

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"



Dipartimento di Sanità Pubblica

**Scuola di Dottorato in Sanità Pubblica e Medicina
Preventiva**

XXXI Ciclo

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani

Tesi di dottorato di ricerca

***L'ETEROGENEITÀ DEI FIBROBLASTI DERMICI COME
FATTORE IN GRADO DI CONDIZIONARE L'EFFICACIA
DELLA RIPROGRAMMAZIONE CELLULARE***

***DERMAL FIBROBLASTS HETEROGENEITY AS A MAJOR
FACTOR INFLUENCING THE EFFICIENCY OF CELL
REPROGRAMMING***

RELATORE:

Prof.ssa Clotilde Castaldo

CANDIDATO:

Dott.ssa Antonia Carfora

INDICE

ABSTRACT	2
1.INTRODUZIONE.....	4
2. IPOTESI E SCOPO DELLO STUDIO.....	9
3.MATERIALI E METODI.....	10
3.1 CAMPIONI TISSUTALI	10
3.2 COLTURA CELLULARE	10
3.3 SAGGIO DI MIGRAZIONE.....	11
3.4 ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA E DELL'INDICE DI PROLIFERAZIONE.....	11
3.5 INDICE APOPTOTICO	12
3.6 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA.....	13
3.7 ARRAY PER FATTORI DI CRESCITA	13
3.8 POTENZIALE DI DIFFERENZIAMENTO.....	14
3.9 ANALISI STATISTICA	15
4. RISULTATI	16
4.1 MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI <i>IN VITRO</i>	16
4.2 INDICE PROLIFERATIVO E APOPTOTICO E CAPACITÀ DI MIGRAZIONE	16
4.3 ESPRESSIONE DI MARCATORI MESENCHIMALI ED EPITELIALI	17
4.4 DIFFERENZIAMENTO VERSO LA LINEA MESODERMICA E RILASCIO DI FATTORI DI CRESCITA	18
5. DISSCUSSIONE E CONCLUSIONI	19
6. ICONOGRAFIA	23
7. BIBLIOGRAFIA.....	33

ABSTRACT

Fibroblasts are a heterogeneous cell population as testified by the absence of specific markers and by their documented retention of positional memory. Fibroblasts have recently gained much attention as they are the adult somatic cell most commonly used for reprogramming to induced pluripotent stem cells (iPSCs). iPSCs are somatic cells genetically reprogrammed to a pluripotent state that makes them resemble embryonic stem cells (ESCs). iPSCs are a very promising tool for regenerative medicine because of their autologous origin and their ability to differentiate towards cell of all three germ layers. However, the iPSCs reprogramming technology is still affected by variable and low efficiency. We hypothesize that the heterogeneity of fibroblasts may play a role in determining cell reprogramming. To test our hypothesis, we isolated and cultured human dermal fibroblasts (HDFs) from five different anatomic sites (abdomen, breast, neck, thigh and arm) and performed a comparative study analyzing their morphology, proliferation, apoptosis and ability to migrate. Further, we evaluated whether the expression of mesenchymal and epithelial markers, the ability to differentiate and release growth factors in culture medium varied among fibroblasts from different anatomic sites. Our results revealed that, although fibroblasts from different anatomic sites had similar morphology, all other features varied according to the region from which they were isolated. Furthermore, we observed similarity between fibroblasts and mesenchymal stem cells (MSCs) that also varied among HDFs populations. A low proliferation index, the release of specific growth factors, the expression of mesenchymal markers and the

promptness to differentiate towards mesodermal lineages, might improve the efficiency of reprogramming. On these bases, abdomen dermal fibroblasts might represent the ideal candidates for reprogramming; since they have a low proliferation index, express high amount of mesenchymal markers, differentiate more precociously and release growth factors that improve the efficiency of reprogramming. Further the high expression of mesenchymal markers and their ability to differentiate more precociously suggest that fibroblasts isolated from abdomen skin could represent a less differentiated phenotype, more similar to MSCs than the other population of fibroblasts and probably easier to reprogram. Therefore, our data offer novel perspectives in the field of cell reprogramming, suggesting that the choice of the dermal population of fibroblasts might influence the efficiency of reprogramming itself.

1.INTRODUZIONE

I fibroblasti sono le cellule più abbondanti del tessuto connettivo (1). Essi svolgono importanti funzioni quali la deposizione della matrice extracellulare (ECM), la regolazione del differenziamento epiteliale e dell'inflammation e sono coinvolti nel riparo delle ferite (2, 3). I fibroblasti sintetizzano molti componenti della ECM come il collagene di tipo I, III, IV e V, la fibronectina e la laminina (2, 4) e secernono metalloproteasi della matrice (MMP), svolgendo un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi della ECM e regolandone il suo *turnover* (5, 6). Inoltre, essi mantengono l'omeostasi dell'epitelio adiacente attraverso la secrezione di fattori di crescita e dirigono le interazioni tra le cellule epiteliali e mesenchimali (7). In condizioni normali, i fibroblasti svolgono inoltre un ruolo importante nella riparazione delle ferite: invadono le lesioni, sintetizzano l'ECM e possiedono elementi del citoscheletro che facilitano la contrazione delle ferite in guarigione (2). I fibroblasti sono ampiamente distribuiti in varie regioni del corpo e sono facili da coltivare *in vitro*. Essi sono identificati per la loro morfologia fusiforme, la capacità di aderire alle piastre di coltura e per l'assenza di marcatori tipici di altre linee cellulari e allo stesso tempo per l'espressione di tipici marcatori mesenchimali quali CD90, CD105, CD73 e vimentina (1, 8). Tuttavia, lo studio dei fibroblasti *in vivo* è limitato dalla mancanza di un marcatore molecolare specifico che permetta di identificarli, sebbene la proteina specifica per i fibroblasti di tipo 1 (FSP1) sia stata proposta quale marcatore specifico, la desmina, invece, è

considerata un marcatore sito-specifico, essendo espressa dai fibroblasti cutanei (9).

I fibroblasti dermici adulti derivati da diverse regioni anatomiche mostrano una diversità funzionale, legata principalmente alla loro origine embrionale e alla specificità del microambiente nel quale risiedono (1). I fibroblasti viscerali e dermici provenienti da diverse regioni del corpo hanno, infatti, una diversa origine embrionale: quelli della testa derivano dalla cresta neurale, quelli della cute del dorso dal dermatomo e dal miotomo ed infine quelli della cute del ventre dalla piastra laterale del mesoderma (10-12). Tali differenze sembrano essere dettate dal microambiente nel quale risiedono, da cui deriva una “*memoria posizionale*” (1), tanto che i fibroblasti isolati da diversi siti anatomici possono essere considerati come tipi cellulari distinti (5). Al fine di caratterizzare queste variazioni sito-specifiche alcuni Autori hanno isolato e coltivato i fibroblasti primari da 43 diverse regioni anatomiche, come braccio, gamba, mano, piede e organi interni, ed hanno analizzato 337 geni (13) (Fig.1) coinvolti nella determinazione dell'identità posizionale, del destino cellulare, della migrazione cellulare, della sintesi dei componenti della ECM e del rimodellamento dell'ECM (13). Le differenze osservate nell'espressione genica sono state correlate a tre *pattern* segmentali: prossimo-distale, antero-posteriore, dermico-non-dermico (Fig.2). (14). L'eterogeneità topografica, quindi, sembra legata al mantenimento dei pattern embrionali di espressione genica. Oltre alle differenze tra i fibroblasti isolati da diverse regioni del corpo, i fibroblasti all'interno di un singolo tessuto come la cute rappresentano una popolazione disomogenea (1) (Fig.3). Infatti, i fibroblasti del

derma papillare e del derma reticolare mostrano caratteristiche morfologiche diverse quando coltivati *in vitro* (15, 16). I fibroblasti papillari presentano una morfologia fusata mentre quelli reticolari possiedono una morfologia più appiattita e molti di essi esprimono marcatori specifici dei miofibroblasti come l' α -actina del muscolo liscio (α -SMA) (17). Inoltre, i fibroblasti reticolari esprimono geni coinvolti prevalentemente nell'organizzazione del citoscheletro, nella motilità cellulare e nello sviluppo neuronale, mentre i fibroblasti papillari esprimono geni coinvolti nella via di attivazione del complemento, indicandone un loro coinvolgimento nel sistema immunitario cutaneo (17). I fibroblasti papillari, inoltre, mostrano una maggiore capacità proliferativa ed una maggiore suscettibilità all'invecchiamento, rispetto ai fibroblasti reticolari (15, 18). Infatti, con l'aumentare dell'età, i fibroblasti isolati dal derma papillare, ma non quelli del derma reticolare, assumono in coltura dimensioni eterogenee, sono affetti da una diminuzione dell'indice proliferativo ed esprimono elevati livelli di fattori di crescita, tra i quali il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) (15).

I fibroblasti sono cellule di origine mesenchimale. Nel corso degli anni molti studi hanno messo a confronto i fibroblasti con le cellule staminali mesenchimali (MSC). Entrambe le popolazioni possiedono un'elevata capacità proliferativa e sono in grado di differenziare in osteoblasti, adipociti e condroblasti *in vitro* (19). Inoltre, i fibroblasti e le MSC presentano proprietà immunomodulatorie simili, esprimono marcatori comuni come CD73, CD90, CD105, CD146 ed FSP1, aderiscono alla plastica in condizioni di coltura standard e non mostrano differenze morfologiche significative all'analisi al microscopio a contrasto di fase (20-29).

Inoltre, le due popolazioni cellulari esprimono geni coinvolti nella sintesi dell'ECM (FN1, GSPG2 e GPC4), nel *pathway* di Wnt (WISP1 e VCAM1), e nella regolazione mesodermica (ID1, HOXA5, HOXB6, HOHB6, TBX5) (30). Comparando i fibroblasti e le MSC alcuni Autori (28) hanno suggerito che potrebbero rappresentare lo stesso tipo cellulare (28). Sebbene in alcuni studi recenti i fibroblasti e le MSC siano state definite come popolazioni cellulari diverse, tali differenze sono paragonabili a quelle esistenti tra le MSC o i fibroblasti derivati da diversi tessuti (28). Recentemente i fibroblasti dermici umani sono stati geneticamente riprogrammati mediante trasduzione retrovirale di quattro fattori di trascrizione (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) ad uno stato indifferenziato simile a quello delle cellule staminali embrionali (ESC) generando le cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) (31). La notevole somiglianza delle hiPSC alle ESC e la loro origine da cellule somatiche adulte, rende le hiPSC uno strumento estremamente prezioso per la medicina rigenerativa, per lo studio di modelli di malattia, per la creazione e la sperimentazione di farmaci (32-34), evitando i problemi etici associati all'impiego delle ESC e il problema del rigetto (31). Tuttavia, l'applicazione clinica delle hiPSC è ancora preclusa da problemi tecnici correlati, in particolare, sia alla tecnologia di riprogrammazione che alla scarsa efficienza della stessa.

Sebbene la tecnologia di riprogrammazione sia stata significativamente migliorata grazie all'utilizzo di metodi non integrativi basati sull'utilizzo di vettori episomali (35), mRNA sintetici modificati (36) o sulla somministrazione diretta di proteine di riprogrammazione (37), l'efficienza della riprogrammazione delle cellule umane

è ancora pari al 2% con metodi non integrativi e solo del 6,2% con metodi integrativi (38). Tuttavia, sebbene grazie all'impiego di nuove strategie basate sull'attivazione di potenziatori o sull'inibizione di ostacoli del processo di riprogrammazione si sia ottenuto un aumento dell'efficienza della riprogrammazione (39) fino all'80-100% (40) tali metodi hanno chiarito i meccanismi che regolano la riprogrammazione delle cellule, ma non consentono di superare i limiti dell'impiego clinico delle hiPSC. È stato inoltre dimostrato che l'efficienza della riprogrammazione delle hiPSC varia a seconda del tipo cellulare da cui vengono ottenute (41, 42). Il fibroblasto dermico adulto è stato la prima cellula umana riprogrammata con successo (31) e, ad oggi, è ancora la cellula umana più utilizzata per la riprogrammazione. Nonostante sia stato esaminato il potenziale di altre cellule somatiche adulte facilmente ottenibili, quali le cellule del sangue periferico (PBC) e le cellule derivate dall'urina (HUC), la bassissima efficienza di riprogrammazione e l'altissima variabilità interindividuale (38), hanno rafforzato il ruolo dei fibroblasti dermici nella produzione di hiPSC, per la facilità di isolamento da singola biopsia cutanea. Tuttavia, come dimostrato da numerosi studi condotti indipendentemente da diversi Ricercatori, i fibroblasti provenienti da diversi siti anatomici sono diversi e mantengono una memoria posizionale (5, 13). Inoltre, la diversità fenotipica e funzionale dei fibroblasti cutanei recentemente descritta dovrebbe essere considerata quando si pianifica la riprogrammazione dei fibroblasti ad hiPSC.

2. IPOTESI E SCOPO DELLO STUDIO

I fibroblasti sono una popolazione dinamica e versatile di cellule di origine mesenchimale. Essi sono stati le prime cellule a essere riprogrammate ad hiPSC. Uno dei principali vantaggi del loro utilizzo nella terapia cellulare è la loro elevata disponibilità, in quanto possono essere facilmente isolati dalle biopsie cutanee e coltivati *in vitro*.

I fibroblasti dermici isolati da diverse regioni anatomiche mostrano differenze per quel che riguarda l'origine embrionale ed il programma di espressione genica che ne influenza la loro memoria posizionale. Tuttavia, condividono molte caratteristiche con le MSC, come provato da diversi studi presenti in letteratura.

Partendo da tali basi, abbiamo ipotizzato che l'origine anatomica dei fibroblasti potesse influenzare la loro riprogrammazione. Da qui l'obiettivo principale dello studio è stato quello di caratterizzare e confrontare i fibroblasti dermici isolati da diversi siti anatomici al fine di comprenderne l'eterogeneità e, allo stesso tempo, di identificare una possibile, anche parziale, sovrapposizione con la popolazione delle MSC. In particolare abbiamo valutato la morfologia, l'espressione di marcatori specifici, l'indice di proliferazione e di apoptosi, la velocità di migrazione, la produzione di fattori di crescita ed il potenziale di differenziamento dei fibroblasti dermici adulti isolati da diversi siti anatomici, confrontandoli e analizzando eventuali differenze.

3.MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI TISSUTALI

Sono stati utilizzati frammenti cutanei ottenuti da cinque siti anatomici differenti (n = 25, 5 colli, 5 mammelle, 5 addomi, 5 cosce) di pazienti (n = 25, donne, età media 41,04 +/- 7,624) sottoposte a interventi di chirurgia plastica.

3.2 COLTURA CELLULARE

I campioni sono stati sminuzzati e i frammenti sono stati posti sotto vetrini coprioggetto sterili in piastre di coltura da 35 mm, coltivati in DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con FBS al 10% (Sigma-Aldrich) e Penicillina-Streptomicina allo 0,5% (Sigma-Aldrich) e posti successivamente in un incubatore a 37°C con una percentuale di CO₂ del 5%. Le piastre sono state osservate quotidianamente ad un microscopio a contrasto di fase (Olympus, Tokyo, Giappone) e il mezzo di coltura è stato sostituito ogni 3 giorni. La fuoriuscita delle cellule dai frammenti è stata documentata mediante l'acquisizione di immagini ad un computer collegato al microscopio. I fibroblasti confluenti, isolati da tutte le regioni anatomiche, sono stati sincronizzati ponendoli in siero allo 0,1% per 48 ore prima di essere tripsinizzati e piastrati in presenza di siero al 10%, come descritto in precedenza (43). Al fine di evitare qualsiasi effetto dovuto all'ambiente nativo, tutti i fibroblasti primari sono stati tenuti in coltura *in vitro* nelle stesse condizioni per cinque passaggi (13). I fibroblasti al passaggio 5 sono stati coltivati per

un'ulteriore settimana al fine di valutare le loro caratteristiche e il loro comportamento *in vitro*. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

3.3 MIGRAZIONE CELLULARE

Al fine di creare un monostrato confluyente sono state piastrate $1,6 \times 10^5$ cellule per piastra da 35 mm. Le piastre sono state tenute in coltura per circa 48 ore a 37°C, in modo da consentire alle cellule di aderire e distribuirsi. Il monostrato cellulare è stato interrotto mediante un puntale di pipetta sterile. Dopo un lavaggio per rimuovere i detriti cellulari, il mezzo è stato sostituito. Successivamente le piastre sono state osservate al microscopio a contrasto di fase (Nikon, Tokyo, Giappone) provvisto di incubatore (Okolab, Pozzuoli, Italia). La migrazione dei fibroblasti da entrambi i bordi è stata documentata acquisendo un'immagine ogni dieci minuti per 12 ore mediante fotocamera digitale collegata al microscopio (Nikon). I dati sono stati analizzati con software NIS Elements (Nikon) ed espressi come velocità media di migrazione \pm SE.

3.4 IMMUNOCITOCHIMICA E INDICE DI PROLIFERAZIONE

Le cellule sono state piastrate, coltivate per 4 giorni in DMEM con FBS al 10%, quindi fissate in paraformaldeide al 4% e sottoposte a colorazione immunocitochimica. Dopo brevi lavaggi in PBS, le cellule sono state bloccate con siero di asino al 10% (Sigma-Aldrich), quindi incubate per 1 ora a 37°C con anticorpi primari diretti contro vimentina, caderina, actina del muscolo liscio, Fattore VIII (Sigma-Aldrich), CD90, CD105 (Abcam, Cambridge, UK) e Ki67

(Leica Biosystems, Wetzlar, Germania). Dopo lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con gli anticorpi secondari corrispondenti (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) coniugati con fluoresceina o con rodamina. In seguito ad un ulteriore lavaggio in PBS, le cellule sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente con il colorante nucleare DAPI ed infine montate con vetrini coprioggetto in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). L'analisi microscopica è stata effettuata mediante microscopio a fluorescenza (Nikon). Per quanto riguarda la colorazione per ki67, tre osservatori indipendenti hanno contato tutte le cellule e la frazione di cellule positive per ki67. È stata fatta la media dei risultati e l'indice di proliferazione è stato calcolato ed espresso come percentuale media delle cellule in ciclo \pm SE.

3.5 INDICE APOPTOTICO

Per determinare l'indice apoptotico, i fibroblasti isolati dalle diverse regioni anatomiche sono stati piastrati, coltivati per 3 giorni e successivamente fissati in paraformaldeide all'1%. Le cellule apoptotiche sono state rilevate mediante il saggio TUNEL indiretto utilizzando il kit ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germania), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Successivamente, tre osservatori indipendenti hanno contato tutte le cellule e la frazione di cellule apoptotiche mediante un microscopio a fluorescenza (Nikon). L'indice apoptotico è stato calcolato ed espresso come percentuale media delle cellule apoptotiche \pm SE.

3.6 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'RNA è stato estratto mediante Isol-RNA Lysis Reagent (5Prime, Amburgo, Germania), sciolto in acqua priva di RNasi da fibroblasti coltivati per 7 giorni. La concentrazione finale di RNA è stata determinata mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). L'RNA di ciascun campione è stato retroscritto in cDNA mediante QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germania) e l'espressione genica è stata quantificata mediante real-time PCR utilizzando la PrecisionPLUS qPCR Master Mix (Primer Design, Southampton, UK). I primer utilizzati per i geni tipici delle cellule mesenchimali sono riportati nella tabella 1 (Tab.1). Tutti i campioni sono stati testati in triplicato con il gene costitutivo (GAPDH) per correggere variazioni nella qualità e quantità di RNA. La quantificazione comparativa dell'espressione dei geni di interesse è stata eseguita in base al ciclo soglia (Ct) utilizzando il metodo del $\Delta\Delta Ct$. I valori ottenuti sono stati mediati ed espressi come medie \pm SE.

3.7 ARRAY PER FATTORI DI CRESCITA

I fibroblasti dermici provenienti dalle cinque regioni anatomiche (collo, mammella, braccio, addome e coscia) sono stati piastrati e coltivati in DMEM con 10% di FBS. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state trattate per i tre giorni successivi con terreno FibroGRO privo di siero (Millipore, Burlington, MA, USA). Il mezzo di coltura è stato, quindi, raccolto dai fibroblasti di tutte le regioni dermiche ed analizzato mediante l'Human Growth Factor Array C1 (Raybiotech, Norcross, GA, USA) per rilevare contemporaneamente 41 fattori di

crescita o loro recettori. Dopo il saggio, le membrane sono state esposte ad una lastra autoradiografica al fine di visualizzare il segnale degli spot. Il confronto numerico delle densità del segnale dei fattori di crescita è stato eseguito come descritto in precedenza (44). Le densità del segnale degli spot delle immagini scansionate degli array sono state calcolate utilizzando il software di densitometria ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Il background è stato poi sottratto dai dati della densitometria e i valori ottenuti sono stati normalizzati utilizzando i segnali dei controlli positivi. I dati sono stati espressi come medie \pm SE.

3.8 POTENZIALE DI DIFFERENZIAMENTO

I fibroblasti sono stati coltivati con mezzi di coltura in grado di indurre il differenziamento adipogenico, condrogenico o osteogenico come precedentemente descritto (45). Le piastre sono state controllate ogni giorno mediante un microscopio a contrasto di fase (Olympus) e i cambiamenti morfologici verificatisi sono stati documentati. Il mezzo di coltura è stato sostituito ogni 3 giorni ed i fibroblasti sono stati tenuti in coltura per 21 giorni. Successivamente le cellule sono state lavate in PBS e fissate per 20 minuti in paraformaldeide al 4%. Il differenziamento è stato confermato mediante opportune colorazioni istologiche attraverso l'utilizzo di kit specifici (Bio-optica, Milano, Italia). Il differenziamento adipogenico è stato valutato utilizzando la colorazione Oil red O come indicatore di accumulo lipidico intracellulare, il differenziamento condrogenico usando la colorazione Alcian blu come indicatore di una matrice

extracellulare ricca di glicosamminoglicani, mentre il differenziamento osteogenico attraverso la colorazione von Kossa, quale indicatore di una matrice extracellulare calcificata.

3.9 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante il programma GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), utilizzando il test di analisi della varianza (ANOVA) e il test di Tukey. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato utilizzato per identificare le differenze statisticamente significative.

4. RISULTATI

4.1 MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI *IN VITRO*

La fuoriuscita dei fibroblasti dai frammenti cutanei è avvenuta dopo 6-7 giorni di coltura (Fig. 4 A). Le cellule hanno aderito alle piastre, dove si sono distribuite ed hanno raggiunto la confluenza in un tempo compreso tra 14 e 21 giorni (Fig. 4 B). Sebbene la maggior parte delle cellule avesse una morfologia fusiforme, in tutte le piastre di coltura sono stati osservati fibroblasti dalla forma stellata (Fig. 4 A).

4.2 INDICE PROLIFERATIVO E APOPTOTICO E CAPACITÀ DI MIGRAZIONE

L'indice di proliferazione è risultato significativamente più basso ($p \leq 0,05$) nei fibroblasti isolati dalla cute di addome e dalla coscia, rispetto ai fibroblasti isolati dalle altre regioni, essendo pari a $0,347 \pm 0,094\%$ nei fibroblasti derivati dall'addome e raggiungendo i valori più elevati $2,664 \pm 0,303\%$ nei fibroblasti isolati dalla cute del collo (Fig. 5 A-B). Allo stesso modo, l'indice apoptotico è risultato variabile tra le diverse popolazioni di fibroblasti. In particolare, l'apoptosi spontanea dei fibroblasti dermici della mammella e dell'addome è risultata significativamente più alta ($3.792 \pm 0.234\%$ e $2.089 \pm 0.188\%$) rispetto ai fibroblasti dermici del collo, del braccio e della coscia (rispettivamente $0.564 \pm 0,090\%$, $1,059 \pm 0,131\%$ e $0,600 \pm 0,148\%$) (Fig. 5 C-D). Inoltre, la velocità di migrazione dei fibroblasti dermici del braccio e della coscia è risultata più elevata (rispettivamente $14.209 \pm 3.769 \mu\text{m/h}$ e $10.499 \pm 2.973 \mu\text{m/h}$) rispetto a quella dei

fibroblasti delle altre regioni, la cui velocità di migrazione è risultata equiparabile, variando tra $5.237 \pm 1.749 \mu\text{m/h}$ per i fibroblasti dermici di addome e $7,179 \pm 2,4449 \mu\text{m/h}$ per i fibroblasti dermici del collo (Fig. 5 E-G).

4.3 ESPRESSIONE DI MARCATORI MESENCHIMALI ED EPITELIALI

Tutti i fibroblasti in coltura sono risultati negativi per marcatori epiteliali ed endoteliali come l'E-caderina e il Fattore VIII (Fig. 6), mentre è emersa una variabilità riguardo l'espressione di marcatori mesenchimali correlata al sito di origine anatomica. In particolare, per quanto riguarda l'espressione della vimentina e di CD105 i fibroblasti in coltura hanno mostrato immunopositività per la vimentina o per CD105 (Fig. 6) variabile a seconda del sito anatomico. I fibroblasti isolati dal collo e dalla mammella esprimono prevalentemente la vimentina (Fig. 6 A e D), mentre i fibroblasti dermici dell'addome e della coscia esprimono in maggior misura CD105 (Fig. 6 J ed M). Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione di CD90, invece, non è emersa alcuna differenza significativa tra i fibroblasti isolati dalle diverse regioni anatomiche (Fig. 6). Inoltre, l'analisi dell'espressione genica mediante qRT-PCR ha confermato la presenza di trascritti di geni tipici delle cellule mesenchimali. Nello specifico, l'espressione di CD90, ECM2, FN1 e WISP1 è risultata paragonabile per i fibroblasti dermici isolati da diversi siti anatomici. Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) sono state osservate, invece, nell'espressione di CD105 e CD146. In particolare, è stata osservata una maggiore espressione di CD105 nei fibroblasti della mammella, del

braccio e dell'addome, mentre un'espressione significativamente più elevata di CD146 è stata riscontrata nei fibroblasti del braccio e dell'addome (Fig. 7).

4.4 DIFFERENZIAMENTO VERSO LA LINEA MESODERMICA E RILASCIO DI FATTORI DI CRESCITA

Per testare la capacità di differenziamento, i fibroblasti dermici umani sono stati coltivati in presenza di siero di cavallo o fattore trasformante di tipo β (TGF- β) o desametasone, acido ascorbico e β -glicerofosfato. Nonostante i fibroblasti isolati da tutte le diverse regioni anatomiche fossero in grado di differenziare in condrociti, osteoblasti e adipociti (Fig. 8), i fibroblasti di addome hanno mostrato un evidente cambiamento fenotipico già al sesto giorno di coltura, mentre i fibroblasti di tutte le altre regioni hanno richiesto un tempo variabile tra i 10 e i 15 giorni. La presenza di specifici fattori di crescita in grado di influenzare la riprogrammazione è stata rilevata attraverso l'array proteico eseguito sul terreno di coltura ottenuto dai fibroblasti isolati da diversi siti anatomici. Sono state osservate differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) tra i fibroblasti per quanto riguarda il rilascio del fattore di crescita dell'epidermide (EGF), degli epatociti (HGF), derivato dalle piastrine (PDGF), del TGF- β e del VEGF (Fig. 9). In particolare, i fibroblasti dermici di addome hanno rilasciato maggiori quantità di HGF, PDGF e VEGF, e quantità significativamente più basse di EGF e TGF- β .

5. DISSCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il fibroblasto è stata la prima cellula somatica adulta ad essere riprogrammata con successo, e al momento è ancora la cellula più utilizzata per la riprogrammazione. Tuttavia, mentre è stato dimostrato che l'origine cellulare e le caratteristiche della cellula influenzano la riprogrammazione (42) e che i fibroblasti non sono una popolazione omogenea (46), non erano state ancora valutate le caratteristiche dei fibroblasti *in vitro*, né era stato scelto accuratamente il sito di origine dei fibroblasti prima di effettuare una riprogrammazione. Il nostro studio ha lo scopo di confrontare e analizzare le caratteristiche dei fibroblasti dermici umani in grado di influenzare l'efficienza della riprogrammazione, al fine di sottolineare quanto sia importante selezionare accuratamente la popolazione ideale di fibroblasti per migliorare l'efficienza della riprogrammazione stessa.

I fibroblasti dermici derivati da cinque siti anatomici diversi (collo, mammella, braccio, addome e coscia) sono stati isolati e coltivati *in vitro* nelle stesse condizioni. Tutti i fibroblasti hanno aderito alla piastra di coltura e non hanno espresso marcatori specifici di altre linee cellulari. La loro morfologia *in vitro* è apparsa variabile, in accordo con studi presenti in letteratura (46), da una forma allungata e fusata ad una stellata (Fig. 4). Tuttavia, molte altre caratteristiche quali l'espressione di marcatori mesenchimali, la velocità di migrazione, l'indice di proliferazione, la rapidità ad acquisire un fenotipo diverso e il rilascio di fattori di crescita sono risultate variabili tra i fibroblasti dermici da diversi siti anatomici. Per quanto riguarda i marcatori mesenchimali, i fibroblasti in coltura hanno

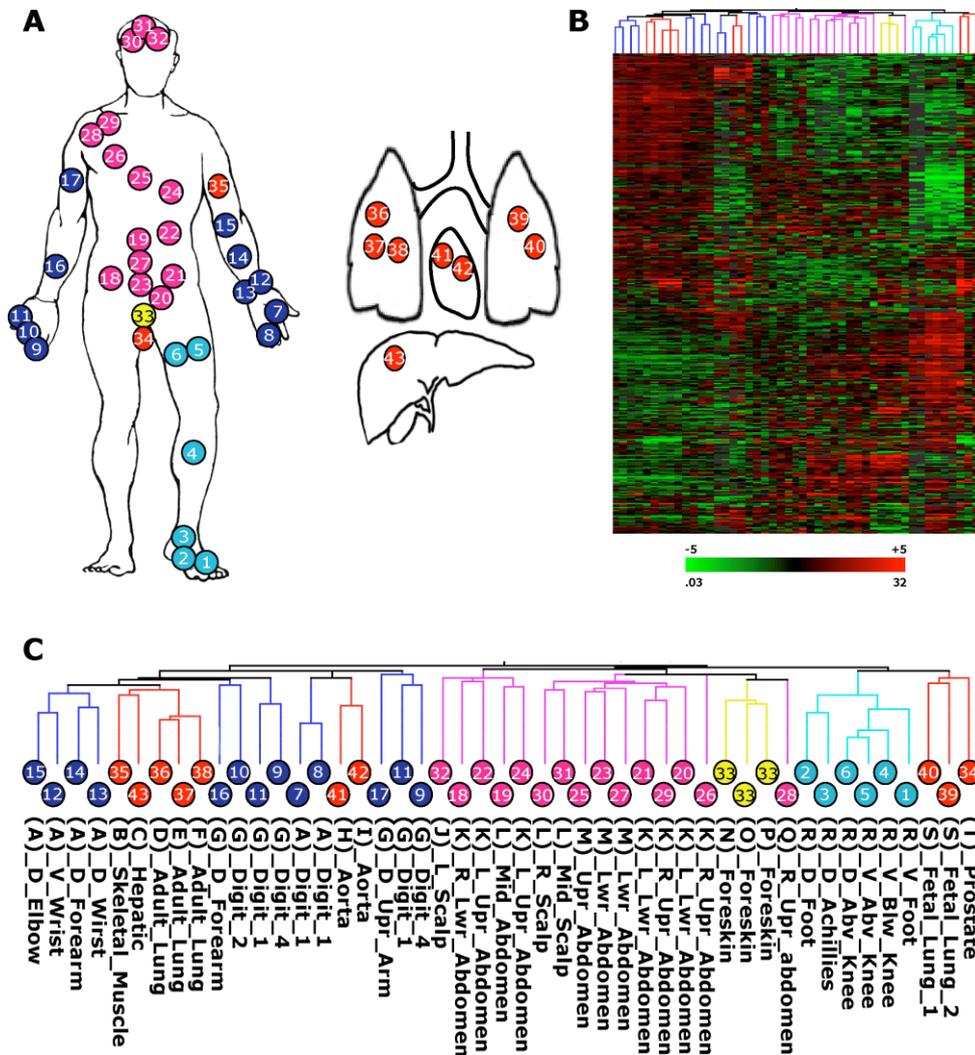
mostrato una prevalente espressione di vimentina o CD105 (Fig. 6 e Fig. 7). Questa caratteristica è risultata in accordo con la diversa capacità di migrazione dei fibroblasti, poiché la vimentina è un filamento intermedio mesenchimale essenziale per assicurare la migrazione cellulare (1, 47). Infatti, la velocità di migrazione dei fibroblasti del braccio, prevalentemente positivi per vimentina, è risultata considerevolmente più alta rispetto a quelli isolati dalle altre regioni anatomiche (Fig. 5). Inoltre, i fibroblasti isolati dalla cute del braccio, del collo e della mammella, prevalentemente vimentina-positivi, hanno mostrato un indice proliferativo significativamente più alto rispetto a quelli isolati dalla cute di addome e coscia, prevalentemente CD105-positivi (Fig. 5). Tale evidenza è in linea con studi precedenti che correlano una ridotta espressione di vimentina ad un basso indice proliferativo (43). Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che un basso indice di proliferazione aumenta l'efficienza della riprogrammazione (48-50). Di conseguenza, la differenza nell'indice di proliferazione dei fibroblasti isolati da diversi siti anatomici potrebbe suggerire indirettamente una diversa risposta alla riprogrammazione. Nonostante tutti i fibroblasti esprimessero geni tipici delle cellule mesenchimali (8, 24), è stata osservata un'eterogeneità nell'espressione di CD105 e CD146 e in particolare i fibroblasti dermici di addome hanno mostrato un'espressione più alta di entrambi i marcatori. I nostri dati sono in disaccordo con studi precedenti, i quali proponevano di utilizzare CD146 come marcatore delle MSC, in quanto non espresso dai fibroblasti (24, 51). Tuttavia, mentre è dimostrata un'eterogeneità anche delle MSC, queste non possono comunque essere inequivocabilmente distinte dai fibroblasti (28). Infatti, le MSC, oltre a

condividere con i fibroblasti caratteristiche morfologiche e l'espressione di marcatori di superficie, mostrano una notevole variabilità tra i tessuti di origine e tra i donatori (52-54) e le MSC isolate dal tessuto adiposo sono state descritte come una popolazione di cellule negative per CD146 (55, 56). Pertanto, l'espressione di CD90, CD105 e CD146 da parte dei fibroblasti isolati dalla cute di addome solleva la questione spinosa, e ancora non risolta, per cui i fibroblasti e le MSC potrebbero rappresentare la stessa popolazione (57, 58). Sulla base delle nostre osservazioni e quelle di altri Autori (8, 24, 56), è possibile considerare che i fibroblasti rappresentino uno stadio differenziativo delle MSC e dedurre che la popolazione cellulare di fibroblasti comprenda un numero variabile di MSC, la cui proporzione è correlata al sito di origine anatomica. Ciò potrebbe comportare una diversa risposta da parte dei fibroblasti dermici isolati da diversi siti anatomici alla tecnologia di riprogrammazione. Tale ipotesi è pienamente supportata dalla capacità dei fibroblasti di differenziare in condrociti, osteoblasti e adipociti (30, 56, 59, 60) e dall'evidenza che i fibroblasti isolati dalle diverse regioni differiscano in tale capacità, confermando che il sito di origine è responsabile della diversità funzionale dei fibroblasti. La presenza di specifici fattori di crescita in grado di influenzare la riprogrammazione (61-64) ha fornito ulteriori indizi sulla diversità dei fibroblasti e sulla loro diversa capacità di rispondere alla tecnologia di riprogrammazione. In particolare l'EGF, che stimola la proliferazione dei fibroblasti (65) e di conseguenza potrebbe ridurre l'efficienza di riprogrammazione (48), è risultato significativamente ridotto nei fibroblasti dermici di addome che presentano un basso indice proliferativo e significativamente più elevato nei

fibroblasti dermici del braccio con un indice proliferativo più elevato. Al contrario, il rilascio di fattori di crescita noti per la loro capacità di promuovere la riprogrammazione cellulare, come GM-CSF (66), HGF (67), PDGF (68, 69) e VEGF (63) è risultato significativamente più alto nei fibroblasti dermici di addome (Fig. 9). Inoltre, poiché la riprogrammazione dei fibroblasti ad iPSC richiede una transizione mesenchimale-epiteliale (MET) (70), i fattori coinvolti nell'attivazione della MET o l'inibizione del processo opposto, ossia la EMT, hanno un potenziale ruolo critico nella riprogrammazione. Il rilascio di TGF- β , noto induttore di EMT modulabile per aumentare l'efficienza della riprogrammazione (64), da parte dei fibroblasti dermici di addome è risultato significativamente più basso.

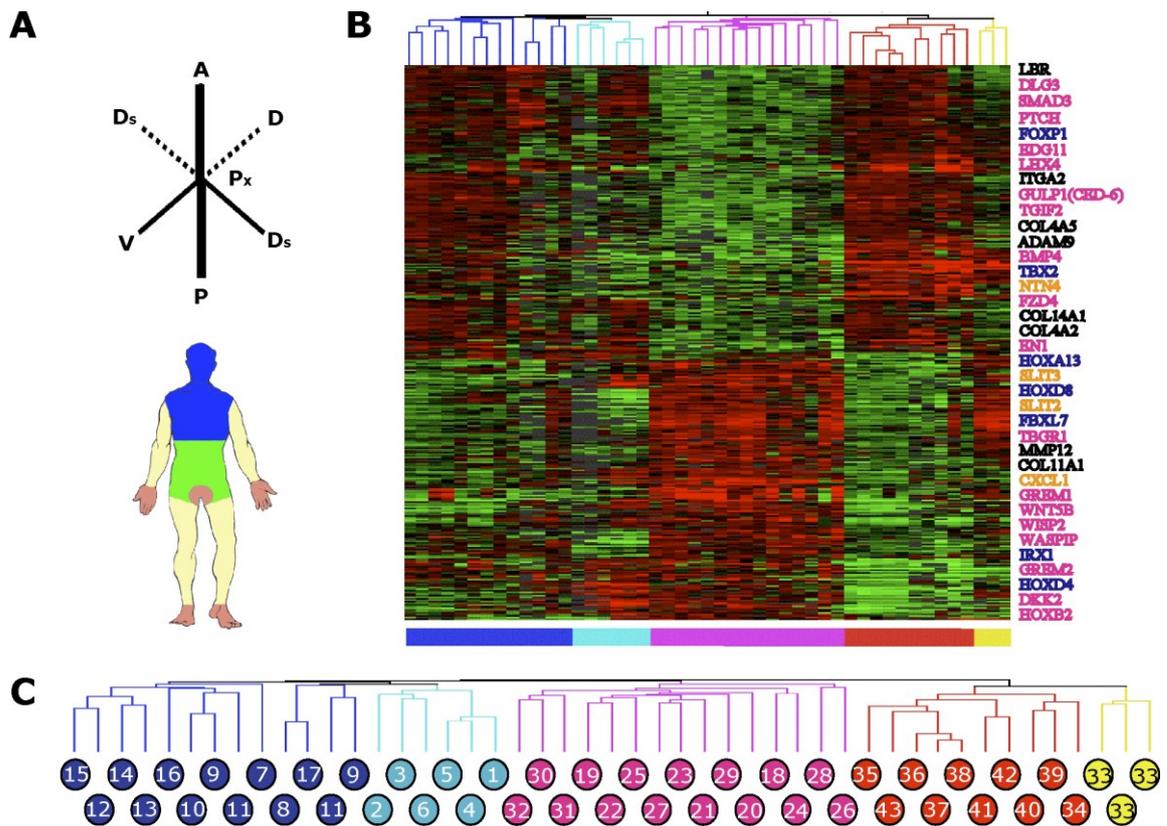
In conclusione, i fibroblasti dermici umani derivati da diversi siti anatomici hanno caratteristiche diverse, tra cui l'espressione di marcatori mesenchimali, l'indice di proliferazione, la capacità di differenziare nelle linee cellulari mesenchimali, la produzione ed il rilascio di fattori di crescita. Poiché tutte queste caratteristiche possono influire notevolmente sull'efficienza della riprogrammazione, l'origine topografica dei fibroblasti potrebbe influenzare l'induzione e l'efficienza della riprogrammazione. Inoltre i fibroblasti isolati dalla cute di addome potrebbero rappresentare i candidati ideali per la riprogrammazione anche in virtù di una loro maggiore sovrapposibilità alla popolazione di MSC (57, 58).

6. ICONOGRAFIA



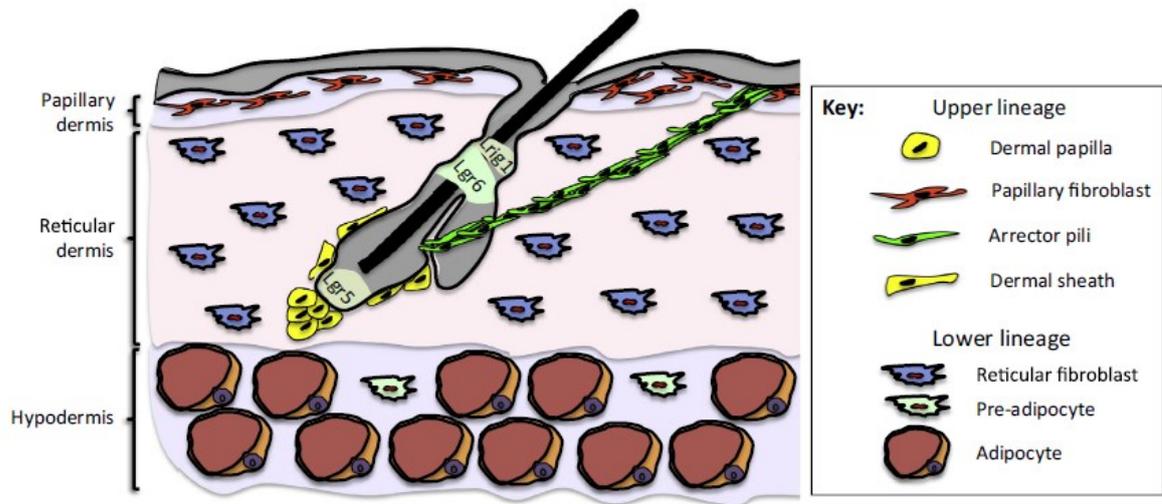
Rinn JL et al. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* 2006;2(7):e119.

Fig. 1: Immagine rappresentativa della diversità dell'espressione genica dei fibroblasti umani. **A:** 47 popolazioni di fibroblasti sono state isolate da 43 regioni anatomiche: braccio (cerchi blu), gamba (cerchi turchesi), tronco (cerchi rosa), prepuzio (cerchi gialli) e organi interni (cerchi rossi). **B:** Diversità nel programma di espressione genica nelle 47 popolazioni di fibroblasti analizzate. Ogni colore rappresenta un gene ed ogni colonna una popolazione di fibroblasto. **C:** Similarità nel profilo globale di espressione genica di 47 popolazioni di fibroblasti, 35 delle quali sono state *clusterizzate* e rappresentano principalmente cellule della stessa origine anatomica (braccio, gamba, tronco, prepuzio e regioni non dermiche).



Rinn JL et al. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* 2006;2(7):e119.

Fig. 2: Immagine rappresentativa della variazione dell'espressione genica nei fibroblasti in base a tre divisioni anatomiche. **A:** Modello posizionale in cui ogni campione, da cui sono stati ottenuti i fibroblasti, appartiene ad un segmento. L'analisi dei 47 campioni di fibroblasti ha permesso di classificarli in Anteriori (blu), Posteriori (verde) Proximali (giallo), Distali (rosa), e non dermici (non mostrati). **B:** Mappa dei 337 geni presi in esame **C:** Cluster dei 47 campioni di fibroblasti organizzato in base all'espressione dei 337 geni analizzati in relazione alla stessa regione anatomica.



TRENDS in Cell Biology

Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology*. 2015;25(2):92-9.

Fig. 3: Immagine rappresentativa delle differenze nella morfologia, densità cellulare e composizione della matrice extracellulare tra i fibroblasti del derma reticolare e papillare.

Gene symbol	Forward sequence Reverse sequence	Amplicon length (nt)
GAPDH	5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCG-3' 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	114
CD90	5'-CTAGTGGACCAGAGCCTTCG-3' 5'-GCCCTCACACTTGACCAGTT-3'	96
CD105	5'-CCTCTACCTCAGCCCACACT-3' 5'-CTGTCTAACTGGAGCAGGAACTC-3'	92
CD146	5'-AGCCAAACATCCAGGTCAAC-3' 5'-TACCCGTTCCCTCCCTACACA-3'	88
ECM2	5'-ATCCTTTTCAAGTTTTCTGGAG-3' 5'-TGCCCTTTACCAAACAGTGTC-3'	80
FN1	5'-ACCGAGGTGACTGAGACCAC-3' 5'-GACACAACGATGCTTCCTGA-3'	137
WISP1	5'-TGGCAGCAGTGACAGCA-3' 5'-GGAGCTGGGGTAAAGTCCAT-3'	88

Tabella 1: Sequenze dei primer utilizzati nelle reazioni di RT-PCR

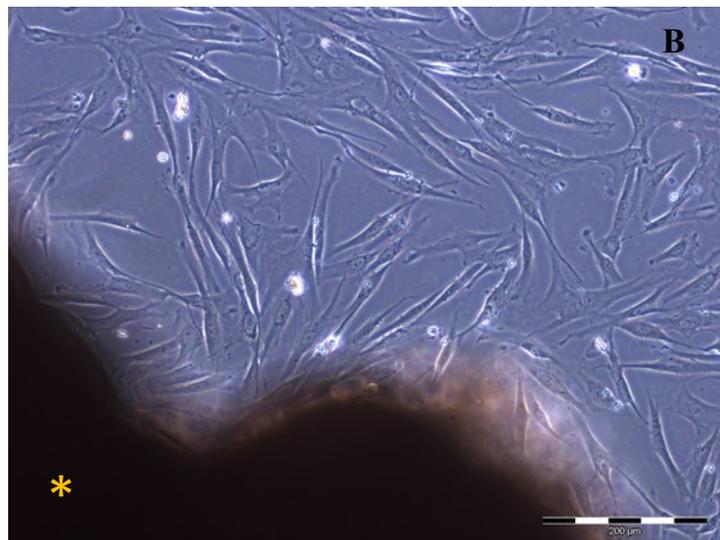
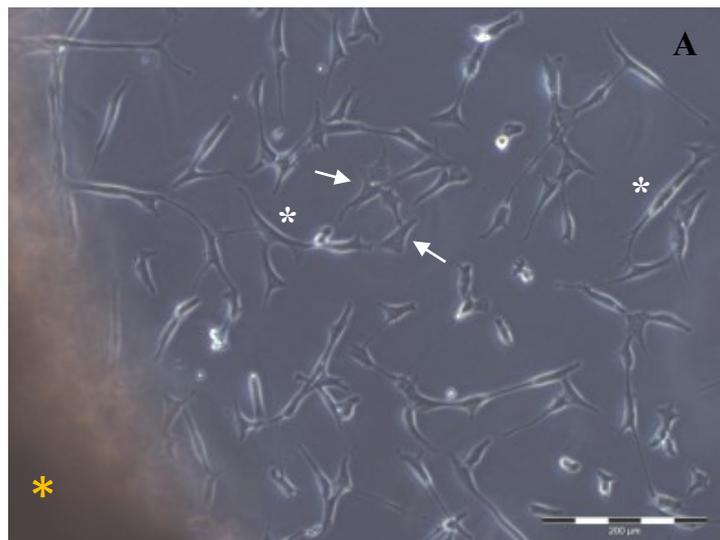


Fig. 4: Immagini a contrasto di fase dei fibroblasti *in vitro*. **A:** *Outgrowth* da un frammento cutaneo (asterisco giallo) dei fibroblasti in coltura dalla forma fusata (asterisco bianco) e stellata (freccia bianca) dopo un intervallo di tempo compreso tra i 6 ed i 7 giorni. **B:** I fibroblasti in coltura raggiungono la confluenza in un intervallo di tempo compreso tra i 14 ed i 21 giorni.

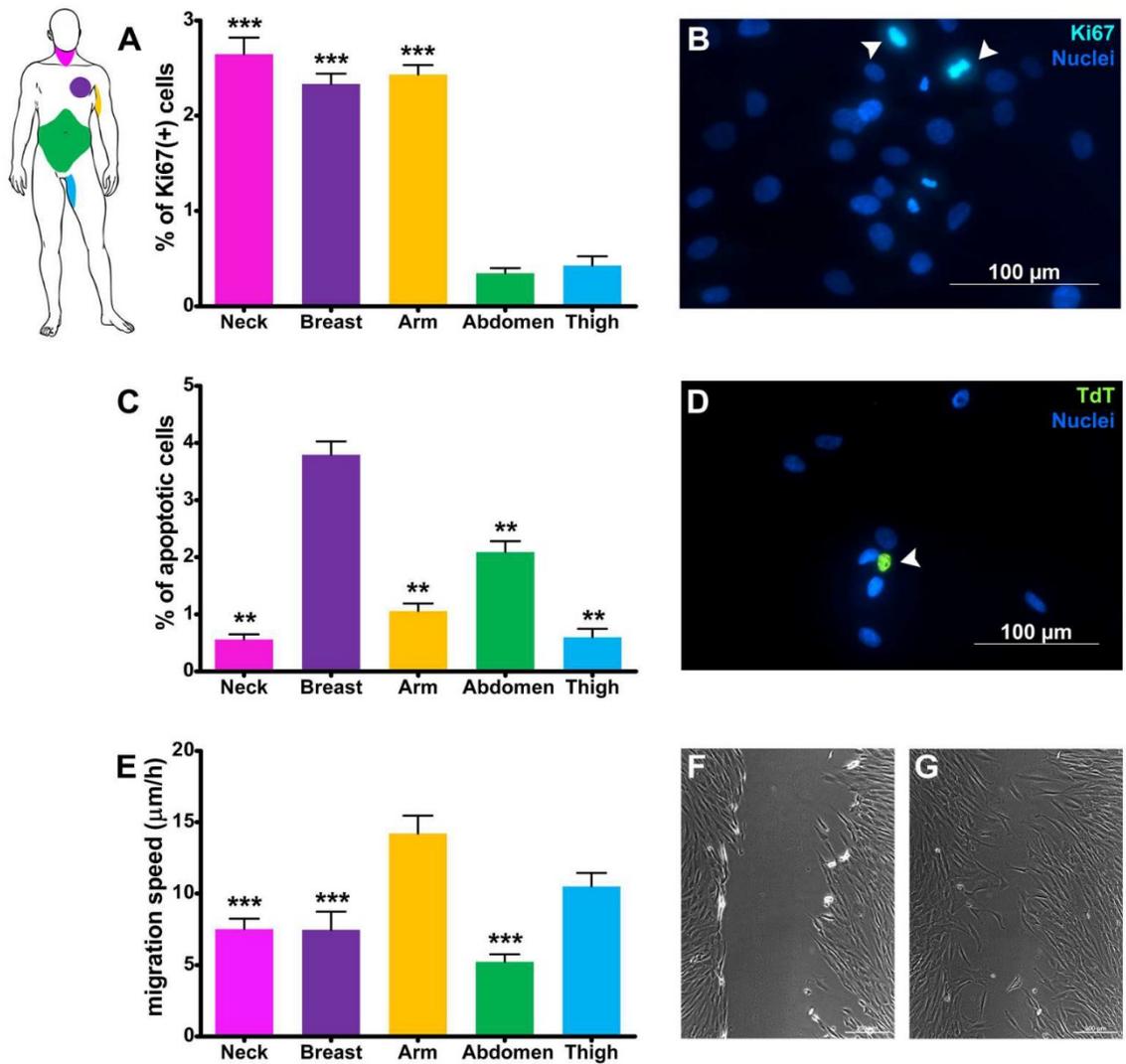


Fig. 5: Quantificazione dell'indice di proliferazione (**A**), del tasso apoptotico (**B**) e della velocità di migrazione (**E**) dei fibroblasti isolati da diversi siti anatomici. **B:** immagine rappresentativa delle cellule positive per ki-67, nella coltura di fibroblasti (freccia bianca); **D:** immagine rappresentativa di una cellula apoptotica nella coltura di fibroblasti (freccia bianca); **F** e **G:** immagini rappresentative dello *scratch wound assay* dei fibroblasti in coltura al tempo 0 e dopo 12 ore.

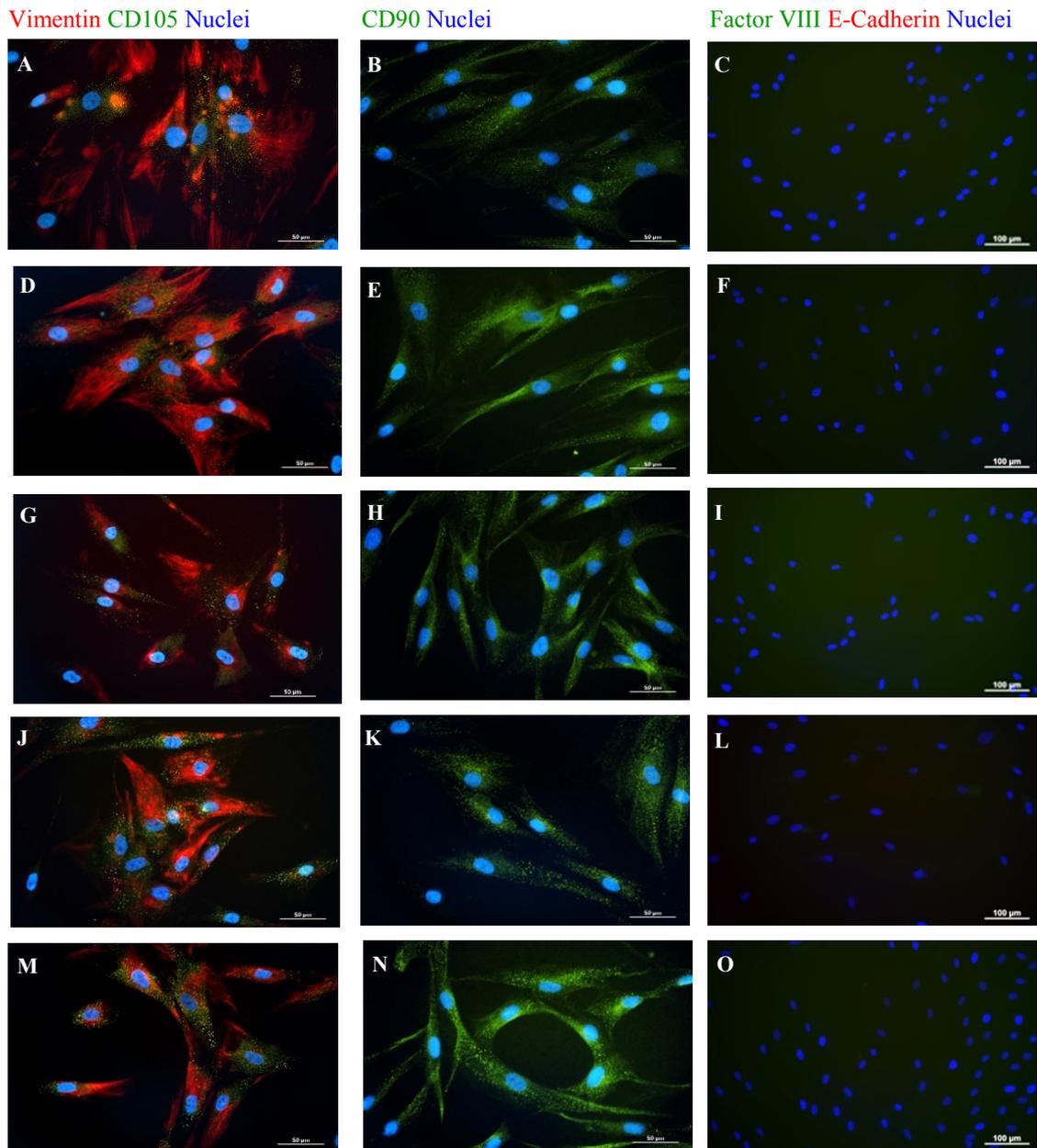


Fig. 6: Immagini rappresentative dell'analisi immunocitochimica dell'espressione *in vitro* di marcatori mesenchimali (A-B, D-E, G-H, J-K e M-N) ed epiteliali (C, F, I, L e O) da parte di fibroblasti dermici del collo (A-C), della mammella (D-F), del braccio (G-I), dell'addome (J-L) e della coscia (M-O).

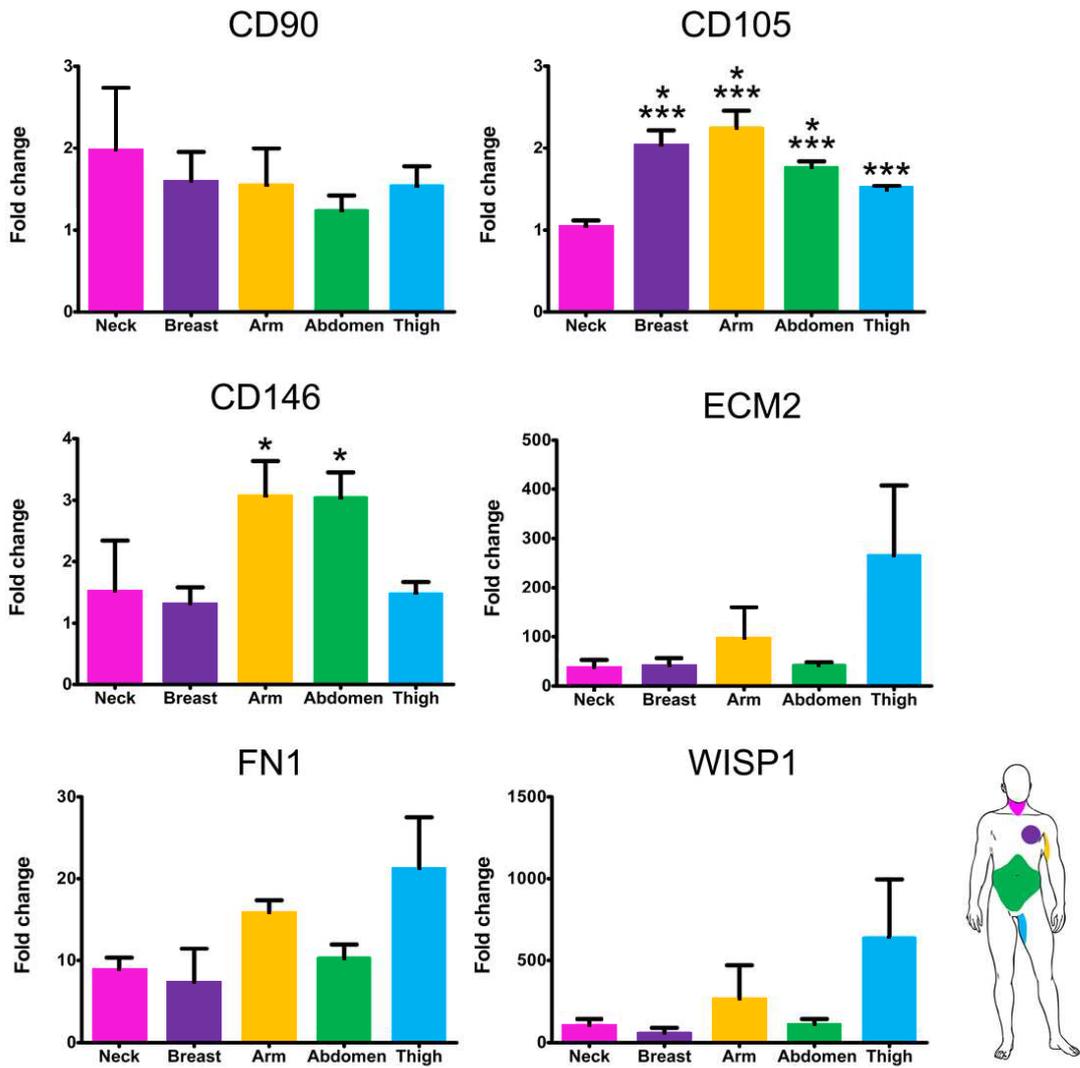


Fig. 7: Analisi mediante RT-PCR dell'espressione di geni caratteristici delle cellule mesenchimali.

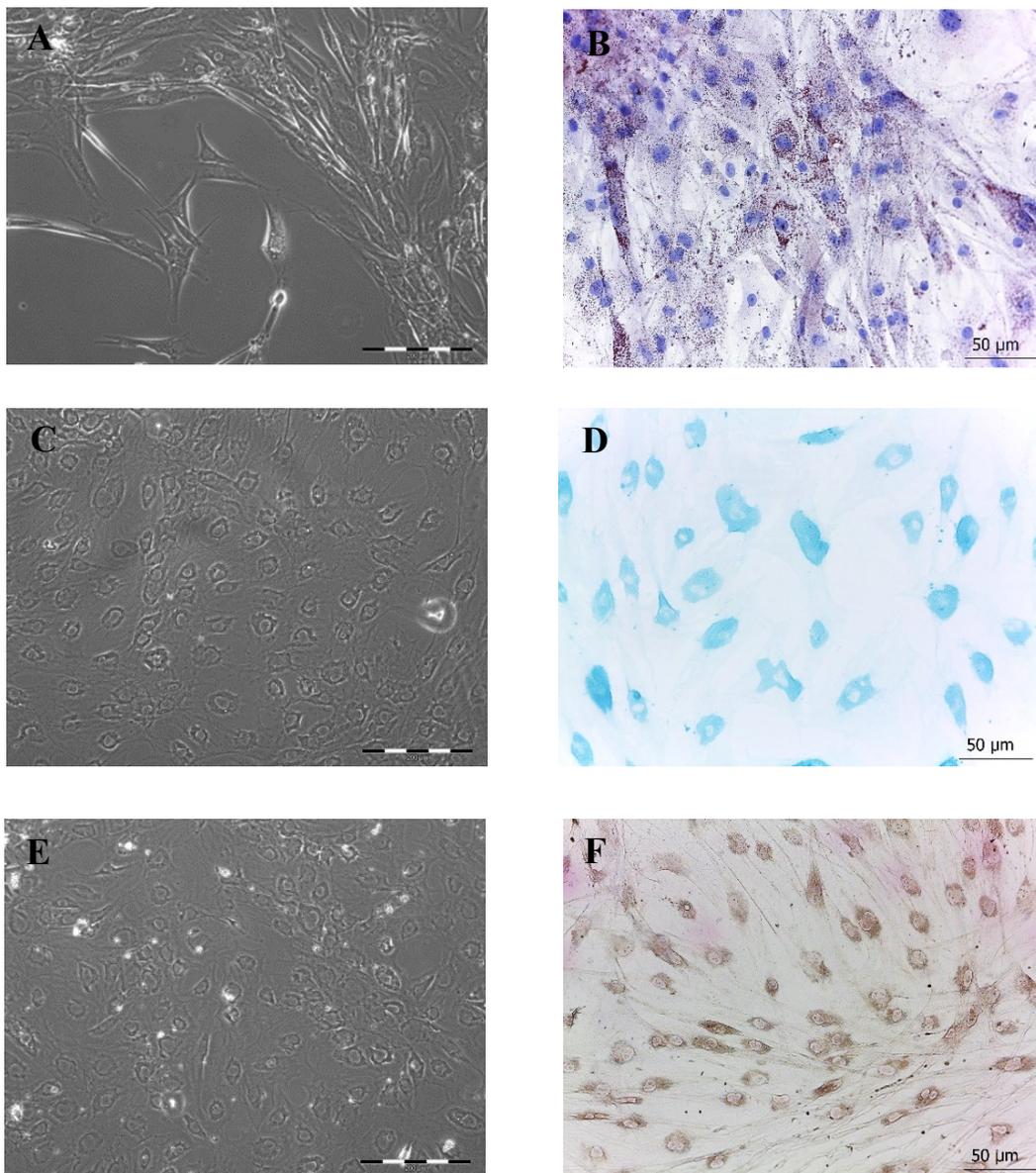


Fig. 8: Immagini a contrasto di fase rappresentative del cambiamento fenotipico dei fibroblasti dopo l'induzione al differenziamento adipogenico (A), condrogenico (C) ed osteogenico (E). Immagini rappresentative delle colorazioni Oil red O (B), Alcian Blue (D) e Von Kossa (F) che hanno confermato l'avvenuto differenziamento.

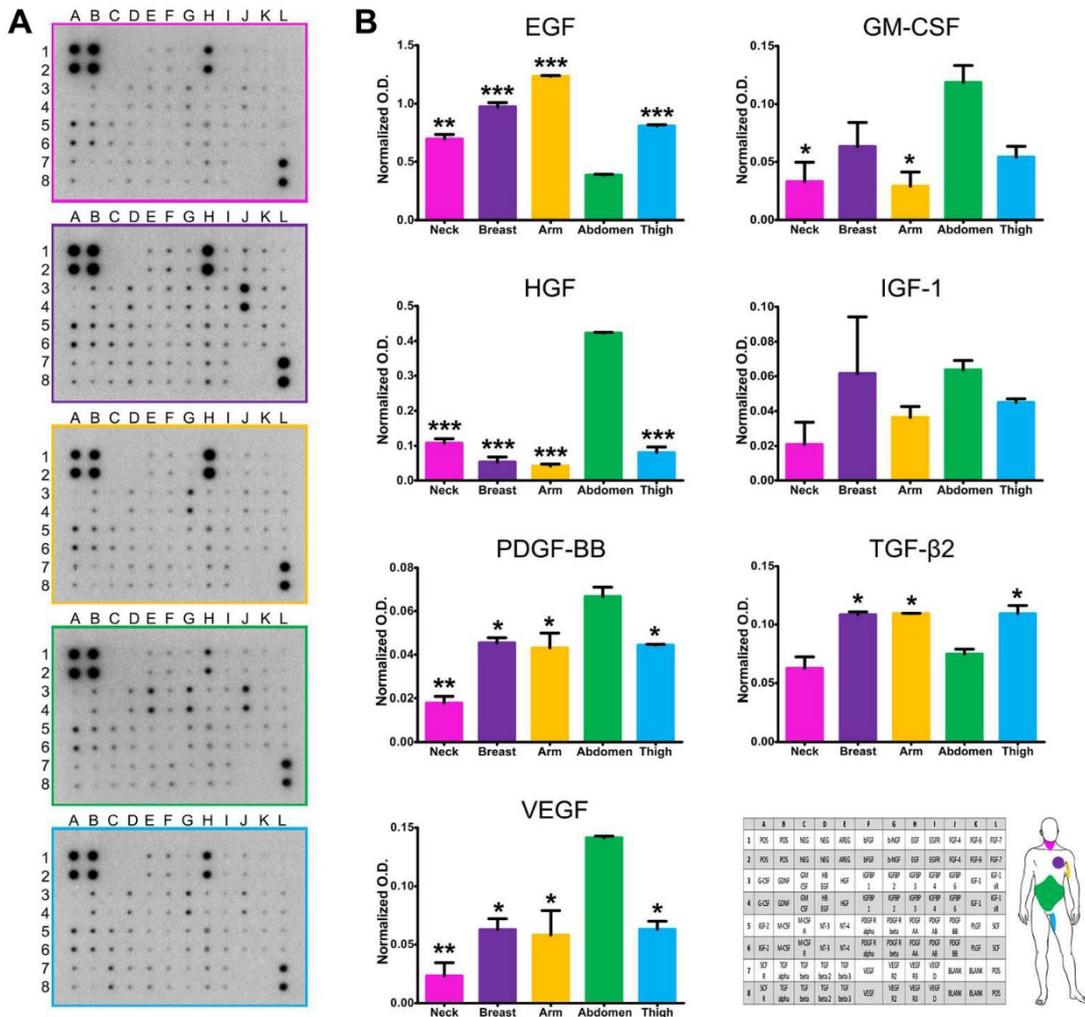


Fig. 9: Immagine rappresentativa della produzione ed il rilascio *in vitro* di fattori di crescita da parte dei fibroblasti dermici isolati da diverse regioni anatomiche. **A:** rilascio dei fattori di crescita da parte dei fibroblasti isolati da diversi siti anatomici. **B:** quantificazione dei fattori di crescita selezionati. In basso a destra è possibile visualizzare l'array proteico di riferimento ed uno schema dei siti anatomici da cui sono stati derivati i fibroblasti, come riferimento.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol.* 2015;94(11):483-512.
2. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
3. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, Salmon M, et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* 2005;26(3):150-6.
4. Rodemann HP, Müller GA. Characterization of Human Renal Fibroblasts in Health and Disease: II. In Vitro Growth, Differentiation, and Collagen Synthesis of Fibroblasts From Kidneys With Interstitial Fibrosis. *American Journal of Kidney Diseases.* 1991;17(6):684-6.
5. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12877-82.
6. Simian M HY, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development.* 2001;128:3117-31.
7. Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science.* 2002;296(5570):1046-9.
8. Lupatov AY, Vdovin AS, Vakhrushev IV, Poltavtseva RA, Yarygin KN. Comparative analysis of the expression of surface markers on fibroblasts and fibroblast-like cells isolated from different human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2015;158(4):537-43.
9. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):392-401.
10. Houzelstein D, Cheraud Y, Auda-Boucher G, Fontaine-Perus J, Robert B. The expression of the homeobox gene Msx1 reveals two populations of dermal progenitor cells originating from the somites. *Development.* 2000;127(10):2155-64.
11. Ohtola J, Myers J, Akhtar-Zaidi B, Zuzindlak D, Sandesara P, Yeh K, et al. beta-Catenin has sequential roles in the survival and specification of ventral dermis. *Development.* 2008;135(13):2321-9.

12. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol.* 2006;175(6):1005-15.
13. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* 2006;2(7):e119.
14. Rinn JL, Wang JK, Liu H, Montgomery K, van de Rijn M, Chang HY. A systems biology approach to anatomic diversity of skin. *J Invest Dermatol.* 2008;128(4):776-82.
15. Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One.* 2008;3(12):e4066.
16. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009;276:161-214.
17. Janson DG, Saintigny G, van Adrichem A, Mahe C, El Ghalbzouri A. Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2012;132(11):2565-72.
18. Harper RA, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science.* 1979;204(4392):526-7.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
20. Hanson SE, Kim J, Johnson BH, Bradley B, Breunig MJ, Hematti P, et al. Characterization of mesenchymal stem cells from human vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope.* 2010;120(3):546-51.
21. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005;85(8):962-71.
22. Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2008;17(11):925-32.
23. Jaeger K, Neuman T. Human dermal fibroblasts exhibit delayed adipogenic differentiation compared with mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011;20(8):1327-36.

24. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*. 2008;36(5):642-54.
25. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*. 2007;179(3):1595-604.
26. Alt E, Yan Y, Gehmert S, Song YH, Altman A, Gehmert S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell*. 2011;103(4):197-208.
27. Chang Y, Li H, Guo Z. Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(3):703-14.
28. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, et al. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol*. 2016;136(2):85-97.
29. Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol*. 2002;160(1):7-13.
30. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402-16.
31. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
32. Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(3):170-82.
33. Zeltner N, Studer L. Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. *Current opinion in cell biology*. 2015;37:102-10.
34. Skalova S, Svadlakova T, Shaikh Qureshi WM, Dev K, Mokry J. Induced pluripotent stem cells and their use in cardiac and neural regenerative medicine. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):4043-67.
35. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011;8(5):409-12.

36. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618-30.
37. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):472-6.
38. Li J, Song W, Pan G, Zhou J. Advances in understanding the cell types and approaches used for generating induced pluripotent stem cells. *J Hematol Oncol*. 2014;7:50.
39. Ebrahimi B. Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell regeneration (London, England)*. 2015;4:10.
40. Vidal SE, Amlani B, Chen T, Tsigos A, Stadtfeld M. Combinatorial modulation of signaling pathways reveals cell-type-specific requirements for highly efficient and synchronous iPSC reprogramming. *Stem cell reports*. 2014;3(4):574-84.
41. Cao S, Loh K, Pei Y, Zhang W, Han J. Overcoming barriers to the clinical utilization of iPSCs: reprogramming efficiency, safety and quality. *Protein & cell*. 2012;3(11):834-45.
42. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2010;28(8):848-55.
43. Wang N, Stamenovic D. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;279(1):C188-94.
44. Di Meglio F, Nurzynska D, Romano V, Miraglia R, Belviso I, Sacco AM, et al. Optimization of Human Myocardium Decellularization Method for the Construction of Implantable Patches. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2017;23(9):525-39.
45. Seiler C, Gazdhar A, Reyes M, Benneker LM, Geiser T, Siebenrock KA, et al. Time-lapse microscopy and classification of 2D human mesenchymal stem cells based on cell shape picks up myogenic from osteogenic and adipogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;8(9):737-46.
46. Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Franz PI. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(14):5112-6.

47. McInroy L, Maatta A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(1):109-14.
48. Xu Y, Wei X, Wang M, Zhang R, Fu Y, Xing M, et al. Proliferation rate of somatic cells affects reprogramming efficiency. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(14):9767-78.
49. Gupta MK, Teo AK, Rao TN, Bhatt S, Kleinridders A, Shirakawa J, et al. Excessive Cellular Proliferation Negatively Impacts Reprogramming Efficiency of Human Fibroblasts. *Stem cells translational medicine*. 2015;4(10):1101-8.
50. Wu L, Wu Y, Peng B, Hou Z, Dong Y, Chen K, et al. Oocyte-Specific Homeobox 1, Obox1, Facilitates Reprogramming by Promoting Mesenchymal-to-Epithelial Transition and Mitigating Cell Hyperproliferation. *Stem cell reports*. 2017;9(5):1692-705.
51. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-92.
52. Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem cell reviews*. 2011;7(3):560-8.
53. McLeod CM, Mauck RL. On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis. *European cells & materials*. 2017;34:217-31.
54. Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(9):2806-12.
55. Dufrane D, Lafosse A. A Simple Method to Determine the Purity of Adipose-Derived Stem Cell-Based Cell Therapies. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(11):1575-9.
56. Blasi A, Martino C, Balducci L, Saldarelli M, Soleti A, Navone SE, et al. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vasc Cell*. 2011;3(1):5.
57. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009;94(2):258-63.
58. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy*. 2012;14(5):516-21.

59. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
60. Junker JP, Sommar P, Skog M, Johnson H, Kratz G. Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs*. 2010;191(2):105-18.
61. Ma X, Kong L, Zhu S. Reprogramming cell fates by small molecules. *Protein & cell*. 2017;8(5):328-48.
62. Qin H, Diaz A, Blouin L, Lebbink RJ, Patena W, Tanbun P, et al. Systematic identification of barriers to human iPSC generation. *Cell*. 2014;158(2):449-61.
63. Yamakawa H, Muraoka N, Miyamoto K, Sadahiro T, Isomi M, Haginiwa S, et al. Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factor Promote Cardiac Reprogramming under Defined Conditions. *Stem cell reports*. 2015;5(6):1128-42.
64. Maherali N, Hochedlinger K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Current biology : CB*. 2009;19(20):1718-23.
65. You DH, Nam MJ. Effects of human epidermal growth factor gene-transfected mesenchymal stem cells on fibroblast migration and proliferation. *Cell proliferation*. 2013;46(4):408-15.
66. Firas J, Liu X, Nefzger CM, Polo JM. GM-CSF and MEF-conditioned media support feeder-free reprogramming of mouse granulocytes to iPS cells. *Differentiation; research in biological diversity*. 2014;87(5):193-9.
67. Li Y, Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y, et al. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(24):9951-6.
68. Chandrakanthan V, Yeola A, Kwan JC, Oliver RA, Qiao Q, Kang YC, et al. PDGF-AB and 5-Azacytidine induce conversion of somatic cells into tissue-regenerative multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(16):E2306-15.
69. Chang FP, Cho CH, Shen CR, Chien CY, Ting LW, Lee HS, et al. PDGF Facilitates Direct Lineage Reprogramming of Hepatocytes to Functional beta-Like Cells Induced by Pdx1 and Ngn3. *Cell transplantation*. 2016;25(10):1893-909.
70. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):51-63.