole come HB-EGF, HGF, FGF e una grande quantità di VEGF (14).

La produzione di MSC viene attualmente effettuata sfruttando la proprietà dei loro precursori di aderire alla plastica e di espandersi in opportuni sistemi di coltura.

Presso la Cell Factory 'Franco Calori' della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, officina farmaceutica autorizzata dall'AIFA nel 2007 e provvista di laboratori classificati, regolati da normative GMP, vengono al momento preparati diversi prodotti cellulari, alcuni dei quali sono e saranno utilizzati per diverse applicazioni cliniche di terapia cellulare sia in campo ematologico, ma anche in nefrologia, neurologia, cardiologia, otorinolaringoiatria, epatologia e nel trattamento dei neonati prematuri.

L'utilizzo di questo tipo di cellule staminali per promuovere la rigenerazione tissutale rappresenta una nuova opzione terapeutica per numerose patologie: a tal proposito il CB viene utilizzato con crescente interesse, essendo facile da ottenere senza rischi per la madre o per il neonato e non essendo soggetto a controversie etiche. I vantaggi delle CB MSC sono rappresentati dalla loro bassa reattività immunologica, dalla loro condizione vantaggiosa di sorgente neonatale e quindi meno colpita dai fenomeni di invecchiamento cellulare e dalle maggiori potenzialità di promuovere la rigenerazione tissutale in alcuni modelli animali, quando comparate alle cellule staminali del midollo osseo. Le cellule staminali cordonali presentano una ridotta incidenza di reazione da trapianto e di contaminazione con virus ematici (15). Queste cellule hanno la capacità di agire su due livelli: riducono l'apoptosi dei tessuti danneggiati, favorendo la rigenerazione tissutale e regolano il sistema immunitario (16-17). Attualmente la Cell Factory è impegnata in diversi studi che porteranno all'utilizzo delle CB MSC in una grave patologia renale, la glomerulo sclerosi focale progressiva, e nel trattamento di una particolare patologia respiratoria, la broncodisplasia (BPD) polmonare cronica del neonato pretermine, una delle più frequenti complicanze dei neonati prematuri. In diversi studi sono stati dimostrati gli effetti riparativi, rigenerativi e immunomodulanti delle MSC sia sul danno renale acuto che su quello cronico. Questo grazie all'effetto immunomodulante della terapia cellulare e alla sua efficacia nel controllo della malattia, che induce la remissione della malattia di base in casi in cui i trattamenti farmacologici tradizionali falliscono.

È stato inoltre dimostrato (18-19) che la rigenerazione tissutale è conseguente alla migrazione delle MSC nei tessuti danneggiati: si ritiene di poter sfruttare le proprietà delle CB MSC di promuovere tale rigenerazione grazie all'effetto pro-angiogenico e anti-apoptotico e di agire sulla cellula podocitaria (cellule altamente specializzate che si trovano all'interno della capsula di Bowman del nefrone) e sulla barriera di filtrazione glomerulare attraverso la secrezione di

sostanze e/o microvescicole che agiscano direttamente sul podocita. Questo porterebbe, oltre ad un controllo della malattia anche ad una riduzione della terapia immunosoppressiva con effetti positivi sulla riduzione degli effetti collaterali a medio e lungo termine.

Le CB MSC inoltre, sembrano essere anche estremamente indicate nel trattamento della BPD, che riconosce una componente infiammatoria fondamentale nella sua eziopatogenesi.

È stato dimostrato che l'uso di MSC somministrate per via endovenosa in un modello animale di danno da iperventilazione induce un incremento nell'ossigenazione sistemica, con significativa riduzione del gradiente alveolo-arteriolare di ossigeno (20).

Si ipotizza perciò che il trattamento con CBMSC potrà essere una strategia sicura ed efficace a breve e lungo termine per il trattamento e la prevenzione del danno polmonare cronico della prematurità, che attualmente manca di terapia efficace.

In conclusione, sono oggi disponibili cellule mesenchimali di grado farmaceutico prodotte in condizioni GMP anche dal sangue di cordone ombelicale, nuova e promettente sorgente di cellule staminali, che potranno essere utilizzate in protocolli sperimentali per il trattamento di gravi patologie, nel contesto della neonata medicina rigenerativa.

Bibliografia

- 1) Friedenstein, AJ, JF Gorskaja, and NN Kulagina. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976. 4: 267-74.
- 2) Caplan AI et al. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006. 98: 1076-84.
- 3) Pittenger MF et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999.284:143-7.
- 4) Erices A, P Conget and JJ Minguell. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000. 109:235-42.
- 5) Williams JT et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*, 1999.65:22-6.

- 6) Kuk PA et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001.7:211-28.
- 7) De Bari C et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 2001. 44:1928-42.
- 8) Gronthos S et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97):13625-30.
- 9) In't Anker PS et al. Amniotic fluid ads a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 2003102:1548-9.
- 10) Campagnoli C et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 2001. 98:2396-402.
- 11) Morigi M et al. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells*, 2010. 28: 513-22.
- 12) Caplan AI et al. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006. 98: 1076-84.
- 13) Yang YK et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*, 2006. 85:12-25.
- 14) Liu CH, Hwang SM. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*, 2005. 32:270-9.
- 15) Broxmeyer HE. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. In: *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-2010 May 26.
- 16) Hoogduijin et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. 2010;10:1496-500.
- 17) Hoogduijin M et al. Advancement of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation (MISOT). *Transplantation*, 2010.:124-126.

- 18) Imberti B et al. Insuline growth factor-1 susteins stem cell mediated renal repair. *JASN*, 2007. 18:2921.
- 19) Chen J et al. Kidney-derived mesenchymal stem cells contribute to vasculogenesis, angiogenesis and endothelial repair. *Kidney Int*, 2008. 74: 879–889.
- 20) Harrison JH, Lazo JS. High dose continuous infusion of Bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmunary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987; 243:1185-94.

Quale futuro per le cellule staminali?

Paolo Rebutta

Milano Cord Blood Bank, Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Dipartimento di Medicina Rigenerativa, Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Le cellule staminali sono attualmente oggetto di importanti ricerche finalizzate alla comprensione dei processi fisiopatologici che caratterizzano lo sviluppo delle malattie e alla preparazione di prodotti cellulari da impiegare a scopo di trapianto o di medicina rigenerativa.

Le cellule staminali 'embrionali', che hanno la massima capacità differenziativa verso tutti i tessuti dell'organismo (totipotenza), sono presenti nella massa interna della blastocisti, mentre cellule staminali 'adulte' di diverso tipo, con potenzialità differenziativa più ristretta (multipotenza), sono state identificate e caratterizzate nel midollo osseo e nel sangue del cordone ombelicale - che sono impiegati con successo da molti anni a scopo di trapianto emopoietico - e in altri organi fra cui il cuore, il fegato, il cervello e la cute.

La totipotenza delle cellule staminali embrionali, che ne rende difficile il controllo differenziativo in vivo, e la difficoltà di prelevarle da una blastocisti senza danneggiare l'embrione rendono assai problematico l'utilizzo terapeutico di queste cellule, che in molti Paesi è proibito per ragioni etiche. Di converso, le cellule staminali adulte non presentano particolari problematiche etiche per un loro utilizzo terapeutico, che può essere adeguatamente programmato nel contesto delle attuali normative che regolamentano la donazione e il trapianto di cellule e tessuti. Tuttavia, la loro frequenza relativamente bassa e la loro ridotta capacità differenziativa rende più complesso lo sviluppo di efficaci protocolli terapeutici innovativi, ad esempio in cardiologia, neurologia, epatologia, rispetto alle classiche applicazioni del trapianto emopoietico utilizzato da oltre 30 anni nel trattamento di leucemie, linfomi, immunodeficienze, talassemie, difetti metabolici.

Un significativo passo avanti nella ricerca sulle cellule staminali è stato fatto nel 2006 da un gruppo di ricercatori giapponesi guidati da Shinya Yamanaka, che ha messo a punto una procedura per indurre la pluripotenza in cellule adulte terminalmente differenziate, come i fibroblasti, riattivando 4 geni critici della fase embrionale (induced Pluripotent Stem cells, iPS). Nonostante il giustificato entusiasmo suscitato in molti ricercatori da questa innovativa procedura, numerosi problemi (stabilità genomica, memoria epigenetica e potenziale neoplastico delle cellule indotte) devono essere ancora risolti prima

che le cellule iPS possano essere impiegate in terapia. Il loro prevalente uso attuale consiste nello studio di modelli di patologia.

Un altro importante sviluppo è derivato dallo studio delle cellule staminali mesenchimali (mesenchymal stem cells - MSC), di cui è assai ricco il midollo osseo e il tessuto adiposo e che possono essere ottenute anche dal sangue del cordone ombelicale. Queste cellule presentano importanti caratteristiche che le rendono particolarmente adatte ai protocolli di medicina rigenerativa: capacità di indurre tolleranza immunologica nel ricevente (riducendo quindi le classiche problematiche di compatibilità legate al sistema HLA), significativo trofismo verso aree di danno tissutale e capacità di secernere numerosi fattori di rigenerazione tissutale nelle aree danneggiate.

L'utilizzo clinico delle cellule staminali sottoposte a complesse procedure di purificazione, coltura e caratterizzazione è regolamentato in Europa dalla 'Regulation 1394', che assimila i prodotti cellulari ai farmaci e che impone l'utilizzo delle 'Good Manufacturing Practices - GMP' (le norme che regolano la produzione farmaceutica) per la preparazione dei prodotti per terapia cellulare. Le GMP richiedono procedure, ambienti e personale dedicati, necessari a garantire la tracciabilità dei prodotti, la loro sicurezza e la registrazione degli eventi avversi. Ogni protocollo di terapia cellulare sperimentale deve essere autorizzato dall'Istituto Superiore di Sanità e ogni struttura (denominata usualmente 'cell factory') deve essere accreditata dall'AIFA.

Presso la Cell Factory 'Franco Calori' del Policlinico di Milano, accreditata dall'AIFA nel 2007, sono stati finora preparati, caratterizzati e/o distribuiti prodotti per terapia cellulare relativi a protocolli clinici in ematologia, neurologia, cardiologia, otorinolaringoiatria, epatologia, nefrologia. Alcune preliminari valutazioni economiche indicano che il costo di validazione (tre prove finalizzate alla documentazione della qualità del prodotto) di una procedura sperimentale ammonta a circa 55.000 euro, mentre il costo di produzione ammonta a circa 11.000 euro per prodotto. Gli elevati costi di validazione e produzione suggeriscono l'opportunità di centralizzare la preparazione dei prodotti per terapia cellulare in un numero limitato di siti accreditati dotati di sufficienti risorse e di promuovere collaborazioni cliniche multicentriche per selezionare un adeguato numero di pazienti necessari a valutare l'efficacia dei protocolli sperimentali. Lo sviluppo della ricerca sulle cellule staminali ha contribuito a promuovere programmi commerciali di conservazione di tali cellule nell'ipotesi di un loro possibile utilizzo futuro a scopo di autotrapianto. I principali programmi in quest'area riguardano la conservazione autologa del sangue del cordone ombelicale, che ha ottenuto nel mondo notevole interesse da parte delle donne in gravidanza e dei loro familiari, nonostante il prevalente parere negativo degli

esperti. Sulla validità ed eticità di questi programmi commerciali è infatti tuttora aperto un forte dibattito. L'opinione prevalente degli esperti del settore è di non raccomandare tale tipo di conservazione nelle famiglie in cui non vi sia un paziente affetto (o un rischio di procreare un figlio affetto) da una patologia trattabile con il trapianto di sangue del cordone ombelicale. Numerose società scientifiche di pediatria, medicina trasfusionale, trapianto, ostetricia e ginecologia hanno pubblicato specifici 'position papers' e 'opinions' sul tema. In Italia, dove sono attive 18 banche pubbliche di sangue del cordone ombelicale donato a scopo solidaristico per il trapianto nelle gravi malattie ematologiche indicate in precedenza, è proibita l'attività di bancaggio privato, mentre la conservazione 'dedicata' del sangue del cordone ombelicale per le famiglie con un paziente affetto o a rischio è effettuata gratuitamente dalle banche pubbliche. Le coppie che desiderano, nonostante il parere degli esperti, conservare in programmi commerciali il sangue del cordone ombelicale a scopo di futuro utilizzo autologo, possono farlo presso banche estere, previa autorizzazione all'esportazione.

Bibliografia

- 1) Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol*. 2011 Jul;10(7):649-56.
- 2) Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol*. 2011 May;13(5):497-505.
- 3) Narsinh K, Narsinh KH, Wu JC. Derivation of human induced pluripotent stem cells for cardiovascular disease modeling. *Circ Res*. 2011 Apr 29;108(9):1146-56.
- 4) Leclerc T, Thepenier C, Jault P, Bey E, Peltzer J, Trouillas M, Duhamel P, Barges L, Prat M, Bonderriter M, Lataillade JJ. Cell therapy of burns. *Cell Prolif*. 2011 Apr;44 Suppl 1:48-54.
- 5) Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury*. 2011 Jun;42(6):562-8.
- 6) Kubo H. Molecular basis of lung tissue regeneration. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Apr;59(4):231-44.

- 7) Pleasure D. Advances in translational research in neuromuscular diseases. *Arch Neurol*. 2011 Apr;68(4):429-33.
- 8) Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6083-90.
- 9) Locke M, Feisst V, Dunbar PR. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells*. 2011 Mar;29(3):404-11.
- 10) Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Mar;24(1):65-72.
- 11) Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011 Apr;11(4):268-77.
- 12) Shaw SW, David AL, De Coppi P. Clinical applications of prenatal and postnatal therapy using stem cells retrieved from amniotic fluid. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011 Apr;23(2):109-16.
- 13) Burns TC, Steinberg GK. Stem cells and stroke: opportunities, challenges and strategies. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Apr;11(4):447-61.
- 14) Charruyer A, Ghadially R. What's new in dermatology: epidermal stem cells. *G Ital Dermatol Venereol*. 2011 Feb;146(1):57-67.
- 15) Davis DR, Stewart DJ. Autologous cell therapy for cardiac repair. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Apr;11(4):489-508.
- 16) Carroll JE, Mays RW. Update on stem cell therapy for cerebral palsy. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Apr;11(4):463-71.
- 17) Tare RS, Kanczler J, Aarvold A, Jones AM, Dunlop DG, Oreffo RO. Skeletal stem cells and bone regeneration: translational strategies from bench to clinic. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010 Dec;224(12):1455-70.
- 18) Colombo A, Castellani M, Piccaluga E, Pusineri E, Palatresi S, Longari V, Canzi C, Sacchi E, Rossi E, Rech R, Gerundini P, Viecca M, Deliliers GL,

Rebulla P, Soligo D, Giordano R. Myocardial blood flow and infarct size after CD133+ cell injection in large myocardial infarction with good recanalization and poor reperfusion: results from a randomized controlled trial. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2011 Apr;12(4):239-48.

19) Castellani M, Colombo A, Giordano R, Pusineri E, Canzi C, Longari V, Piccaluga E, Palatresi S, Dellavedova L, Soligo D, Rebulla P, Gerundini P. The role of PET with ¹³N-ammonia and ¹⁸F-FDG in the assessment of myocardial perfusion and metabolism in patients with recent AMI and intracoronary stem cell injection. *J Nucl Med*. 2010 Dec;51(12):1908-16.

20) Montemurro T, Andriolo G, Montelatici E, Weissmann G, Crisan M, Colnaghi MR, Rebulla P, Mosca F, Péault B, Lazzari L. Differentiation and migration properties of human foetal umbilical cord perivascular cells: potential for lung repair. *J Cell Mol Med*. 2011 Apr;15(4):796-808.

21) Brevini TA, Pennarossa G, Antonini S, Paffoni A, Tettamanti G, Montemurro T, Radaelli E, Lazzari L, Rebulla P, Scanziani E, de Eguileor M, Benvenisty N, Ragni G, Gandolfi F. Cell lines derived from human parthenogenetic embryos can display aberrant centriole distribution and altered expression levels of mitotic spindle check-point transcripts. *Stem Cell Rev*. 2009 Dec;5(4):340-52.

22) Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, Lo Cicero V, Imberti B, Abbate M, Zoja C, Cassis P, Longaretti L, Rebulla P, Introna M, Capelli C, Benigni A, Remuzzi G, Lazzari L. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells*. 2010 Mar 31;28(3):513-22.

23) Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*. 2010 Feb;98(2):93-107.

