

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in:

Fisiopatologia e Genetica delle Malattie Osteometaboliche

XXII Ciclo

STUDI PRELIMINARI SULLE POTENZIALITÀ DI  
CELLULE STAMINALI DI PLACENTA UMANA AI  
FINI DELLA RIGENERAZIONE OSSEA DEL CAVO  
ORALE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Roberto Delsignore

Tutor:

Chiar.mo Prof. Giovanni Passeri

Dottorando: Dr. Simone Lumetti

## Indice

Introduzione.....	4
•Ingegneria tissutale.....	6
•Cellule staminali.....	7
•Potenza cellulare.....	8
•Cellule staminali embrionali e adulte.....	9
•Cellule staminali mesenchimali.....	11
•Placenta.....	13
•Placentazione.....	15
•Cellule mesenchimali placentari.....	17
•Tessuto osseo.....	21
•Cellule del tessuto osseo.....	27
•Interazioni funzionali tra cellule del tessuto osseo.....	31
•Organizzazione architettrale del tessuto osseo.....	32
•L'osteogenesi.....	33
•Fattori che influenzano l'osteogenesi.....	34
•Le ossa mascellari.....	39
•Cenni sulla ricostruzione dei volumi ossei delle ossa mascellari a fini implantari.....	46
Ipotesi sperimentale.....	50
Materiali e metodi.....	52
•Isolamento e cultura in vitro di cellule staminali mesenchimali.....	52
•Separazione immunomagnetica (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS).....	53
•Colture cellulari.....	54
•Immunocitochimica.....	59

•Colorazioni istochimiche.....	60
•Estrazione RNA.....	61
•Quantificazione spettrofotometrica.....	62
•Retrotrascrizione.....	63
•PCR Real Time.....	64
•Disegno dello studio in vivo.....	68
•Impianto del scaffold nel modello animale.....	71
•Analisi istologiche.....	75
<b>Risultati.....</b>	<b>79</b>
•Risultati dello studio in vitro.....	79
•Immunocitochimica e colorazioni.....	79
•Analisi dell'espressione genica.....	84
•Risultati dello studio in vivo.....	90
•Analisi istologica e Immunocitochimica.....	90
<b>Discussione.....</b>	<b>97</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>105</b>

## Introduzione

L'avvento dell'implantologia osteointegrata ha, di fatto, rivoluzionato drasticamente la pratica clinica odontoiatrica negli ultimi 30 anni per quanto riguarda la riabilitazione di edentule parziali o complete. La scoperta casuale del fenomeno dell'osteointegrazione del titanio da parte di Branemark<sup>1, 2</sup> ha aperto una nuova via per la sostituzione degli elementi dentari mancanti o non mantenibili riducendo la necessità di dover utilizzare denti contigui alla sella edentula come pilastri di ponti fissi o di costringere i pazienti all'uso di protesi complete rimovibili, spesso poco stabili.

E' intuitivo come l'uso degli impianti dentali di tipo endo-osseo dipenda da quantità e dalla qualità dell'osso mascellare e mandibolare al fine di procedere ad un inserimento implantare protesicamente guidato. Gli impianti necessitano infatti di un volume osseo adeguato laddove verranno posizionati gli impianti in base alla pianificazione protesica.

Il deficit dei volumi ossei dovuti principalmente al fisiologico riassorbimento della cresta alveolare provocato dalla perdita degli elementi dentari, da resezioni chirurgiche (come nel caso dell'asportazione di lesioni neoplastiche) o da traumi, rappresenta frequentemente un notevole ostacolo ad un inserimento corretto degli impianti dentali se non addirittura una controindicazione assoluta alla terapia implantoprotesica.

Nel panorama clinico sono presenti numerose indicazioni e tecniche diverse, oltre che vari biomateriali e agenti definiti "biologicamente attivi" per l'aumento dei volumi ossei ai fini implantari.

Allo stato attuale delle conoscenze e dei risultati clinici, nessuna tecnica sembra assicurare risultati migliori dell'innesto di osso autologo; tuttavia, non è possibile prescindere dall'aumento di invasività dell'intervento chirurgico né dalla limitata disponibilità dei volumi d'innesto ottenibili.

La possibilità di riparare o sostituire tessuto osseo perso ricreandone l'architettura *in vitro* per poi impiantarlo rappresenta un'idea affascinante.

La rapida espansione della ricerca nel campo dell'ingegneria tissutale ci ha portato a formulare ipotesi sull'utilizzo di cellule staminali di placenta umana differenziate in direzione osteoblastica e sul comportamento di tali cellule all'interno dei processi di rigenerazione ossea in un modello animale.

## Ingegneria tissutale

Il rapido progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare avvenuto negli ultimi anni grazie all'evoluzione tecnologica, ha permesso la nascita di una nuova branca biomedica nota come "tissue engineering". Questa nuova scienza ha come obiettivo quello di coltivare e ricostruire *in vitro* organi e tessuti, con il fine di spostare i limiti delle terapie convenzionali verso nuovi target terapeutici.

Grande interesse in questo campo è suscitato dalle cellule staminali, nelle quali vengono riposte grandi speranze dalla medicina rigenerativa.

Le staminali sono cellule indifferenziate presenti in tutti gli organismi multicellulari, dotate della capacità di compiere innumerevoli cicli replicativi e di dare origine a diverse progenie specializzate; hanno il compito di aumentare la massa tissutale durante la crescita di un organismo e di fornire cellule mature in sostituzione di cellule perse per danno o senescenza. Esistono diversi tipi di cellule staminali, classificate in base alla loro potenza, ovvero la capacità di originare cellule differenziate:

- cellule staminali totipotenti, in grado di svilupparsi in un intero organismo e persino in tessuti extra-embryonali
- cellule staminali pluripotenti, in grado di differenziarsi in tutti i tipi di cellule presenti in un individuo adulto eccetto che in cellule che compongono tessuti extra-embryonali
- cellule staminali multipotenti, in grado di differenziarsi solo in alcuni tipi di cellule che appartengono allo stesso foglietto embrionale.

Oggi siamo a conoscenza del fatto che sono presenti cellule staminali in quasi tutti i tessuti del corpo umano.

Il midollo osseo rappresenta attualmente la più importante sorgente di cellule staminali mesenchimali adulte utilizzate a fini terapeutici e di ricerca; è necessario però considerare che il loro prelievo dall'individuo è invasivo e che il numero delle cellule a disposizione è inversamente proporzionale all'età del soggetto donatore.

Al contrario, cellule staminali presenti nella placenta umana sono reperibili senza alcun prelievo, in quanto disponibili in tessuti che vengono eliminati dopo la nascita del neonato; l'uso della placenta come fonte di cellule staminali inoltre riduce notevolmente la presenza di questioni di tipo etico.

Basandoci su esperimenti preliminari, abbiamo formulato l'ipotesi che la composizione chimica e le proprietà meccaniche di una matrice siano in grado di condizionare direttamente la proliferazione e il differenziamento di cellule staminali di derivazione placentale in varie linee cellulari. Attraverso la scelta di una matrice adeguata e la somministrazione di appropriati osteo-induttori (quali vitamina D3 e desametasone) è possibile condurre le cellule a differenziarsi in osteoblasti sintetizzanti matrice ossea, I quali partecipano direttamente ai processi riparativi del tessuto osseo nei quali vengono innestate.

### *Le cellule staminali*

Una cellula staminale è una cellula indifferenziata in grado di dividersi dando origine contemporaneamente a una cellula staminale (uguale alla cellula madre) e ad una cellula precursore di una progenie cellulare che darà a propria volta origine a cellule terminalmente differenziate (mature). Le cellule staminali sono contraddistinte da multipotenza, ovvero la capacità di dare origine a uno o più fenotipi cellulari durante il processo di differenziamento e da autorinnovamento, la capacità di compiere innumerevoli cicli replicativi mantenendo il medesimo stato differenziativo. Le cellule staminali mantengono l'equilibrio tra le popolazioni delle cellule staminali stesse e le cellule differenziate attraverso le divisione cellulare asimmetrica e la divisione cellulare simmetrica. Le cellule staminali si dividono asimmetricamente dando luogo, non a due cellule identiche tra loro e alla madre ma ad una uguale alla cellula generatrice e ad una seconda cellula detta "di transito"; dopo la divisione, la cellula staminale figlia sostituisce la madre mentre la cellula di transito muove verso il luogo in cui è necessario il ricambio di cellule mature. Durante il percorso di trasferimento la cellula compie ulteriori divisioni.

I meccanismi che regolano questo tipo di divisione sono sia intrinseci (genetici) che estrinseci (ambiente extracellulare).

E' intuitivo comprendere che questo tipo di divisione cellulare non permetta l'aumentare del numero delle cellule staminali: questa capacità è invece attribuibile alla divisione simmetrica, nella quale una cellula staminale si divide in una coppia di copie esatte della cellula madre.

### *Potenza cellulare*

Come accennato in precedenza, esistono diversi tipi di cellule staminali, classificati in base al loro potenziale differenziativo: cellule totipotenti, pluripotenti, multipotenti e unipotenti.

Le cellule totipotenti sono cellule potenzialmente in grado di svilupparsi in individui completi: l'ovocita fecondato e le cellule nelle quali si divide sono tutte in grado di svilupparsi in feto. Al quarto giorno dalla fecondazione, le cellule danno luogo alla blastocisti, costituita da uno strato di cellule esterno, che darà origine ai tessuti degli annessi fetali, e dall'inner cell mass, un gruppo di cellule che si svilupperà nei tessuti del corpo del feto. Questa massa cellulare è costituita da cellule totipotenti, in quanto esse non sono più in grado di generare tessuti extraembrionali.

Negli organi adulti si trovano invece cellule staminali multipotenti (quando sono in grado di diversificarsi in più tipi di cellule) e unipotenti (in grado di produrre un solo tipo di cellula matura).



## *Cellule staminali embrionali e adulte*

Le cellule staminali embrionali (ES) sono state isolate per la prima volta da un topo nel 1981<sup>3, 4</sup> e si ottengono dalla inner cell mass; sono caratterizzate dalla capacità di proliferare *in vitro* in maniera illimitata e senza senescenza mantenendo lo stato indifferenziato in presenza del fattore di inibizione della leucemia (LIF) o se distribuite su feeder layers di fibroblasti embrionali di topi mitoticamente inattivati (MEFs)<sup>5</sup>. Nel caso che queste condizioni non siano presenti, le cellule ES si differenziano spontaneamente in aggregati di cellule staminali multicellulari (ECSAs)<sup>6</sup>, dai quali sembra derivare lo spontaneo differenziamento in ectoderma, mesoderma ed endoderma<sup>7, 8</sup>.

Il cariotipo delle ES appare decisamente stabile e l'attività telomerasica di tali cellule è elevata; queste proprietà si mantengono *in vitro* per periodi molto lunghi e sono un prezioso aiuto per la comprensione dei meccanismi che regolano la senescenza cellulare e il rinnovamento delle cellule staminali.

Dal punto di vista etico, il prelievo di cellule staminali ha sollevato notevoli controversie: l'ottenimento di una linea cellulare di ES comporta la distruzione di una blastocisti, con conseguente annullamento delle possibilità di sviluppo dell'embrione. Tale atto può venir considerato da alcuni come l'uccisione di un potenziale essere umano. La diversità di opinione sulla opportunità di tali pratiche ai fini della ricerca scientifica, ha portato alla necessità di trovare altre fonti di cellule staminali nell'organismo adulto.

Come accennato in precedenza, le cellule staminali sono presenti in moltissimi tessuti, inclusi la pelle<sup>9, 10</sup>, il sistema nervoso centrale<sup>10</sup>, il muscolo scheletrico<sup>11</sup>, il cuore<sup>12</sup>, il midollo osseo<sup>13</sup>, il fegato<sup>14</sup>, il pancreas, il polmone, la prostata, le ghiandole mammarie, il rene<sup>15</sup>, il follicolo pilifero<sup>16</sup>, l'intestino<sup>17</sup> e la polpa dentaria<sup>18</sup>.

Le cellule staminali sono caratterizzate da una forte capacità replicativa e sono in grado di dare luogo a molteplici cellule mature specializzate, attraverso la generazione di cellule intermedie con capacità di auto-replicazione e differenziazione più limitate, chiamate progenitori.

L'identificazione e distinzione delle cellule staminali avviene attraverso l'identificazione di combinazioni di antigeni di membrana.

KIT è un proto-oncogene localizzato a livello del locus W del cromosoma 4, codificante per un recettore tirosino-chinasico individuato sulla superficie di cellule staminali germinali<sup>19</sup>, cardiache<sup>20, 21</sup>, ematopoietiche<sup>22</sup> e in alcuni tipi di cellule staminali neurali<sup>23</sup>.

Sca-1 (Stem Cell Antigen-1) è stata la primo recettore di superficie individuato su HSC<sup>24, 25</sup>; è inoltre presente su cellule cardiache<sup>26</sup> e muscolari<sup>27</sup> e si pensa che sia legato alla differenziazione e proliferazione di tali cellule.

Le glicoproteine CD34 e CD38 sono marcatori di superficie codificati dagli omonimi geni e coinvolti nei fenomeni di adesione cellulare; sono presenti su cellule staminali presenti in diversi stati di attivazione: l'espressione CD34+CD38-, ad esempio, sembra identificare HSC in divisione, mentre CD34-CD38+ sembra caratterizzare le cellule staminali in stato di quiescenza.

Le cellule staminali vengono isolate in base alla combinazione di antigeni di membrana che esprimono: le cellule staminali ematopoietiche HSC, ad esempio, sono caratterizzate da un fenotipo CD34-CD45+kit+Sca-1+Lin-.

La presenza del marker CD45, infatti, permette di discriminare le HSC dalle cellule staminali mesenchimali, un'altra popolazione staminale presente all'interno del midollo osseo. Le HSC costituiscono un modello per le cellule staminali adulte in quanto sono le più conosciute e studiate, anche dal punto di vista del loro potenziale differenziativo: esse sono dotate di elevate capacità autorigenerative, proliferative e differenziative, capacità che vengono progressivamente perse nelle divisioni cellulari successive che, dalle cellule staminali, generano progenitori pluripotenti.

Essi, a loro volta, possono intraprendere cammini differenziativi diversi, generando precursori sempre più differenziati e indirizzati verso una specifica filiera cellulare.

Esistono diversi tipi di cellule staminali adulte come riportato nella tabella 1 sotto riportata:

Cellule staminali adulte	Fonti	Cellule prodotte
Ematopoietiche	Midollo osseo	Cellule del sangue, epatiche e muscolari
Neuronali	Cervello	Neuroni, oligodendrociti, astrociti
Epiteliali	Epidermide	Tutte le cellule degli strati epidermici
Mesenchimali	Tessuti connettivali	Cellule ossee, cartilaginee, muscolari, adipose

Tab. 1

Studi recenti hanno dimostrato come le cellule staminali adulte presentino in realtà un elevato grado di plasticità, in quanto capaci di "cambiare il loro destino" e generare cellule mature diverse da quelle del tessuto di origine.

La capacità delle cellule staminali adulte di scegliere se auto-replicarsi o differenziare è critica per il mantenimento dell'omeostasi dei tessuti. Un ruolo determinante nel mantenere bilanciati i fenomeni di self-renewal e differenziazione è ricoperto dalla nicchia delle cellule staminali, ovvero il micro-ambiente in cui esse si dividono e decidono il destino delle cellule figlie.

### *Le cellule staminali mesenchimali*

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono cellule multipotenti che derivano da tessuti umani quali lo stroma del midollo osseo e tessuti connettivi. Queste cellule hanno la capacità di differenziarsi in diverse linee cellulari quali, osteoblasti, adipociti, condrociti, fibroblasti e in altri tessuti di origine mesenchimale come per esempio periostio, membrane sinoviali, muscoli, sangue (Fig.1).

Dal punto di vista della caratterizzazione antigenica della superficie cellulare, le cellule staminali mesenchimali presentano le molecole di adesione CD133, CD90, CD44, CD73, CD105 e CD166, mentre non presentano i marcatori CD34, CD38, CD45 e CD14.

Le MSC sono attualmente considerate uno possibile strumento di ingegneria tissutale per quanto riguarda la rigenerazione di tessuti connettivi e questo le ha poste al centro di diversi studi pre-clinici<sup>28, 29</sup> con l'obiettivo di valutare il loro potenziale effetto sulla rigenerazione di difetti ossei e cartilaginei. Attualmente il midollo osseo rappresenta la principale risorsa di cellule staminali mesenchimali, anche se è stato osservato che il numero delle suddette diminuisce drasticamente all'aumentare dell'età del soggetto<sup>30</sup>, senza dimenticare la caratteristica invasiva del prelievo. Questo ha fatto spostare l'attenzione verso fonti alternative di cellule staminali mesenchimali da utilizzare in caso di trapianti autologhi ed allogenei, e tra queste hanno assunto ultimamente un ruolo centrale gli annessi embrionali.

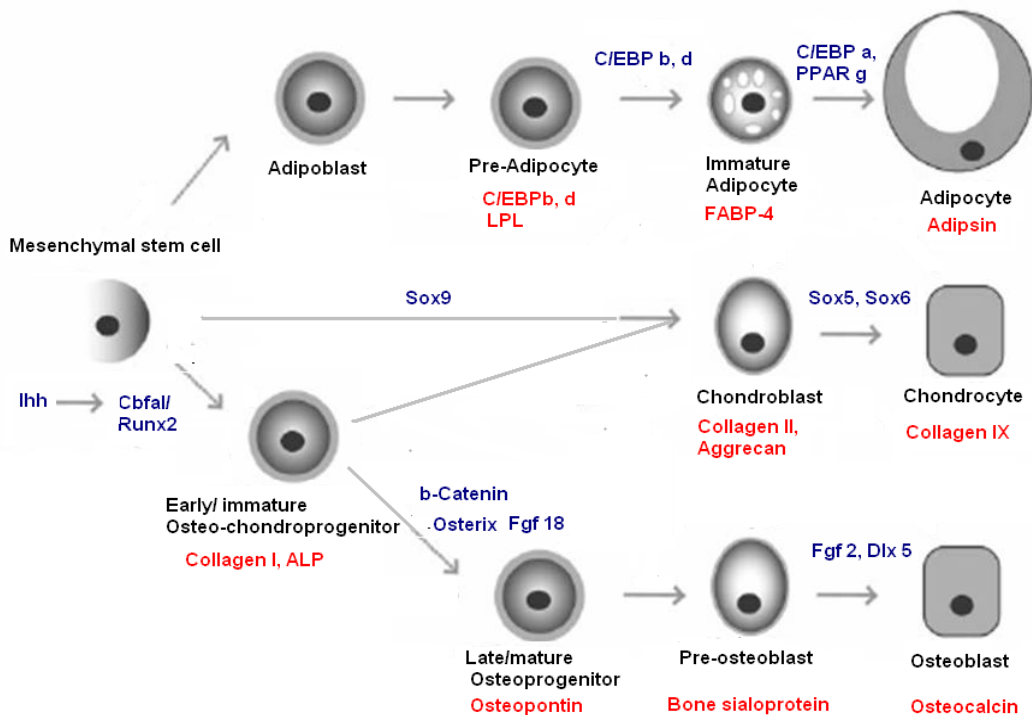


Fig.1 Schema di differenziamento di una cellula staminale mesenchimale.

## Placenta

La placenta è l'organo deputato agli scambi metabolici tra la madre e il feto. Presenta una forma discoidale con diametro di 15-20 cm e uno spessore di 2-3 cm. È composta da un piatto corionico dal quale si estendono i villi, in stretto contatto con la decidua uterina durante la gravidanza, e da membrane fetali (amnios e corion) che racchiudono il feto. Il piatto corionico multistratificato è rivolto verso la cavità amniotica e da questo si estendono i villi corionici composti da un nucleo stromale centrale contenente un letto di capillari fetali e da fibroblasti e macrofagi conosciuti come cellule di Hofbauer. Questi presentano uno strato esterno di sinciziotrofoblasto a diretto contatto con il sangue materno.

Una membrana basale separa il nucleo stromale dal sinciziotrofoblasto. Tra il sinciziotrofoblasto e la membrana basale si trovano delle cellule del citotrofoblasto singole o aggregate (altresì chiamate cellule di Langhans). La maggior parte dei villi terminano in uno spazio intervillico e sono bagnati dal sangue materno, mentre altri invadono la decidua basale, porzione materna della placenta che permette l'ancoramento di questa all'endometrio.

L'invasione della decidua tramite l'ancoraggio dei villi porta alla formazione di setti placentali che dividono la regione trofoblastica della placenta in cotiledoni irregolari (Fig. 2)

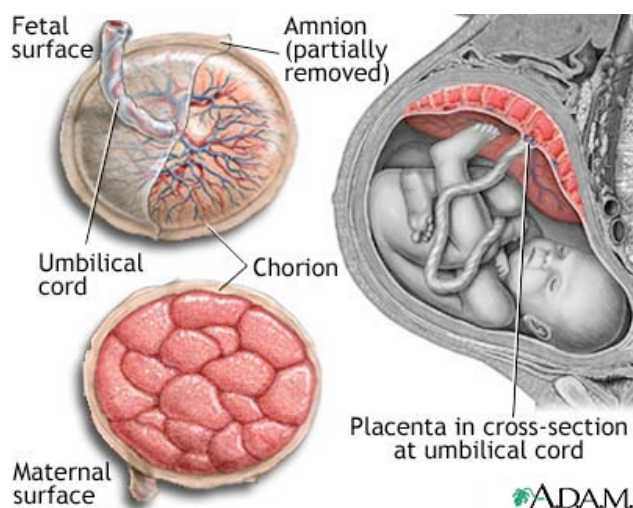


Fig. 2 Porzione materna e fetale della placenta.

Le membrane amniotiche e corioniche si estendono dai margini del piatto corionico fino ad includere il feto nella cavità amniotica.

L'amnios è una sottile membrana avascolare composta da un singolo, ininterrotto strato di cellule cuboidali e da epitelio colonnare (detto epitelio amniotico, AE) bagnato dal fluido amniotico e contiguo attraverso il cordone ombelicale alla pelle del feto.

L'AE è attaccato ad una diversa membrana basale connessa alla membrana amniotica (AM), uno strato compatto acellulare composto da collagene I, III e fibronectina.

Più in profondità nell'AM si ritrova una rete di cellule mesenchimali e di macrofagi. Uno strato spugnoso di fibre sparse di collagene separa l'AM dal mesoderma corionico (CM) i quali hanno una composizione simile (Fig. 3).

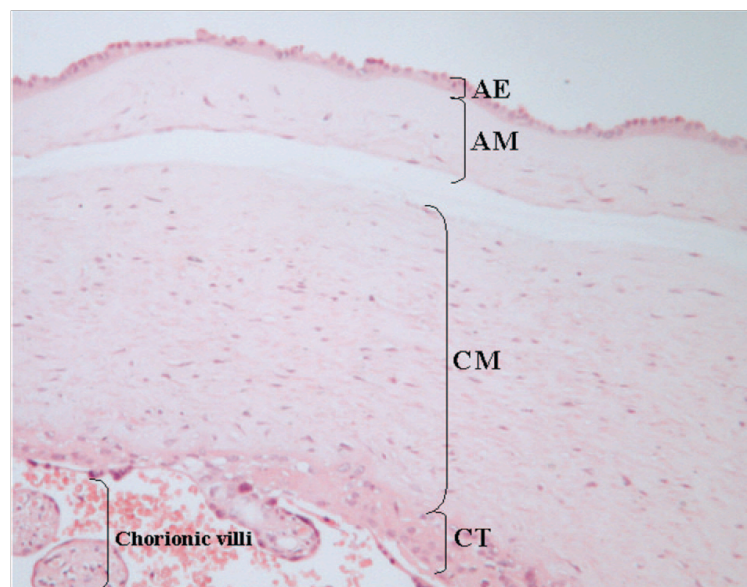


Fig. 3 Istologia della placenta: sezione trasversale della porzione fetale .

Durante la gravidanza la maggior parte del corion è in contatto con la decidua capsulare e i vasi si atrofizzano generando una morbida regione del corion conosciuta come “corion leave” che è caratterizzata da una parte mesodermica e da una parte corion trofoblastica.

La regione del corion in contatto con la regione basale e dalla quale i villi corionici si protendono verso l'endometrio è conosciuta come corion frondosum. Nella placenta una lamina basale separa il CM dalle cellule extravilluose trofoblastiche che rappresentano l'unico residuo dei precedenti villi del corion frondosum<sup>31, 32</sup>.

### *Placentazione*

Il processo che porta alla formazione della placenta viene indicato con il termine placentazione. Esso procede attraverso due stadi importanti: l'attacco dell'embrione alla parete uterina (impianto), e la creazione delle connessioni vascolari necessarie per permettere gli scambi di gas e di nutrimenti tra la circolazione materna e quella fetale e l'eliminazione di cataboliti fetali nel sangue materno (circolazione placentare). La fecondazione avviene nelle tube di Falloppio e l'ovulo fecondato subisce un processo di segmentazione, formando una massa di 12-16 cellule detta morula. Quest'ultima presenta uno strato protettivo che non consente l'adesione, chiamato zona pellucida<sup>33</sup>.

Circa quattro giorni dopo la fecondazione, tra le cellule situate in posizione centrale nella morula appaiono degli spazi in cui fluisce del liquido proveniente dalla cavità uterina, separando le cellule in due gruppi:

- 1) uno strato di cellule esterne, il trofoblasto (dal greco trophe – nutrizione) che darà origine ad una parte della placenta;
- 2) una massa di cellule centrali, detta massa cellulare interna, che formerà l'embrione.

Circa 6 giorni dopo la fecondazione, la morula, maturata a blastocisti, aderisce all'epitelio dell'endometrio, normalmente a livello del polo embrionale (zona prossima alla massa cellulare interna). A questo livello, infatti, avviene il differenziamento del trofoblasto in:

- Citotrofoblasto interno;
- Sinciziotrofoblasto esterno, formato da una massa di cellule multinucleate.

Microvilli presenti sulla superficie apicale del sinciziotrofoblasto si interdigitano con microprotrusioni poste sull'epitelio uterino chiamate pinopodi. In tale processo, che prende il nome di apposizione, risulta fondamentale il sincronismo tra la recettività uterina e lo stadio di maturazione embrionale.

L'adesione stabile è la fase che segue l'apposizione ed è caratterizzata da un aumento delle interazioni fisiche tra la blastocisti e l'epitelio uterino. La massa sinciziale penetra, con processi digitiformi, tra le cellule epiteliali e si espande rapidamente nello stroma sottostante. Ma questa espansione è il risultato del differenziamento delle cellule dello strato citotrofoblastico, in quanto non sono mai state osservate mitosi a livello del sinciziotrofoblasto<sup>34</sup>.

Nove giorni dopo la fecondazione nel sincizio appaiono lacune e vacuoli che si dilatano rapidamente e si fondono tra loro. La formazione della circolazione utero-placentare avviene quando i capillari venosi materni vengono erosi dal sincizio, permettendo al sangue di fluire all'interno del sistema delle lacune. A circa 12 giorni dal concepimento la blastocisti è completamente immersa nel tessuto stromale dell'utero e l'epitelio endometriale ha totalmente ricoperto il sito d'impianto.

Dopo questa fase iniziale di impianto, il trofoblasto si differenzia in trofoblasto villosa ed extravillosa. È utile considerare questi due pathway differenziativi separatamente, in quanto le funzioni e le cellule materne con cui questi vengono a contatto sono diverse. Il trofoblasto villosa ricopre tutti i villi corionici della placenta definitiva ed è implicato nel trasporto di ossigeno e nutrienti dalla madre al feto. I villi sono immersi nel sangue materno e quindi il loro unico contatto è con le cellule del circolo periferico della madre. Diversamente, il trofoblasto extravillosa comprende tutte le sottopopolazioni di trofoblasti invasivi che migrano in profondità all'interno della mucosa uterina, fino al primo terzo del miometrio incontrando diversi tipi di cellule materne. I meccanismi genetici e molecolari alla base dello sviluppo placentare sembrano avere influenza sulla pluripotenza delle cellule della placenta. È emerso recentemente che la maggior parte dei geni essenziali nello sviluppo placentare sono anche implicati nello sviluppo di altri organi<sup>35</sup>.



## *Cellule mesenchimali placentari*

Le membrane fetali della placenta umana contengono quattro principali tipi di cellule che possono essere isolate: cellule umane amniotiche epiteliali (hAEC), cellule umane mesenchimali stromali amniotiche (hAMSC), cellule umane mesenchimali stromali corioniche (hCMSC) e le cellule umane trofoblastiche corioniche (hCTC).

Secondo il criterio recentemente proposto da Dominici et al.<sup>36</sup> per le cellule mesenchimali stromali derivate da midollo osseo, le cellule mesenchimali isolate dalle membrane fetali sono chiamate cellule mesenchimali stromali (hAMSC e hCMSC).

I criteri per definire tali cellule sono i seguenti:

- Adesione alla plastica;
- Formazione di unità formanti colonie di fibroblasti;
- Espressione di un pattern antigenico di superficie specifico;
- Potenziale differenziativo verso una o più linee tra cui, quelle osteogenica, adipogenica, condrogenica e vascolare/endoteliale;
- Origine fetale.

Le cellule isolate sono state caratterizzate al citofluorimetro.

La molecola CD34 è una glicoproteina integrale di membrana monomerica di tipo I, di peso molecolare apparente pari a 105-120 kDa. La sequenza di 373 aa della proteina (40 kDa) è pesantemente glicosilata con un massimo di 9 complessi tipo N-glicani e numerosi O-glicani pesantemente sialilati. Questa caratteristica glicosilazione è tipica della famiglia delle sialomucine, che comprende la leucosialina e il CD34. Una caratteristica chiave nella biochimica del CD34 è il polimorfismo della glicosilazione, come dimostrato dalla variabilità degli epitopi nelle analisi immunologiche. Il gene codificante per l'antigene CD34 è localizzato sulla regione cromosomica 1q32, in una regione contenente un gruppo di geni che codificano per le molecole di adesione.

La struttura tipo mucina del CD34 suggerisce un ruolo nell'adesione cellulare, forse nell'adesione dei progenitori e delle cellule staminali alle cellule stromali.

Nel nostro studio sono state mantenute in coltura ed espanse le cellule CD34-.

Una volta raggiunta la confluenza, una parte delle cellule è stata nuovamente analizzata tramite citofluorimetria a flusso.

Tra i markers a cui le cellule mesenchimali di placenta sono risultate positive esaminiamo i più rilevanti:

### CD90

L'antigene CD90 umano (conosciuto anche come Thy-1) è il più piccolo membro (18 kDa) della superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF) della membrana dei linfociti T, scoperta per la prima volta nei topi e nei ratti.

Il gene Thy-1 nel topo è stato mappato sul cromosoma 9 e comprende due alleli, Thy-1a e Thy-1b che codificano rispettivamente per le due glicoproteine Thy-1.1 e Thy-1.2, le quali differiscono soltanto per un aminoacido in posizione 89, arginina in Thy-1.1 e glutamina in Thy-1.2.

Il locus genetico umano è stato mappato sul cromosoma 11.

Le glicoproteine Thy-1 sono importanti costituenti dei timociti e dei neuroni e probabilmente sono coinvolti nelle interazioni fra cellule. Ancora oggi Thy-1 è uno dei marcatori di membrana più frequentemente utilizzati per l'identificazione, oltre che dei timociti immaturi, anche di diversi tipi di cellule staminali adulte tra cui quelle mesenchimali.

L'espressione di Thy-1 è regolata da diverse molecole fra cui: timopoietine, timosine, Nerve growth factor, TNF, calcio, diacilglicerolo.

## CD73

(Ecto-50-nucleotidase) è un enzima di 70 kDa espresso sulla superficie cellulare di alcuni tipi di cellule, come linfociti<sup>37</sup>, cellule endoteliali<sup>38</sup> e cellule epiteliali<sup>39</sup>. Anch'essa è una proteina GPI-ancorata ed è coinvolta in una serie di risposte fisiologiche, prima fra tutte la risposta infiammatoria. Durante il processo di infiammazione e i primi stadi della risposta immunitaria primaria, l'ATP viene rilasciato dalle cellule target danneggiate nell'ambiente extracellulare e viene convertito in AMP da CD39 (ecto-apyrase)<sup>40</sup>. Questo AMP viene trasformato in una adenosina extracellulare, dall'attività catalitica di CD73. L'adenosina extracellulare esplica degli effetti immunosoppressivi una volta legata a specifici recettori accoppiati a proteine G. Recentemente, è stato anche visto che l'attività dell'adenosina extracellulare mediata da CD73 influisce molto sulla attività immunosoppressiva delle cellule T<sup>41, 42</sup>. L'enzima è usato come un marker della differenziazione linfocitaria ma ha dato positività anche per le cellule MSC, assieme ad altri marcatori come CD105.

## CD105

La CD105 o Endogлина è una glicoproteina transmembrana di 180 kDa costitutivamente fosforilata<sup>43, 44</sup>.

Risulta essere espresso maggiormente su cellule endoteliali<sup>45, 46</sup> dove il suo promotore sembra essere fortemente e selettivamente attivo<sup>47, 48</sup>.

Comunque CD105 è anche espresso su cellule non endoteliali di differenti istotipi<sup>49, 50</sup> come le cellule mesenchimali.

Questa glicoproteina è un componente del complesso recettoriale per TGF- $\beta^{51-53}$ , una citochina pleiotropica coinvolta nella proliferazione, differenziamento e migrazione cellulare<sup>54</sup>.

CD105 lega molti componenti della superfamiglia dei TGF- $\beta^{51-53}$  tra cui il TGF- $\beta 1$  che ne riduce i livelli di fosforilazione<sup>44</sup> con conseguente modulazione dell'effetto di TGF- $\beta 1$ <sup>52-56</sup>.

Recentemente è stato scoperto che i livelli di CD105 regolano l'espressione di differenti componenti della matrice extracellulare come la fibronectina, il collagene, PAI-1 e lumicano<sup>57-59</sup> e questo suggerisce un ruolo cruciale di CD105 nella trasmigrazione cellulare<sup>59</sup>.

Le cellule mesenchimali placentari risultano essere negative per i makers ematopoietici (CD34 e CD45) e monocitari (CD14)<sup>32, 60-66</sup>, mentre è stata riportata l'espressione superficiale di SSEA-3 e SSEA-4 e dell'RNA per OCT4.

hAMSC e hCMSC esprimono inoltre bassi livelli di HLA A, B, C e l'HLA-DR<sup>61, 62</sup> risulta essere assente e ciò costituisce uno stato immunoprivilegiato.

## Tessuto osseo

Il tessuto osseo fa parte, assieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati con funzione di sostegno. L'appartenenza del tessuto osseo ai tessuti connettivi è giustificata sia per la sua origine dal mesenchima, il tessuto embrionale che funge da matrice per tutti i tessuti connettivi, sia per la sua costituzione, essendo formato da cellule e da sostanza intercellulare composta da fibre di collagene e sostanza fondamentale anista. La peculiarità del tessuto osseo è quella di essere mineralizzato: infatti la sostanza intercellulare è per la maggior parte impregnata di cristalli minerali, in prevalenza fosfato di calcio. La presenza di minerali, come pure l'abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferiscono a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche di durezza e di resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione. In virtù di queste proprietà, il tessuto osseo costituisce un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro, che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo. Inoltre, dato il notevole contenuto in sali di calcio, il tessuto osseo rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo. La deposizione del calcio nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici di questo ione.

Da un punto di vista macroscopico, si distinguono due varietà di osso: l'osso spugnoso e l'osso compatto.

L'osso spugnoso lo si ritrova principalmente a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe: esso ha questo nome in quanto appare conformato come una spugna, con travate ossee, dette trabecole, variamente orientate e intersecate tra loro e delimitanti cavità, dette cavità midollari, che *in vivo* sono ripiene di midollo osseo ematopoietico.

L'osso compatto lo si ritrova a formare la porzione più superficiale delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle ossa lunghe, nonché a costituire la diafisi di queste ultime. Esso è privo di cavità macroscopicamente evidenti.

Tuttavia entrambe le varietà macroscopiche di osso si possono ricondurre, salvo rare eccezioni, ad un unico modello istologico di tessuto osseo. Essendo un tessuto connettivo, il tessuto osseo contiene una quota rilevante di sostanza intercellulare organica, composta da fibre connettivali e da sostanza fondamentale anista.

Alla componente organica si aggiunge inoltre la componente minerale. Le fibre connettivali sono rappresentate per la quasi totalità da fibre collagene, composte da collagene di tipo I come nella maggior parte dei tessuti connettivi. Rispetto a questi, il collagene dell'osso possiede un maggior numero di legami crociati che tengono unite le singole molecole di tropocollagene. L'abbondante contenuto in collagene è il principale responsabile della marcata acidofilia della sostanza intercellulare dell'osso, come evidenziato nei preparati demineralizzati allestiti per la microscopia ottica.

Quando esaminate al microscopio elettronico nei preparati demineralizzati, le microfibrille collagene presentano la tipica striatura trasversale con periodo di 70 nm. Esse si aggregano a formare fibre collagene di spessore rilevante (5-10  $\mu\text{m}$ ) soltanto nel cosiddetto tessuto osseo fibroso, mentre nell'altra varietà di tessuto osseo, cosiddetto lamellare, le microfibrille collagene (spesse circa 60 nm) non tendono a riunirsi in fibrille ma formano un feltro omogeneo. Dallo strato di tessuto connettivo che avvolge esternamente l'osso, detto periostio, si dipartono spessi fasci di fibre collagene che penetrano all'interno del tessuto osseo corticale e si perdono nella sostanza intercellulare dell'osso: questi fasci costituiscono le fibre perforanti di Sharpey, che ancorano il periostio alla superficie dell'osso. Le fibre elastiche sono virtualmente assenti nel tessuto osseo, ad eccezione di una piccola quota di queste nelle fibre perforanti di Sharpey. Le fibre reticolari sono localizzate a livello della membrana basale che circonda i vasi sanguigni intraossei, ma non sono presenti nella sostanza intercellulare vera e propria dell'osso.

La sostanza fondamentale anista ha una composizione peculiare e in buona misura diversa da quella degli altri tessuti connettivi. Di essa fanno parte varie classi di macromolecole: Proteoglicani, composti da glicosaminoglicani acidi, solitamente solforati, uniti assieme da brevi catene proteiche.

Quelli meglio conosciuti sono:

- Proteoglicano di tipo I (PG-I), detto anche biglicano in quanto costituito da due molecole di condroitinsolfato unite ad una estremità da un polipeptide ricco di leucina: lo si ritrova sia nella sostanza intercellulare mineralizzata che in quella non mineralizzata adiacente alle cellule ossee e ai loro prolungamenti, il cosiddetto tessuto osteoide;
- Proteoglicano di tipo II (PG-II), detto anche decorina in quanto tende ad associarsi alle microfibrille collagene come a decorarle. E' formato da una parte proteica analoga a quella del PG-I unita ad una sola molecola di condroitinsolfato.

Lo si ritrova nella sostanza intercellulare mineralizzata ma non nel tessuto osteoide, per cui si ipotizza che abbia un ruolo nell'orientare la deposizione dei cristalli minerali lungo le microfibrille collagene.

- Glicoproteine, di solito fosforilate o solfatate, includono molecole diverse alcune delle quali sono ritenute giocare un ruolo fondamentale nel controllo dei processi di mineralizzazione. Tra queste si annoverano:

- Osteonectina, la glicoproteina più abbondante. E' dotata di alta affinità per il calcio, sia come ione libero che associato in complessi di tipo cristallino. Si ritiene che essa agisca come elemento di nucleazione dei cristalli minerali, in quanto ritenuta capace di concentrare il calcio nelle sue adiacenze creando così le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio.

- Fosfatasi alcalina, un enzima capace di idrolizzare gruppi fosfato legati a substrati organici (quali ad es. il piridossal-5-fosfato) attivo in ambiente alcalino (pH 8-10).

Alcuni studiosi ritengono che essa potrebbe giocare un ruolo nei processi di mineralizzazione, mettendo a disposizione gli ioni fosfato per la formazione dei cristalli minerali. Secondo altri, sarebbe invece coinvolta nella sintesi della matrice organica dell'osso.

- Fibronectina, una molecola di adesione localizzata prevalentemente nella matrice pericellulare e caratterizzata da una porzione capace di legarsi al collagene.

Si ritiene che la fibronectina sia coinvolta nei processi di migrazione, adesione alla matrice e organizzazione delle cellule dell'osso. Sialoproteine, o BSP (dall'acronimo inglese bone sialo-proteins, sialoproteine dell'osso), glicoproteine peculiari contenenti residui glicidici di acido sialico. Queste proteine posseggono una sequenza aminoacidica particolare Arg-Gly-Asp (sequenza RGD) che in esperimenti *in vitro* è stata vista mediare l'adesione al substrato di svariati tipi cellulari, incluse le cellule dell'osso. Si ritiene pertanto che le sialoproteine ossee abbiano la funzione fisiologica di consentire l'adesione delle cellule alla matrice ossea. Se ne conoscono più tipi: la osteopontina (o BSP-I), la BSP-II e la glicoproteina acida dell'osso (o BAG-75). L'osteopontina (SSP1) è una fosfoglicoproteina di circa 60 KDa, costituita da 314 aminoacidi<sup>67</sup>.

Come già accennato, essa è stata isolata dalla matrice ossea extracellulare<sup>68</sup>, ma viene espressa anche da diversi tipi cellulari tra cui osteoblasti, osteoclasti, macrofagi, linfociti T attivati, cellule muscolari lisce, epiteliali e gangliari ed è componente strutturale di alcuni tessuti quali midollo osseo, placenta, rene ed epiteli secretivi<sup>69</sup>. In forma solubile è presente in vari liquidi biologici tra cui sangue, urine e latte<sup>70</sup>, e partecipa in maniera attiva a eventi fisiopatologici quali il rimodellamento osseo, l'angiogenesi, la cicatrizzazione e alcuni processi flogistici dell'apparato osteo-scheletrico. La principale funzione dell' SSP1 riguarda i meccanismi di adesione intercellulare.

A questo scopo, la proteina è dotata di una sequenza aminoacidica Gly-Arg-Gly-Asp-Ser<sup>71</sup> capace di attivare l'adesività di osteoblasti, osteoclasti e fibroblasti con alcune integrine ( $\alpha v\beta 1$ -  $\beta 3$ -  $\beta 5$ ) e, al tempo stesso, di implementare la chemiotassi e la trasduzione intracellulare di specifici segnali<sup>72</sup>.

Il legame molecolare dell'SSP1 con le suddette integrine è inoltre responsabile dell'attivazione di specifiche tirosinchinasi, che trasducono segnali specifici in risposta a stimoli intra ed extracellulari.

L'adesione cellulare è altresì mediata dal legame dell' SSP1 con molecole diverse dalle integrine quali il CD44, glicoproteina di superficie che consente una forma di adesività diversificata tra cellula e substrato, ma anche tra cellula e cellula.



Questa molecola è iper-regolata in corso di processi flogistici acuti e cronici e lega l' SSP1 con le varianti CD44v6 e CD44v7<sup>73</sup>. Un aspetto importante della struttura dell' SSP1 è la presenza di un sito di clivaggio per la trombina in stretta prossimità con la regione GRGDS, ubicato tra i residui di Arg169-Ser170 ed essenziale nel regolare la funzione della proteina stessa. Infatti, il clivaggio genera due catene polipeptidiche di 35 kDa ed una variazione conformazionale capace di rendere accessibile il sito ai recettori di superficie. Questi ultimi possono legare sia l' SSP1 clivata che l' SSP1 nativa, ma l'interazione con la prima isoforma induce esaltazione delle funzioni attribuite alla molecola<sup>74</sup>.

Il clivaggio dell' SSP1 ad opera della trombina è di notevole interesse, in quanto la proteina idrolizzata espone un sito di legame per le integrine  $\alpha 9\beta 1$ <sup>75</sup> e  $\alpha 4\beta 1$ <sup>76</sup>, identificato nella sequenza SVVYGLR, non altrimenti visibile ai recettori specifici sul peptide in tutta la sua lunghezza. Le proprietà funzionali dell' SSP1 clivata differiscono da quelle della proteina nativa<sup>77</sup>, confermando l'importanza del clivaggio proteolitico quale meccanismo di induzione della bioattività dell' SSP1. La maggior parte dell' SSP1 circolante è scissa dalla trombina durante i processi di coagulazione sia in condizioni fisiologiche che durante processi flogistici, neoplastici e di riparazione tissutale<sup>78</sup>.

- Proteine contenenti l'acido  $\gamma$ -carbossigluttammico (GLA), un aminoacido particolare derivato dall'acido glutammico con un ulteriore gruppo carbossilico legato al carbonio in posizione  $\gamma$ . Il GLA incluso in una proteina possiede, nella porzione del residuo, due gruppi carbossilici liberi e ravvicinati che a pH fisiologico sono ionizzati e carichi negativamente, e pertanto capaci di agire come una sorta di chelanti per i cationi bivalenti quali lo ione calcio.

Le proteine dell'osso contenenti il GLA sono di due tipi.

- Osteocalcina, o proteina GLA dell'osso, una piccola proteina contenente 3-5 residui di GLA. E' stato ipotizzato che essa possa giocare un ruolo di inibizione della mineralizzazione in quanto ritenuta capace di legarsi allo ione calcio e di renderlo indisponibile per la combinazione con lo ione fosfato, inibendo così l'accrescimento dimensionale dei cristalli minerali.

Questa ipotesi è avvalorata dalla constatazione che l'osteocalcina abbonda nel tessuto osseo maturo ed è invece scarsa nel tessuto osseo in via di formazione, nonché dal reperto che questa proteina inibisce la crescita di cristalli di fosfato di calcio *in vitro*.

- Proteina GLA della matrice, di peso molecolare maggiore della osteocalcina, è presente sia nell'osso maturo che in quello in via di formazione, nonché nella cartilagine destinata a essere sostituita da tessuto osseo, come la cartilagine di accrescimento. Il suo ruolo biologico non è chiarito.

La componente minerale è rappresentata da cristalli di sali di calcio, prevalentemente fosfato di calcio a cui si aggiungono quantità minori di carbonato di calcio e tracce di altri sali (fluoruro di calcio, fosfato di magnesio).

Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite, la cui cella elementare ha la forma di un prisma esagonale appiattito e formula chimica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{4-}$ ; le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni ossidrilici ( $\text{OH}^-$ ), formando così la idrossiapatite, ma si possono ritrovare anche altri anioni (ione carbonato nella carbonatoapatite; ione fluoruro nella fluoroapatite). Il cristallo si origina dall'impilamento delle singole celle elementari ed ha la forma di un ago lungo e sottile, spesso circa 2 nm e lungo 20-40 nm.

## *Cellule del tessuto osseo*

Le cellule proprie del tessuto osseo sono morfologicamente distinguibili in 4 varietà: le cellule osteoprogenitrici (dette anche preosteoblasti), gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti.

Di queste, cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e osteociti sono in realtà fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, a sua volta derivato dalla differenziazione in senso osteogenico della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi; sono pertanto considerabili come cellule autoctone dell'osso.

Gli osteoclasti, per contro, derivano da precursori immigrati nel tessuto osseo dal sangue, i cosiddetti preosteoclasti, i quali, a loro volta, si differenziano da cellule staminali del midollo osseo ematopoietico.

Le cellule osteoprogenitrici, o preosteoblasti, hanno forma fusata o ovalare, con citoplasma scarso e basofilo e nucleo eucromatico con grande nucleolo.

Al microscopio elettronico, la basofilia citoplasmatica si dimostra dovuta a un gran numero di poliribosomi liberi. Gli altri organuli sono poco rappresentati.

Le cellule osteoprogenitrici si collocano sulle superfici libere delle ossa: le si riconoscono a livello dello strato più interno del periostio apposto all'osso, il cosiddetto strato osteogenico di Ollier, riccamente vascolarizzato.

Tali cellule sono altresì localizzate a livello del tessuto connettivo lasso che riveste le cavità interne dell'osso, il cosiddetto endostio, in vicinanza dei capillari sanguigni.

Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa, che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo ma che può esplicarsi anche durante la vita adulta.

Esse sono in grado di produrre e secernere le bone morphogenetic proteins (BMP), fattori di crescita e di differenziamento autocrini.

Quando imboccano la via del differenziamento, le cellule osteoprogenitrici si trasformano in osteoblasti.

Gli osteoblasti sono le cellule primariamente responsabili della sintesi della sostanza intercellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Esse hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre a formare delle lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione.

Gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20  $\mu\text{m}$ ), un nucleo rotondeggiante, eucromatico, con grande nucleolo ed un citoplasma abbondante e basofilo in cui possono mettersi in evidenza granulazioni PAS-positive. Istochimicamente, queste cellule si caratterizzano per la positività alla reazione per la fosfatasi alcalina.

Al microscopio elettronico, gli osteoblasti presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. I mitocondri contengono numerosi granuli densi, interpretabili come accumuli di ioni calcio.

In prossimità dell'apparato di Golgi sono visibili vescicole con vario aspetto contenenti sostanze da esocitare: alcune di queste sono oblunghe contengono un materiale fibrillare a modico arresto elettronico, rappresentato verosimilmente da molecole di procollagene; altre vescicole sono rotonde, a contenuto elettrortrasparente, e si pensa contengano proteoglicani e altre molecole della sostanza fondamentale anista.

Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana, detti globuli calcificanti, di 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico, in cui sono localizzati enzimi glicoproteici come la fosfatasi alcalina e la pirofosfatasi. Essi non vanno confusi con le cosiddette sferule calcaree (in inglese dette appunto calcifying globules), che si incontrano nella matrice ossea mineralizzata e che rappresentano i nuclei iniziali di aggregazione dei cristalli. Vescicole di secrezione e globuli calcificanti sono verosimilmente il corrispettivo delle granulazioni PAS-positive visibili al microscopio ottico. Gli osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti vicini tramite giunzioni serrate (o gap junctions), tramite le quali le cellule si scambiano molecole segnale per la coordinazione dell'attività metabolica e di deposizione della matrice ossea.

L'osteoblasto è la sede di sintesi delle molecole organiche della sostanza intercellulare dell'osso, le quali vengono successivamente esocitate ed assemblate all'esterno della cellula.

gli osteociti sono le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento ed anche capaci di avviarne il rimaneggiamento. Sono cellule terminali, con una autonomia di vita finita, finemente regolata da meccanismi endocrini.

L'osteocita è una cellula stellata, con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e numerosi prolungamenti citoplasmatici. Al microscopio ottico, l'osteocita presenta un nucleo eterocromatico con un piccolo nucleolo ed un citoplasma perinucleare piuttosto scarso che, negli osteociti più giovani, è tenuemente basofilo.

Al microscopio elettronico, gli osteociti mostrano un aspetto diverso a seconda dell'età della cellula: gli osteociti giovani sono caratterizzati dalla presenza di cisterne di reticolo endoplasmatico granulare e da un apparato di Golgi piuttosto esteso; via via che la cellula invecchia si riduce il reticolo endoplasmico granulare e compaiono vacuoli autofagici e lisosomi secondari; infine compaiono segni di degenerazione quali alterazioni nucleari caratteristiche dell'apoptosi, dilatazione della cisterna perinucleare e condensazione della matrice citoplasmatica che preludono alla dissoluzione dell'intera cellula.

Gli osteoclasti sono le cellule preposte al riassorbimento osseo. Essi non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici.

I precursori degli osteoclasti, detti preosteoclasti, originano nel midollo osseo ematopoietico e sono apparentati con la linea differenziativa di una categoria di globuli bianchi, i monociti. I preosteoclasti vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui debbono avvenire processi di riassorbimento osseo; qui giunti, essi migrano nel tessuto osseo e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi, elementi sinciziali capaci di dissolvere la componente minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche del tessuto osseo.

Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200  $\mu\text{m}$ ), plurinucleate in quanto originate dalla fusione dei singoli precursori mononucleati: in un singolo osteoclasto possono infatti essere presenti fino a 50 nuclei, con cromatina lassa e nucleolo ben evidente. Il citoplasma è acidofilo.

L'osteoclasto attivato è aderente alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è solitamente accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso. Sul versante della cellula che si appone all'osso è visibile il cosiddetto orletto increspato, che appare come un ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura disposta perpendicolarmente alla superficie stessa.

Con metodi istochimici, a livello dell'orletto increspato si può rivelare la presenza dell'enzima anidrasi carbonica e di pompe a protoni. Ai margini dell'orletto increspato vi è una porzione di citoplasma di aspetto astrutturato, detta zona chiara.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali. In particolare, gli osteoclasti sono le uniche cellule dell'osso che possiedono i recettori per l'ormone calcitonina, prodotto dalle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide, con azione antagonista al paratormone.

La calcitonina è un inibitore del riassorbimento dell'osso, essendo capace di indurre il distacco degli osteoclasti dall'osso, la scomparsa dell'orletto increspato e la riduzione del metabolismo cellulare. Il recettore per la calcitonina è già espresso dai precursori circolanti degli osteoclasti, e la sua evidenziazione può essere un valido metodo per la identificazione di queste cellule. Per contro, gli osteoclasti non esprimono il recettore per il paratormone, che non ha alcun effetto diretto su di essi.

L'azione osteolitica del paratormone sembra esplicarsi per il tramite degli osteoblasti: questi, sotto stimolo dell'ormone, libererebbero fattori solubili detti OAF (osteoclast activating factors), che agirebbero sugli osteoclasti attivandoli e promuovendo così il riassorbimento osseo. La natura chimica degli OAF non è nota: probabilmente alcuni di questi fanno parte della categoria delle BMP (ad es. la BMP-2 è un potente stimolatore del differenziamento osteoclastico *in vitro*).

Questa ipotesi sembra avvalorata dai risultati di esperimenti condotti *in vitro*, che hanno dimostrato come fattori di stimolo del riassorbimento osseo, come il paratormone, la vitamina D ed alcune citochine, siano incapaci di stimolare gli osteoclasti a riassorbire l'osso, a meno che questi non siano mantenuti in coltura insieme con osteoblasti.

### *Interazioni funzionali tra cellule nel tessuto osseo*

Da quanto detto nel paragrafo precedente, emerge che vi è una stretta correlazione funzionale tra osteoblasti e osteoclasti.

L'induzione del riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti richiede infatti la presenza degli osteoblasti, i quali liberano gli OAF. Gli osteoblasti sono anche coinvolti nel differenziamento dei preosteoclasti in osteoclasti maturi.

Ricerche recenti hanno infatti dimostrato che la migrazione di preosteoclasti avviene laddove sono presenti osteoblasti: la differenziazione dei preosteoclasti sembra inoltre richiedere sia la produzione di fattori solubili, quali il GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), da parte degli osteoblasti, sia un contatto diretto tra questi e i preosteoclasti, tale da consentire il passaggio di molecole segnale attraverso giunzioni serrate.

Le cellule endoteliali sono anch'esse coinvolte nella funzione delle cellule proprie dell'osso. E' stato infatti dimostrato in esperimenti in coltura *in vitro* che le cellule endoteliali ossee producono fattori solubili, quali gli IGF, che promuovono la crescita delle cellule osteoprogenitrici e il loro differenziamento in osteoblasti.

Le cellule endoteliali rilasciano inoltre fattori chemiotattici per i precursori circolanti degli osteoclasti, tra cui gli stessi IGF, ed esprimono molecole di adesione che consentono ai precursori osteoclastici di arrestarsi e di migrare nel tessuto osseo ove sia richiesta la loro presenza.

Vari tipi di leucociti e di cellule da essi derivate, tra cui i macrofagi e i linfociti T, producono fattori capaci di influenzare le cellule dell'osso. Tra questi si annoverano: l'interleuchina 1 (IL-1) e la interleuchina 6 (IL-6), che attivano gli osteoclasti, probabilmente non in via diretta ma per il tramite degli osteoblasti; l'interleuchina 3 (IL-3), che promuove la differenziazione dei preosteoclasti in osteoclasti maturi; il tumor necrosis factor (TNF) e le prostaglandine (PG), anche essi ritenuti essere induttori del riassorbimento osseo.

E' stato dimostrato che nella matrice ossea mineralizzata rimangono incarcerati numerosi fattori di crescita prodotti dalle cellule ossee o di provenienza plasmatica, tra cui il TGF- $\beta$  e gli IGF osteoblastici, il platelet-derived growth factor (PDGF), l'epidermal growth factor (EGF), il fibroblast growth factor (FGF), etc. Questi fattori si liberano quando gli osteoclasti riassorbono la matrice ossea ed agiscono a livello locale sulle cellule dell'osso, promuovendo attività biologiche diverse, quali ad esempio proliferazione e differenziamento degli osteoblasti ed angiogenesi.

### *Organizzazione architetturale del tessuto osseo*

In base alle dimensioni ed alla disposizione delle fibre collagene, si distinguono due varietà di tessuto osseo, il fibroso e il lamellare.

il tessuto osseo fibroso è caratterizzato dalla presenza di fibre collagene di dimensioni rilevanti (5-10  $\mu\text{m}$  di diametro), ben visibili nei preparati demineralizzati allestiti per la microscopia ottica. Il decorso di queste fibre non segue un orientamento definito, per cui esse appaiono intrecciarsi in tutte le direzioni dello spazio, così come avviene nei tessuti connettivi densi a fasci di fibre intrecciate (derma profondo, aponeurosi, sclera, etc.).

Gli osteociti occupano lacune scavate negli interstizi tra le fibre collagene senza un ordine preciso. Frequentemente accade che l'osso fibroso venga depositato sotto forma di lamine mal definite, con fibre collagene orientate variamente, attorno ad un canale centrale occupato da un vaso sanguigno, detto canale di Havers.

Queste formazioni sono denominate osteoni primitivi, e non vanno confusi con gli osteoni propriamente detti che caratterizzano la varietà omonima di tessuto osseo lamellare. Il tessuto osseo fibroso è il primo ad essere depositato, sia durante lo sviluppo fisiologico che nella riparazione di fratture, dopo di che esso viene rapidamente riassorbito e rimpiazzato con tessuto osseo di tipo lamellare. Ne rimane soltanto a livello delle inserzioni dei tendini e dei legamenti. Anche il cemento dentario, che riveste la dentina della radice dei denti, è da molti considerato una varietà sui generis di tessuto osseo fibroso.



il tessuto osseo lamellare è la varietà più diffusa, costituendo la quasi totalità dell'osso compatto e buona parte dell'osso spugnoso. Esso è caratterizzato dalla ordinata disposizione delle fibre collagene e degli osteociti, che si dispongono in strati sovrapposti, detti lamelle ossee. A seconda della disposizione delle lamelle, si distinguono:

- il tessuto osseo lamellare semplice, caratterizzato da un numero limitato di lamelle con andamento parallelo tra sé. Esso forma le trabecole e le lamine ossee più sottili, come la lamina papiracea dell'etmoide e le estremità dei turbinati. Forma anche i sistemi limitanti, o circonferenziali, interno ed esterno della diafisi delle ossa lunghe, in cui le lamelle sono parallele alle superfici diafisarie interna ed esterna.

- il tessuto osseo lamellare osteonico, caratterizzato da un numero variabile di lamelle (8-20) disposte concentricamente attorno ad un canale centrale che accoglie un vaso sanguigno, detto canale di Havers. Il gruppo di lamelle centrato attorno al canale di Havers costituisce l'osteon, l'unità fondamentale del tessuto lamellare osteonico, autonomo dal punto di vista trofico e funzionale dagli altri osteoni circostanti.

### *L'osteogenesi*

Il processo di organogenesi del tessuto osseo segue un pattern generale in cui cellule pluripotenti ricevono segnali che le spingono a partecipare a un programma di sviluppo e alla specificazione di un particolare lineage cellulare.

L'ontogenesi dello scheletro non fa eccezione: infatti le cellule mesenchimali devono ricevere segnali informativi che le rendano capaci di formare osso e cartilagine.

Spesso questi segnali arrivano dai tessuti circostanti; in alcune regioni segnali che partono dalla cartilagine inducono la formazione di osso in zone adiacenti<sup>79</sup> mentre in altre regioni il segnale che inizia l'osteogenesi arriva dall'epitelio<sup>80</sup>.

Prima dell'inizio del processo osteogenico, le cellule mesenchimali sono morfologicamente omogenee e appaiono piatte e di forma simile a fibroblasti.

Hanno, inoltre, ampia superficie di contatto con le cellule adiacenti con cui comunicano tramite gap junctions. Il primo passaggio dell'osteogenesi è il processo di condensazione, in cui le cellule mesenchimali si aggregano trasformandosi in un epitelio la cui forma è predittiva del futuro elemento osseo.

Durante questa trasformazione, le cellule aumentano di densità e perdono il loro aspetto fibroblastico, diventando rotondeggianti.

Cominciano inoltre a esprimere varie molecole di adesione, come la N-caderina, la fibronectina e le N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule). La loro espressione viene poi diminuita man mano che le cellule cominciano a esprimere marcatori del differenziamento osteoblastico<sup>81</sup>. Infatti MSC multipotenti vanno incontro a divisioni asimmetriche che generano osteoprecursori, preosteoblasti, osteoblasti funzionali e infine osteociti<sup>82</sup>.

Questa progressione da uno stadio differenziativo all'altro è accompagnata dall'attivazione e susseguente inattivazione di diversi fattori di trascrizione come Cbfa1/Runx2, Msx2, Dlx5, Osx e dall'espressione di marcatori funzionali più tardivi quali Osteopontina, Collagene di tipo I, Fosfatasi Alcalina, Sialoproteina ossea, Osteocalcina<sup>83</sup>.

### *Fattori che influenzano l'osteogenesi*

Svariati fattori, prevalentemente di natura endocrina e metabolica, sono in grado di influenzare la formazione dell'osso.

Il paratormone (PTH), prodotto dalle ghiandole paratiroidi, agisce sugli osteoblasti stimolandone la proliferazione e promuovendone la differenziazione e le sintesi macromolecolari.

Per il tramite degli OAF (osteoclast activating factors) osteoblastici, il paratormone promuove l'attivazione degli osteoclasti, e quindi il riassorbimento della matrice ossea e l'innalzamento della calcemia. Inoltre, il paratormone promuove il riassorbimento di ione calcio a livello renale, il che contribuisce all'effetto ipercalcemizzante dell'ormone.

La calcitonina, prodotta dalle cellule C, o parafollicolari, della tiroide, agisce sugli osteoclasti inibendone la funzione; ha azione ipocalcemizzante. L'ormone della crescita (growth hormone, o GH), prodotto dalla ghiandola ipofisi, agisce sul fegato inducendovi la produzione di fattori di crescita detti somatomedine, i quali stimolano la crescita ed il metabolismo dei condrociti della cartilagine proliferante, promuovendo così l'accrescimento dimensionale delle ossa.

Difetti congeniti di produzione di ormone della crescita provocano il cosiddetto nanismo ipofisario, mentre l'eccesso di produzione di questo ormone durante lo sviluppo porta alla condizione opposta, nota come gigantismo.

L'ormone della crescita agisce anche promuovendo il riassorbimento di calcio a livello renale, contribuendo pertanto all'omeostasi plasmatica di questo ione. Gli ormoni tiroidei (tri- e tetraiodotironina, T3 e T4), prodotti dalle cellule follicolari della tiroide, sono capaci di promuovere il metabolismo cellulare e pertanto giocano un ruolo importante per stimolare la deposizione e la maturazione dell'osso. Anomalie di produzione di ormoni tiroidei durante lo sviluppo portano a malformazioni ossee di vario grado, fino al cosiddetto nanismo tiroideo. Gli ormoni sessuali (estrogeni, testosterone), che iniziano a prodursi dalle gonadi al momento della pubertà, hanno un'azione positiva sulla differenziazione e sulla attività funzionale degli osteoblasti, promuovendo il turn-over dell'osso.

Al termine dell'accrescimento, essi esercitano altresì una azione inibitoria sulla crescita dei condrociti della cartilagine proliferante, promuovendo la chiusura delle epifisi e l'arresto dell'accrescimento osseo.

E' peraltro noto che tra i fattori che condizionano la statura di un individuo vi è anche il momento di avvio dello sviluppo puberale.

Gli estrogeni in particolare sembrano essere coinvolti nei processi di deposizione ossea: tra l'altro, essi controllano l'espressione renale dell'enzima che attiva la vitamina D e sarebbero in grado di stimolare la proliferazione degli osteoblasti e di promuovere la morte cellulare programmata degli osteoclasti, come emerge da esperimenti *in vitro*.

Questi reperti potrebbero contribuire a spiegare la ragione per cui dopo la menopausa, venendo meno l'azione di stimolo sugli osteoblasti e di freno sugli osteoclasti esercitata dagli estrogeni, si ha una progressiva riduzione della massa ossea con l'eventuale affermazione di un quadro clinico di osteoporosi.

La vitamina D è una vitamina liposolubile che viene in parte assunta con la dieta (vitamina D2, o ergocalciferolo) ed in parte sintetizzata endogenamente a partire da un precursore steroideo, il 7-deidrocolesterolo, che viene convertito a vitamina D3 (o colecalciferolo) ad opera dell'azione fotochimica delle radiazioni UVB che impattano sulla cute.

Entrambe le isoforme subiscono modifiche chimiche, che constano nell'aggiunta di un primo ossidrilico a livello epatico, e di un secondo ossidrilico a livello renale. Il metabolita che così viene a formarsi, detto 1,25-diidrossicalciferolo, è quello principalmente responsabile dell'attività biologica della vitamina D.

Le azioni della vitamina D si esplicano a vari livelli: sull'osso, essa promuove la differenziazione degli osteoblasti, che possiedono specifici recettori, stimolando la produzione di matrice ossea e la deposizione di calcio nelle ossa; a livello intestinale, essa promuove l'assorbimento di calcio, mentre a livello renale inibisce l'escrezione di questo ione.

Una carenza di vitamina D porta a una difettosa mineralizzazione delle ossa che tendono a deformarsi sotto il carico meccanico: questa condizione clinica è nota come rachitismo quando insorge durante l'accrescimento e come osteomalacia quando insorge durante la vita adulta.

La massa molecolare del VDR (Vitamin D Receptor) umano è stata calcolata intorno ai 48 KDa e tra le varie specie si registra, nei domini coinvolti rispettivamente nel legame all'ormone e nel DNA, un'identità di sequenza pari al 93-95 %.

Il gene del VDR umano è stato localizzato sul cromosoma umano 12q 13-14 e comprende 11 esoni ricoprendo una lunghezza di circa 75kb.

La regione non codificante al 5' comprende 3 esoni 1A, 1B e 1C mentre i restanti otto esoni (2-9) codificano per il prodotto trascrizionale. Ciascun singolo trascritto umano di 4.6 kb, ritrovato in diversi tessuti, contiene un ORF di 1281 nucleotidi.

Questo trascritto codifica per una proteina di 427 amminoacidi, una sequenza leader non codificante di 115 bp e di una regione non tradotta al 3' di 3.2 kb. Il promotore è caratterizzato dalla mancanza della sequenza iniziatrice della TATA box ricca in residui G-C e dalla presenza di siti di legame per SP1 ed altri fattori trascrizionali.

La maggior parte delle attività biologiche dell'1,25 (OH) 2D3 richiede dunque l'intervento di VDR ed è influenzata dall'accessibilità del ligando, dalla quantità intracellulare del VDR, da modifiche traslazionali e genetiche del VDR ed infine dalla disponibilità e dall'attivazione dei coregolatori.

Il VDR è espresso a livello renale, intestinale ed osseo ma è presente anche in svariati tessuti quali cervello, cuore, stomaco, pancreas, linfociti T e B attivati, pelle gonadi e fegato.

Gli effetti della vitamina D, VDR-mediati si basano sulla capacità di tale recettore di regolare positivamente o negativamente la trascrizione genica attraverso il legame a livello del promotore dell'elemento di risposta alla vitamina D (VDRE).

La sequenza VDRE attraverso la quale il gene è regolato positivamente è generalmente composta o da una ripetizione diretta di una sequenza consenso esamerica 5'-RGKTCA-3' (R= A o G, e K=G o T) separata da 3 o 4 nucleotidi (DR3 o DR4) o da una ripetizione invertita separata da 6, 7,8 o 9 nucleotidi (ER6, ER7, ER8, ER9).

Comunque un elemento di risposta negativo per la vitamina D è stato identificato in differenti geni down regolati dalla vitamina D nella quale un imperfetto motivo DR2 agisce come VDRE negativo. Come gli altri membri della famiglia, il VDR agisce come fattore trascrizionale attivato da ligando e solo in seguito si lega al VDRE come omodimero VDR-VDR o come eterodimero associandosi al recettore degli acidi retinoici (VDR-RXR) e tale interazione può, come detto sopra, mediare un'attivazione o una repressione trascrizionale .

Il VDR è una fosfoproteina e la sua funzione è regolata dalla fosforilazione di residui di serina nel dominio di legame.

Il legame del calcitriolo al recettore determina la fosforilazione del recettore stesso stimolando così la trascrizione: il meccanismo di questo processo non è però ancora del tutto compreso.

L'effetto cruciale della vitamina D sull'osso attraverso l'interazione con VDR è quello di mantenere un opportuno bilanciamento tra calcio e fosforo al fine di garantire una corretta ed opportuna mineralizzazione.

La vitamina C è una vitamina idrosolubile che agisce come importante coenzima per la sintesi del collagene. Essa è un cofattore per gli osteoblasti impegnati nella biosintesi del collagene della matrice ossea.

Deficit gravi di vitamina C, come avviene nello scorbuto, portano a produzione insufficiente di collagene con conseguente ritardo nella crescita e difficoltà nella riparazione delle fratture.

La vitamina A è una vitamina liposolubile capace di agire sugli osteoblasti riducendone la proliferazione ed incrementando l'espressione dei recettori per la vitamina D. Essa agisce pertanto come fattore differenziante per gli osteoblasti.

La carenza di questa vitamina provoca ritardo nella crescita delle ossa. Per contro, un suo eccesso causa la precoce chiusura delle epifisi con arresto prematuro della crescita.

L'ossigeno molecolare sembra giocare un ruolo importante per la formazione dell'osso non solo in quanto indispensabile per la fosforilazione ossidativa, ma anche come fattore di stimolo sulle cellule ossee.

E' degno di nota che, in ogni tipo di ossificazione, la differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule osteoprogenitrici e poi in osteoblasti avviene in stretta concomitanza con la genesi di nuovi vasi sanguigni, che possono assicurare una elevata pressione parziale di ossigeno nelle sedi dove avviene formazione di osso.

Questo può spiegare l'effetto benefico sull'osteogenesi prodotto dalla ossigenoterapia iperbarica, che vede tra le sue indicazioni d'uso i ritardi di consolidamento delle fratture e l'osteoporosi.

L'ossido nitrico (NO) è un radicale gassoso prodotto da molte cellule, incluse le cellule endoteliali.

Recentemente, è stato dimostrato che esso è capace di indurre la differenziazione degli osteoblasti.

E' pertanto verosimile che il ruolo dell'endotelio vasale nei processi di osteogenesi possa essere almeno in parte mediato dalla liberazione di ossido nitrico.

### *Le ossa mascellari*

Il volume osseo è il fattore locale determinante nell'inserimento terapeutico di uno o più impianti. Gli impianti sono infatti destinati alla sostituzione delle radici degli elementi dentali persi e, come è intuitivo, il volume osseo deve essere sufficiente ad accogliere l'impianto stesso, nonostante il volume di questo sia inferiore a quello del dente che occupava la stessa sede. Il mantenimento del volume osseo diventa una procedura terapeutica peculiare delle ossa mascellari, in quanto esse sono le uniche ossa del corpo umano volumetricamente instabili nel tempo. L'osso alveolare in assenza di carico si può quindi considerare una entità biologica peculiare che risponde a parametri e meccanismi biologici particolari.

La morfologia delle ossa viene determinata da una serie di fattori che nell'ordine si possono riassumere in<sup>84</sup>:

- La formazione di una massa cellulare (detta "condensazione cellulare") che è all'origine dell'organogenesi ossea
- L'attivazione e regolazione di una serie di geni responsabili del differenziamento cellulare
- L'attivazione di geni che permettano funzioni cellulari specifiche (come la sintesi di matrice extracellulare e la mineralizzazione di questa)

Ognuno di questi passaggi richiede specifiche cascate di fattori di trascrizione e di molecole di segnale che attivino o sopprimano geni. La determinazione e il mantenimento della morfologia scheletrica nella vita di un individuo, segue questi tre fattori.

Una seconda precisazione derivata dalla genetica riguarda i meccanismi riparativi in generale e, in particolare, la guarigione ossea; sebbene lo sviluppo termini con la maturazione sessuale e la crescita termini con le dimensioni dell'età adulta, in alcuni tessuti specializzati come l'osso, alcuni meccanismi morfogenetici possono essere riattivati come conseguenza di un trauma<sup>85-88</sup>. E' noto come la riparazione del tessuto osseo segua lo schema dello sviluppo embrionale, con la differenza che in età adulta il fattore scatenante è dato da un trauma, mentre nella vita embrionale avviene a causa delle interazioni epitelio-mesenchimali.

I differenti tipi di scheletro sono tre:

- Lo scheletro cranio-facciale
- Lo scheletro degli arti
- Lo scheletro assiale.

In realtà, lo scheletro umano dovrebbe essere diviso in quattro sezioni: lo scheletro dento-alveolare rappresenta infatti un'entità distinta dalla cranio-facciale e le considerazioni a giustificazione di ciò verranno espresse più avanti.

Lo scheletro cranio-facciale è formato dalle cellule della cresta neurale che originano dal tessuto ectodermico, mentre le cellule che formano lo scheletro assiale e degli arti originano dal mesoderma.

La mandibola e le ossa mascellari sono formate da un gruppo di cellule attivate da specifici fattori di trascrizione codificati da geni non-Hox (anche detti geni ParaHox) mentre le strutture assiali e degli arti sono determinate da geni Hox.

Studi sui fattori di trasmissione animali hanno confermato che processi di signaling diversi tra tipi di scheletri differenti conducono a processi di ossificazione diversi tra lo scheletro cranio-facciale e lo scheletro assiale e degli arti. Infatti, le ossa neurocraniali, incluse la mandibola e le ossa mascellari (ma ad eccezione del condilo mandibolare), così come parte della clavicola, sono originate per ossificazione membranosa.



L'ossificazione membranosa è un processo di ossificazione diretta senza la fase cartilaginea, nella quale osteoblasti differenziati, attraverso la condensazione di cellule mesodermiche e ecto-mesodermiche, portano alla formazione di matrice ossea.

Lo scheletro assiale e degli arti segue invece lo schema dell'ossificazione endocondrale, nella quale un'impalcatura cartilaginea viene mineralizzata e successivamente vascolarizzata, permettendo l'arrivo di condroclasti (che portano al riassorbimento della matrice cartilaginea calcificata) e la differenziazione degli osteoblasti che sostituiscono lo scaffold cartilagineo con matrice ossea, la quale porterà alla formazione della struttura trabecolare delle ossa lunghe.

Sebbene non vi siano differenze istologiche tra la morfologia e l'attività degli osteoblasti periostali delle ossa craniali e quelli delle ossa mandibolari, questi differiscono per il processo di specializzazione, in quanto possono considerarsi sito-specifici.

La condizione di sito-specificità giustifica ad esempio come vi siano risposte cliniche differenti ad una stessa tecnica chirurgica applicata in zone orali diverse. Un'altra differenza tra i vari tipi di scheletro è la crescita ossea: mentre lo scheletro assiale e degli arti sono costituiti da ossa lunghe che crescono in lunghezza e larghezza, lo scheletro cranio-facciale è formato da ossa piatte, o da ossa di forma e volume variabile, con o senza cavità pneumatiche, che si accrescono in superficie e volume. Inoltre, a differenza delle ossa lunghe, le ossa dello scheletro craniale possiedono centri di crescita ossea multipli e si connettono tra loro tramite adattamenti della propria forma, le suture.

In questo contesto, l'osso alveolare può essere considerato un'entità indipendente.

Una delle differenze maggiori sta nel fatto che il centro di crescita dell'osso alveolare è sito nell'organo dentale; possiamo considerare infatti il complesso "dento-alveolare" come il continuum biologico di tre elementi anatomici (dente, legamento parodontale e osso alveolare) indipendenti ma embriologicamente e fisiologicamente connessi.

Questa unica specificità porta ad un comportamento fisiologico peculiare, diverso da quello degli altri scheletri. Possiamo quindi considerare la forma e il volume delle ossa mascellari e della mandibola come il frutto di fattori genetici, della modulazione epigenetica da parte degli stimoli dei muscoli oro-facciali e della relazione oclusale tra il complesso dento-alveolare mascellare e mandibolare.

Se gravi problemi di occlusione insorgono durante il periodo dello sviluppo, l'accrescimento del mascellare e della mandibola verrà ostacolato. Oltre ai centri di crescita interni, la morfologia delle ossa è definita anche dall'accrescimento provocato dal rivestimento periosteo, che condiziona la forma esterna delle ossa stesse. A differenza dei centri di crescita interni, le superfici periostee sono accessibili e possono essere sfruttate come "superfici terapeutiche".

Ogni trauma osseo induce una reazione cellulare che conduce a una condensazione cellulare; questo gruppo di cellule è determinato da una serie di fattori trascrizionali e di crescita sito-specifici, e aumenta fino a diventare una massa cellulare critica, sotto lo stimolo di fattori di adesione, proliferazione e compattazione. La massa cellulare critica rappresenta una potenziale fonte cellulare sufficiente a riparare un difetto; nel caso che incorrano sproporzioni tra il potenziale riparativo della massa cellulare e l'entità del danno, si avrà perdita di tessuto osseo<sup>89</sup>.

La differenziazione della massa cellulare critica avviene sotto l'azione di fattori di trasmissione che dipendono dai centri di crescita interni ed esterni e sono regolati da fattori sistemici e locali. La maturazione delle cellule in questione avviene verso tre possibili tipi di cellule funzionali: osteoblasti, osteoclasti e osteociti, le cui caratteristiche sono state trattate in precedenza.

Un'insufficiente volume osseo in un sito implantare può essere ricondotto a due tipi di cause: una genetica-epigenetica e una ad eziologia locale, la quale ha portato ad una perdita di tessuto osseo.

La presenza di malformazioni o crescita abnorme legata a cause genetiche e/o epigenetiche può, ad esempio, compromettere una relazione intermascellare corretta, la quale verrà compensata dal sistema dento-alveolare il quale, a sua volta, potrà subire più o meno marcati difetti dell'osso alveolare, mancate eruzioni o malposizionamenti dentali.

Alla stessa maniera, una deformazione genetica dentale (ad esempio la microdonzia) può avere conseguenze sull'osso alveolare (che compensa la ridotta altezza dentale accrescendosi per avere una dimensione verticale corretta). Ciò a dimostrazione che nonostante il volume osseo sia geneticamente determinato, questo può essere modificato da fattori epigenetici.

Un ridotto volume osseo può essere conseguenza di un fattore locale: agenesie dentali ed edentulie provocano creste atrofiche.

La perdita di osso alveolare in conseguenza della perdita di uno o più elementi dentali è una condizione unica nell'organismo umano: nessuna delle ossa dello scheletro assiale, degli arti o cranio-facciale presenta un fenomeno simile.

Anche l'osteoporosi conseguente al mancato carico di un osso, non esita mai in una modifica di forma.

Alla stessa maniera, i meccanismi riparativi del tessuto osseo presentano marcate differenze a seconda del tipo di scheletro a cui appartiene l'osso danneggiato: così come nei processi di sviluppo, anche nei traumi occorsi in età adulta le ossa piatte e l'osso alveolare mancano delle fasi di condrogenesi e ossificazione endocondrale, presenti invece nelle ossa lunghe<sup>88, 90, 91</sup>.

La condrogenesi e la successiva ossificazione sono strettamente collegati ad un grado di ipossia locale e scarsa vascolarizzazione, sicché possono essere occasionalmente presenti in casi di innesti di osso corticale.

La guarigione dell'osso alveolare avviene in tre passaggi: la reazione immediata al trauma, con la formazione del coagulo, il rilascio di citochine e di fattori di crescita; la differenziazione degli osteoblasti con la formazione di osso immaturo; il rimodellamento dell'architettura ossea in base agli stimoli locali.

I processi di guarigione legati a una perdita di volume osseo sono fondamentalmente due: uno è relativo all'insufficienza del materiale di guarigione interno, il secondo a assenza delle pareti esterne.

Nel primo caso, il volume da riempire è limitato e definito dalle pareti esterne e la perdita di osso deriva da un numero insufficiente di cellule e/o della loro attività.

Nel secondo caso, il limite esterno della guarigione è assente e quindi deve essere determinato attraverso un signaling cellulare; ciò avviene, ad esempio, nel caso di avulsioni dentali con la frattura della parete vestibolare o di alveolectomie.

La guarigione ossea avviene, ma con una riduzione del piatto osseo vestibolare che complica l'inserimento di un impianto.

E' necessario notare come, a differenza di lesioni della parete vestibolare, alterazioni all'interno delle pareti ossee (come il setto interradicolare) non si trasformano in perdita ossea. La differenza della risposta rigenerativa di zone diverse, si giustifica con la sito-specificità del fenomeno riparativo stesso, che attiva segnali diversi a seconda dell'area interessata.

L'aumento di volume osseo crestale raccoglie un'ampio panorama di tecniche chirurgiche con differenti indicazioni a seconda della zona da trattare e dal tipo ed entità dell'atrofia in questione. Tra queste, la tecnica maggiormente assimilabile alla condizione sperimentale del presente studio è quella dell'innesto osseo a blocco.

Questa tecnica viene definita come la trasposizione di un blocco di osso verso un sito ricevente laterale o verticale.

Nel caso dell'innesto di osso autologo (nel quale è ovviamente previsto un sito donatore), il blocco può essere costituito da osso corticale, da osso trabecolare o da entrambi.

Il mantenimento dell'architettura del prelievo porta alla osteogenesi tramite meccanismi complessi che includono i fenomeni di osteoconduzione, osteoinduzione e osteogenesi diretta.

La sopravvivenza della componente cellulare è strettamente dipendente da: la qualità della procedura chirurgica (durata e invasività dell'intervento); la rivascolarizzazione precoce, la quale dipende dal sito ricevente, dalla sua preparazione e dal tipo di innesto; dalla immobilizzazione dell'innesto.

La reazione che intercorre tra l'innesto e il sito ricevente può essere paragonata a quella che avviene nella formazione del callo osseo in una rima di frattura, con la differenza che le strutture sono sovrapposte piuttosto che formare una struttura anatomica continua.

Contemporaneamente alla attivazione e differenziazione delle cellule che giungono nel sito ricevente attraverso il periostio e la rivascolarizzazione, si ha la morte delle cellule superficiali dell'innesto e la comparsa di una reazione osteoclastica al cui entità dipende dalla velocità della rivascolarizzazione stessa.

L'attività osteoclastica si traduce nella creazione di tunnel all'interno dell'innesto, al fine di eliminare il tessuto necrotico, permettere la colonizzazione secondaria delle nuove superfici formati oltre che rimodellare il tessuto in base alle esigenze meccaniche.

Nonostante il completo rimodellamento di un innesto necessita di circa 2-3 anni, tutti gli innesti si possono considerare funzionali al posizionamento implantare in alcuni mesi.

### *Cenni sulla ricostruzione dei volumi ossei delle ossa mascellari a fini implantari*

Le tecniche di aumento dei volumi ossei oggi a disposizione dei clinici, permettono di rigenerare creste edentule sia in direzione verticale che orizzontale.

L'osso autologo innestato è considerato il materiale di scelta o "gold standard", in quanto, derivando dal paziente stesso, è biologicamente compatibile ed ha capacità osteogenetiche, osteoinduttive e osteoconduttive. L'innesto si può prelevare sotto di blocco o particolato da siti vicini o distanti dalla sede d'innesto: a seconda del volume necessario possono quindi essere o extraorali (come ad esempio dalla cresta iliaca o dalla calvaria) o intraorali.

Tutte le tecniche di innesto di osso autologo, prevedono un sito chirurgico di prelievo e questo si traduce in un notevole aumento della morbilità rispetto al solo intervento di innesto.

Gli innesti omologhi vengono prelevati da cadaveri, sono trattati con metodi di congelamento o demineralizzazione e congelamento, sono sterilizzati e conservati sotto forma di particelle o blocchi da organizzazioni regionali certificate (banche dei tessuti muscolo-scheletrici) con appositi permessi e sono riassorbiti dall'organismo ricevente.

Gli innesti eterologhi sono costituiti da biomateriali provenienti da altre specie (per esempio coralli o bovini).

Ad esempio, il Bio-Oss (Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Svizzera) è osso bovino processato cui è stata completamente rimossa chimicamente la parte organica. Il materiale si trova a disposizione in forma di granuli o di blocchi, questi, a loro volta rivestiti di collagene (Bio-Oss Collagen).

Gli innesti di materiali alloplastici utilizzano sostituti ossei sintetici che contengono calciofosfati e vetri bioattivi e formano una struttura che facilita la crescita ossea. Questi materiali possono essere riassorbibili, semi-riassorbibili o non-riassorbibili e possono essere utilizzati anche miscelati all'osso autologo.

Inoltre, hanno una disponibilità praticamente illimitata e non necessitano di un secondo sito chirurgico.

Tuttavia, quando utilizzati senza l'aggiunta di materiali "biologicamente attivi" si possono considerare generalmente come esclusivamente osteoconduttivi, in quanto non hanno altra funzione che fornire un sostegno meccanico biocompatibile alle fasi di neo-osteogenesi da parte delle cellule del paziente ricevente.

La GBR, o rigenerazione ossea guidata, utilizza delle membrane che fungono da barriere per proteggere i difetti ossei dall'invasione di cellule epiteliali e connettivali che disturbano o inibiscono l'attività osteogenetica dei precursori ossei.

Le membrane si dividono in riassorbibili o non riassorbibili e possono essere costituite da diversi materiali: sono disponibili membrane in politetrafluoroetilene espanso (W. L. Gore & Associates, Inc. , Flagstaff, Arizona, USA), collagene suino (Bio-Gide, Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Svizzera) o copolimero di glicolide e lattide (Vicryl, polyglactin 910, Ethicon, Somerville, NJ, USA).

Al fine di stimolare l'osteogenesi possono essere utilizzati composti a base di BMPs (bone promoting proteins) o PRP (platelet rich plasma): le prime sono una famiglia di proteine naturalmente presenti nell'osso e sono responsabili dell'attivazione dello sviluppo osseo, possono quindi promuovere la crescita ossea e sono utilizzate congiuntamente agli innesti.

Le PRP sono utilizzate per promuovere la formazione ossea, così come i fattori di crescita.

L'onlay grafting è una tecnica di GBR che consiste nell'apposizione di un innesto in una zona ricevente non ritentiva in cui preventivamente vengono praticati dei fori al fine di favorire la formazione del coagulo sanguigno.

L'inlay grafting consiste invece nell'inserimento dell'innesto nel pavimento del seno mascellare, nel tetto nasale o tra due sezioni ossee separate chirurgicamente. Tra le altre tecniche a disposizione del clinico sono incluse la "split crest technique" che consiste nella osteotomia longitudinale della cresta alveolare al fine di permettere il collocamento degli impianti e/o del materiale da innesto, e la distrazione osteogenetica consistente nello spostamento graduale di una frattura chirurgica con riempimento del gap da parte di osso neoformato e conseguente aumento di volume osseo.

Una recente revisione sistematica della letteratura della Cochrane Collaboration<sup>92, 93</sup> ha analizzato e comparato queste tecniche valutando se e quando queste sono necessarie e quale sia la tecnica più efficace a seconda delle indicazioni cliniche che sono state divise in procedure di aumento maggiore: tecniche per aumentare verticalmente e/o orizzontalmente la cresta ossea e procedure di aumento minori; tecniche per trattare l'impianto post-estrattivo e per trattare deiscenze ossee o fenestrazioni attorno all'impianto. Gli autori di questo lavoro hanno incluso tre trials per valutare se e quando queste procedure sono necessarie concludendo che:

- L'aumento osseo a livello dei mascellari, utilizzando tecniche di innesto maggiore, come il prelievo dalla cresta iliaca, non è generalmente giustificato dall'evidenza essendo legato a maggiori problematiche protesiche e chirurgiche, a un tasso di fallimento implantare significativamente maggiore, a dolore severo, a ospedalizzazione e ad un aumento di durata e costo del trattamento.

Ci sono evidenze che, per il trattamento delle fenestrazioni, l'utilizzo di membrane non riassorbibili è preferibile rispetto al non utilizzo di membrane.

- La possibile utilità delle procedure rigenerative per gli impianti esposti è dimostrata, tuttavia non ci sono evidenze affidabili in merito a quali siano le indicazioni proprie.
- Non ci sono prove sufficienti che supportino la necessità o l'inutilità di tecniche d'aumento per gli impianti negli alveoli post-estrattivi.

Sulla base di quattordici trials gli autori hanno invece valutato quale fosse la tecnica di aumento più efficiente per le diverse indicazioni cliniche:

I sostituti ossei maggiormente diffusi in commercio (Bio-Oss e Cerasorb) sembrano dare risultati uguali all'osso autologo per l'aumento dei seni mascellari atrofici e pertanto sembrano poter essere utilizzati al posto degli innesti autologhi; tuttavia questa ipotesi necessita di maggiori conferme.

- Varie tecniche di GBR sono in grado di aumentare l'osso in senso verticale, ma non è dimostrato quale sia la più efficiente: l'osteodistrazione è utilizzata solo per rari casi con creste sottili, ma può dare l'aumento maggiore.



- Utilizzando la GBR sono frequenti complicanze che possono portare al fallimento dell'intervento rigenerativo (scopertura della membrana, infezione, etc.). Il clinico e il paziente devono quindi valutare attentamente rischi e benefici di ogni tecnica di aumento in relazione al risultato, quando decidono di procedere ad un aumento verticale.
- Per l'aumento dei volumi ossei in senso trasversale non ci sono evidenze scientifiche che indichino quale sia la tecnica da preferire, sebbene il Bio-Oss sembri poter essere utilizzato con un minore rischio di fallimento implantare.
- Non è dimostrata la superiorità di alcuna tecnica per gli aumenti in impianti fenestrati o per gli impianti post- estrattivi, sebbene per questi ultimi i siti trattati con membrane più Bio-Oss dimostrino un margine gengivale più alto, se confrontati con quelli dove sono state utilizzate le sole membrane.
- Le BMP (rhBMP-2), usate insieme a Bio-Oss e membrane riassorbibili, possono promuovere la formazione ossea in impianti esposti con deiscenze o fenestrazioni.
- Non ci sono evidenze a sufficienza per supportare o confutare l'efficacia di vari agenti attivi, come il PRP, usati congiuntamente ad altri trattamenti.
- Può essere ipotizzato che l'utilizzo di osso autogeno, raccolto da sedi intraorali grazie a dei filtri collegati all'impianto di aspirazione, esponga ad un rischio maggiore di complicanze effettive.

Queste affermazioni sono comunque basate su pochi studi che includono pochi pazienti, hanno follow-up brevi e sono stati giudicati ad alto rischio di bias.

Riassumendo, possiamo dire che le tecniche a disposizione per la ricostruzione delle creste alveolari atrofiche sono numerose, come numerose sono le indicazioni cliniche. L'efficacia di queste ai fini implantari è dimostrata, nonostante manchino evidenze scientifiche che permettano di comprendere correttamente quale sia il comportamento del tessuto osseo ricostruito nel lungo periodo e come questo sia influenzato dal carico implantare. L'osso autologo cortico-midollare rappresenta il materiale migliore da impiegare nelle tecniche che prevedono innesti; tuttavia, il suo utilizzo aumenta notevolmente la morbilità dell'intervento chirurgico e la sua disponibilità è limitata.

## Ipotesi sperimentale

La risoluzione di edentulie tramite l'uso degli impianti dentali è entrata nella pratica odontoiatrica degli ultimi trent'anni con forza crescente e sempre maggiore diffusione.

Il corretto inserimento e protesizzazione degli impianti dentali non può prescindere da un volume e una qualità della cresta alveolare edentula adeguati. Purtroppo, il fisiologico rimodellamento sottrattivo delle ossa mascellari conseguente alla perdita di uno o più elementi dentari è spesso causa di difficoltà nella pianificazione implantoprotesica o addirittura una controindicazione ad essa.

La ricostruzione dei volumi crestali ai fini implantari è diventata quindi una parte fondamentale nel piano di terapia riabilitativa odontoiatrica; ad oggi, nell'insieme delle opzioni terapeutiche a disposizione, i migliori risultati clinici sono relativi agli interventi di innesto di osso autologo.

L'elevata invasività e morbilità dell'intervento di prelievo e la limitata disponibilità del materiale prelevabile hanno fatto sì che ci sia spinti verso la ricerca di biomateriali in grado di sostituire l'osso autologo. La nascita e lo sviluppo dell'ingegneria tissutale ha condotto la ricerca scientifica verso l'uso di fattori in grado di aumentare le performance di materiali altrimenti non "biologicamente attivi".

La possibilità di utilizzare cellule staminali nella medicina rigenerativa rappresenta una grande speranza e un campo ancora ampiamente inesplorato e sconosciuto.

In particolare, ci è parso interessante valutare preliminarmente come cellule staminali umane prelevate in maniera non invasiva (da un organo di scarto come la placenta), e differenziate grazie a medium specifici *in vitro* verso una linea osteogenica su uno scaffold di idrossiapatite, potessero comportarsi *in vivo* all'interno di un difetto osseo critico in un modello animale.

Abbiamo formulato l'ipotesi iniziale che fosse possibile ottenere cellule staminali mesenchimali in maniera eticamente accettabile da placenta umana e capaci di differenziare in senso osteogenico in presenza di uno scaffold di osso bovino deproteinizzato utilizzando un medium appropriato.

Una volta confermata questa prima ipotesi sperimentale, abbiamo impiantato lo scaffold seminato con le cellule differenziate in un difetto osseo critico in ratti adulti, al fine di valutare preliminarmente il comportamento dell'innesto a 30 e 60 giorni dall'impianto.

Sia nella parte sperimentale *in vitro* che in quella *in vivo*, sono stati effettuati gli stessi esami immunohistochimici, immunocitochimici e di espressione genica.

## Materiali e metodi

### *Isolamento e coltura in vitro di cellule staminali mesenchimali*

Tutti gli isolamenti placentari vengono eseguiti a partire da placentate ottenute, previa consenso informato delle madri, da parti cesarei eseguiti nel reparto di Ostetricia e Ginecologia dell'Ospedale di Parma.

Le madri donatrici sono soggetti di età compresa tra i 30 e i 45 anni con decorso di gravidanza normale ed esenti da patologie sistemiche, disendocrine o dismetaboliche.

La placenta viene prelevata subito dopo il parto e posta immediatamente in un contenitore sterile. Una volta trasportata in laboratorio, la placenta viene trasferita sotto cappa biologica di tipo II in una vaschetta sterile per consentirne la manipolazione.

Dopo aver individuato la porzione materna e quella fetale si procede al prelievo di porzioni di tessuto fetale del peso di circa 10 g che vengono poi sminuzzate in frammenti di 2-3 mm<sup>2</sup> usando una lama di bisturi sterile. I frammenti così ottenuti sono lavati in PBS per rimuovere globuli rossi e cellule danneggiate.

I frammenti vengono sottoposti a dissociazione enzimatica in dispasi 0,2% per 2 ore mediante incubazione a 37 °C in agitazione continua in un volume di circa 20 ml di enzima. I frammenti non digeriti, una volta filtrati, vengono sottoposti ad una seconda digestione per 1 ora. Dopo la digestione la soluzione contenente le cellule viene raccolta e stratificata su Lympholite per la separazione su gradiente di densità.

Tale sostanza è utilizzata correntemente in ambito ematologico per la separazione dei linfociti da campioni ematici. Nel nostro caso la separazione è utile per eliminare la maggior parte degli eritrociti. La procedura prevede la preparazione di tubi Falcon da 15 ml in cui si inseriscono 4 ml di Lympholite: sopra tale sostanza deve essere stratificata con delicatezza la soluzione cellulare (8 ml) avendo cura di non far mescolare le fasi.

Dopo centrifugazione a 800 x g per 20 minuti i globuli rossi si accumulano nel fondo della provetta, mentre le cellule si raccolgono in un anello nella zona di passaggio delle due fasi. Le cellule raccolte (PLN17) vengono quindi lavate in PBS tramite centrifugazione per 10 minuti a 300x g e successivamente seminate in medium DMEM con siero bovino fetale (FBS) al 10%.

Le cellule vengono mantenute in incubatore a 37°C e a concentrazione controllata di CO<sub>2</sub> al 5%.

### *Separazione immunomagnetica (Magnetic activated cell sorting, MACS)*

La tecnologia di separazione immunomagnetica (MACS) si basa sull'uso di microbiglie , colonnine e magneti.

Le colonne MACS sono state ideate per la selezione positiva di cellule umane e animali, in special modo cellule rare, da una sospensione cellulare eterogenea grazie all'uso di un separatore MACS.

Nel nostro caso la separazione viene effettuata per isolare le cellule mesenchimali CD34<sup>-</sup> dalle CD34<sup>+</sup> in quanto questo antigene è considerato il marker più importante delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs).

A tal scopo vengono utilizzati anticorpi diretti contro il CD34 legati a sfere paramagnetiche di 50 nm di diametro con cui si marcano le cellule.

Il protocollo prevede di:

- risospendere il pellet in 300 µl di buffer sterile (PBS pH 7.2 + 0.5% BSA + 2 mM EDTA) per 10<sup>8</sup> cellule totali
- aggiungere 100 µl di FcR Blocking Reagent per 10<sup>8</sup> cellule totali
- aggiungere 100 µl di anticorpo per 10<sup>8</sup> cellule totali
- incubare per 30 minuti a 4°C
- lavare le cellule aggiungendo 20 volte il volume di buffer
- centrifugare a 300g per 10 minuti

- eliminare il sovrantante
- risospendere le cellule in 500 µl di buffer per 10<sup>8</sup> cellule totali
- equilibrare la colonna MS lavandola con 500 µl di buffer
- applicare le cellule sospese in 500-1000 µl di buffer
- lavare la colonna per 4 volte con 500µl di buffer: a questo punto nella provetta sottostante sono presenti tutte le cellule negative per l'antigene d'interesse.
- rimuovere la colonna dal campo magnetico e raccogliere le cellule positive aggiungendo 1000µl di buffer e sloggiandole dalla colonnina con lo stantuffo.

### *Colture cellulari*

Le cellule sono state mantenute in coltura a temperatura costante di 37 °C e a concentrazione controllata di anidride carbonica al 5%. Il pH è mantenuto costante al valore di 7.4 da un tampone bicarbonato presente nel medium.

Le cellule appena isolate sono coltivate per alcuni giorni, in attesa dell'adesione in medium DMEM con siero bovino fetale (FBS) al 10%. In seguito il medium viene sostituito con medium di mantenimento, DMEM LOW, addizionato delle seguenti sostanze:

Fattore	Concentrazione finale
Antibiotici	1x
Glutamina	2 mM
Its	1x
FGF 2	10 ng/ml
Eparina	15 U/ml
Siero	10%
DMEM LOW	

Tab.2 Composizione del medium di mantenimento

Per l'induzione del differenziamento in senso osteogenico sono state utilizzate cellule isolate da placenta normale (PLN17) al III passaggio. Le cellule sono state seminate su vetrini quadripartiti o piastre da 6 pozzetti opportunamente preparati con soluzioni di collagene nelle quali è stata risospesa polvere di Bio-Oss spongiosa a concentrazione di 1 mg/ml.

La Bio-Oss spongiosa è una matrice ossea biologica di origine bovina. La struttura minerale osteoconduttiva altamente purificata è prodotta da osso naturale attraverso un processo di purificazione in diverse tappe.

Essendo di origine naturale, la Bio-Oss spongiosa è del tutto paragonabile, sia dal punto di vista chimico che strutturale, alla componente inorganica minerale dell'osso umano (apatite naturale nanocristallina).

Grazie alle sue proprietà rappresenta un'alternativa concreta all'impiego dell'osso autologo in alcuni tipi di patologie.

Dopo l'asciugatura delle piastre, sono state seminate su vetrino 7.500 cell/pozzetto, mentre nella piastra da 6 sono state seminate 50.000 cell/pozzetto.

Allo scopo di favorire il differenziamento le cellule sono state coltivate, in presenza o assenza dei granuli di Bio-oss spongiosa, in un opportuno medium di induzione (Tab.3):

Fattore	concentrazione finale
Antibiotici	1x
acido ascorbico	100 $\mu$ M
Siero	10%
Desametasone	0,1 microM
B2 glicerofosfato	10 mM
1-25 vit. D3	1 nM
Glutammina	2mM
Prolina	40 microg/ml
DMEM	

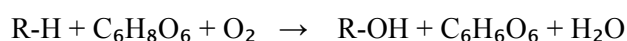
Tab. 3 Composizione del medium di differenziamento in senso osteogenico

La scelta dei singoli fattori di crescita è stata eseguita sulla base di quanto segue.

**Acido ascorbico** (vitamina C): funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di tutti i tipi di collagene; induce l'attività della fosfatasi alcalina della membrana plasmatica degli osteoprogenitori. È il  $\gamma$ -lattone della forma enolica dell'acido 2-cheto-L-gulonico. La formula bruta è  $C_6H_8O_6$  con p.m.=176.13 g/mol. La vitamina C in soluzione è acida,  $pH=2.4$ . È una delle poche vitamine che l'uomo può accumulare in piccola riserva. È presente in maggior concentrazione nell'ipofisi, nelle ghiandole surrenali, nel cervello e nei leucociti.

La vitamina C ha diverse funzioni: interviene nello sviluppo dei fibroblasti, degli osteoblasti e degli odontoblasti. Queste capacità derivano dal fatto che è un forte ossido-riducente, possiede infatti la capacità di ossidarsi e ridursi reversibilmente da acido ascorbico ad acido deidroascorbico. Questa possibilità di ossido-riduzione della vitamina è alla base delle sue attività fisiologiche.

È richiesta per l'attività degli enzimi che catalizzano le reazioni di idrossilazione:



Importanti sono quelli implicati nella sintesi del collagene: la prolina idrossilasi, la procollagene-prolina 2-ossiglutarato, 3-diossigenasi e la lisina idrossilasi.

Una diossigenasi  $\alpha$ -chetoglutarato dipendente, catalizza l'idrossilazione dei residui della prolina e della lisina a tropocollagene. Qua entra in gioco l'acido ascorbico che trasformando il metallo dalla forma ferrica a quella ferrosa, mantiene attivo l'enzima.

Dopo, dal protocollagene si formerà il collagene, proteina strutturale dei sistemi connettivi.

La vitamina C viene poi rigenerata con formazione di deidroascorbato.

Il trattamento con acido ascorbico stimola le cellule a differenziare verso una linea osteoblastica<sup>94</sup>. Induce infatti le cellule a depositare matrice extracellulare ricca di collagene favorendo l'attivazione di specifici geni associati al fenotipo degli osteoblasti come fosfatasi alcalina, osteocalcina e osteopontina.



**$\beta$ -glicerofosfato:** Il fosfato inorganico è un elemento importante per la formazione dell'osso mineralizzato in quanto, sottoforma di fosfato di calcio, forma i cristalli di apatite, la cui cella elementare ha la forma di un prisma esagonale appiattito e formula chimica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{+}$ ; le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni ossidrilici ( $\text{OH}^-$ ), formando così la *idrossiapatite*.

Una fonte di fosfato è rappresentata dal  $\beta$ -Glicerolfosfato che associato all'acido ascorbico porta alla mineralizzazione (90, 91). L'acido ascorbico infatti incrementa i livelli di fosfatasi alcalina e l'interazione di quest'ultima con il  $\beta$ -Glicerolfosfato porta alla liberazione di fosfato inorganico<sup>95, 96</sup>.

**Desametasone:** È un glucocorticoide sintetico<sup>97</sup> la cui azione è mediata da recettori nucleari che agiscono come fattori trascrizionali ligando dipendenti<sup>98</sup>.

I glucocorticoidi sono potenti regolatori della proliferazione e del differenziamento di osteoblasti<sup>99, 100</sup>.

Essi promuovono l'espressione di markers di differenziamento tipici degli osteoblasti come la fosfatasi alcalina (ALP)<sup>101, 102</sup>, l'osteopontina<sup>103</sup>, l'osteocalcina<sup>100, 103-105</sup> e BSP<sup>103-105</sup>.

**1-25 vit. D3:** Il termine collettivo di vitamina D si riferisce ad una famiglia di composti correlati ai secosteroidi (steroidi con un anello aperto, da cui il nome *seco* = distacco, scissione, fissione). La vitamina D è una vitamina liposolubile che si presenta sotto due forme principali dall'attività biologica molto simile: il colecalciferolo (D3), derivante dal colesterolo e sintetizzato negli organismi animali, e l'ergosterolo (D2), di provenienza vegetale. Le vitamine D, sia di natura esogena sia endogena, una volta entrate in circolo, vengono portate al tessuto adiposo per essere immagazzinate oppure al fegato per essere metabolizzate. Nel fegato dunque la vitamina D subisce l'idrossilazione del carbonio 25 con la formazione di 25-idrossivitaminaD [ $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ].

Arrivata nel rene, la  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  può subire due diverse reazioni di idrossilazione, catalizzate da differenti idrossilasi (la  $1\alpha$ -idrossilasi e la 24-idrossilasi), che danno origine, rispettivamente, all'1-25-diidrossivitamina D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ], la componente attiva, ed al 24-25-diidrossivitamina D [ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ], la forma inattiva.

La vitamina D è molto importante a livello biologico in quanto risulta implicata in molteplici ed importanti processi cellulari.

L'effetto cruciale della vitamina D sull'osso è quello di mantenere un opportuno bilanciamento tra calcio e fosforo al fine di garantire una corretta ed opportuna mineralizzazione.

L'ormone interagisce infatti con il VDR presente negli osteoblasti stimolando sulla membrana plasmatica l'espressione del ligando (RANKL): noto attivatore del recettore di  $\text{NF-}\kappa\beta$  (RANK).

Questo ligando di plasmamembrana è riconosciuto dal suo recettore RANK presente sui preosteoclasti e la stretta interazione tra RANKL-RANK determina una trasduzione del segnale che porta attraverso una cascata di eventi alla maturazione dei preosteoclasti in osteoclasti. Gli osteoclasti maturi sono in grado di secernere gli enzimi proteolitici, idrolitici e gli acidi idrocloridrici necessari per il riassorbimento della matrice proteica dell'osso e il rilascio del calcio.

**Prolina:** è il precursore unico della idrossiprolina, un intermediario indispensabile per la produzione del collagene.

Le cellule di controllo sono state coltivate in medium di mantenimento composto come indicato in precedenza.

Il medium è stato cambiato costantemente ogni 3 giorni.

## *Immunocitochimica*

L'immunocitochimica è una metodica che serve per evidenziare, a livello cellulare, la presenza di antigeni tramite l'utilizzo di reazioni antigene-anticorpo e andando ad evidenziare dove questo complesso viene a formarsi.

Attraverso tale metodica si è voluta valutare la presenza di due markers ossei quali l'osteopontina e il collagene I.

Per l'osteopontina si è utilizzato come anticorpo primario un IgG monoclonale anti-osteopontina umana prodotto in topo (Assay designs) diluito 1/50 e come anticorpo secondario un IgM goat anti-mouse marcato con rodamina (Jackson ImmunoResearch).

Per l'identificazione del collagene I l'anticorpo primario usato è un anticorpo policlonale anti-collagene I prodotto in capra (Santa cruz biotechnology) diluito 1/400 e il secondario è un anti-goat marcato con AMCA .

La procedura prevede di:

- Eseguire tre lavaggi ripetuti in PBS di 5 minuti ciascuno;
- Fissare le cellule in paraformaldeide 3,7% per 15 minuti;
- Lavare le cellule per due volte con PBS;
- Incubare con buffer di permeabilizzazione (TRITON X-100 0.25% in PBS);
- Lavare le cellule per 2 volte con PBS per 5 minuti;
- Aggiungere la soluzione bloccante (PBS + BSA 3% + siero dell'animale in cui è prodotto l'anticorpo secondario al 5%) e lasciarla in incubazione per 1 ora;
- Diluire l'anticorpo primario in bloccante diluita 1:2 e incubare per un ora a 37°C;
- Lavare per 2 volte in PBS-Tween 0.1% per 5 minuti ciascuno;
- Lavare per 2 volte in PBS-Tween 0.1% + 3% BSA;
- Diluire l'anticorpo secondario in PBS-Tween 0.1% + 3% BSA e incubare per 1 ora a 37°C;
- Lavare 4 volte in PBS-Tween 0.1% e 1-2 volte in acqua bidistillata.

### *Colorazioni istochimiche*

Per poter valutare le caratteristiche morfologiche assunte dalle cellule dopo il trattamento sono state eseguite colorazioni con sostanze che si legano in modo selettivo ai diversi componenti cellulari diversificandoli fra di loro.

#### Colorazione nucleare con 4'-6'-diamidino-2-fenilindolo (DAPI)

Il 4',6'-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) appartiene al gruppo dei coloranti derivati dall'indolo ed è usato per la colorazione in fluorescenza.

È capace di formare complessi fluorescenti con il DNA a doppio filamento. Assorbe ad una lunghezza d'onda di 365 nm ed emette a 461 nm.

La soluzione viene preparata sciogliendo il DAPI in dimetilformamide alla concentrazione finale di 5 mg/ml. In seguito essa viene ulteriormente diluita in PBS in modo tale da ottenere una concentrazione finale di 100ng/ml. La colorazione viene eseguita distribuendo la soluzione sulle sezioni da marcare e lasciandola in incubazione al buio a temperatura ambiente per 30'. In seguito si rimuove l'eccesso di colorante attraverso lavaggio in PBS.

Osservando al microscopio a fluorescenza i nuclei risultano marcati in blu.

#### *Colorazione in Alizarin Red*

L'Alizarin Red è una molecola antrachinonica che consente l'identificazione del calcio nelle sezioni tissutali: essa infatti forma un complesso con questo elemento tramite chelazione.

La colorazione viene eseguita utilizzando una soluzione di Alizarin Red al 2% in acqua a pH 4.2.

Si incubano le cellule con tale soluzione per 5 minuti a temperatura ambiente e successivamente si effettuano diversi lavaggi per rimuovere l'eccesso di colorante.

Si procede con l'osservazione al microscopio dove i depositi risulteranno colorati in arancio-rosso.

#### *Colorazione con calceina*

La calceina è una fluoresceina immuno-diacetica che genera una fluorescenza verde brillante quando chela il calcio. Presenta uno spettro d'eccitazione a 495nm e uno spettro d'emissione a 500-550nm.

Viene utilizzata *in vitro* alla concentrazione di 1µg/ml per documentare la neodeposizione di sali di calcio. Tale sostanza è stata addizionata al medium di differenziamento 7 giorni prima dell'interruzione dell'esperimento.

#### *Estrazione RNA*

Per testare l'espressione genica dopo 28 giorni di differenziamento sono stati estratti gli RNA trattati dai campioni utilizzando il kit RNeasy mini Qiagen.

I pozzetti sono stati lavati per due volte con PBS Ca/Mg freddo e successivamente sono stati aggiunti 350 µl di buffer di lisi (RTL).

Aiutandosi con uno scraper per favorire la lisi cellulare, le cellule sono state raccolte in provette da 1.5 ml con l'aggiunta di 350 µl di etanolo 70 %.

I risultanti 700 µl sono stati trasferiti in colonnine e sottoposti a centrifuga per 30 secondi a 8000 rpm.

Eliminato l'eluato si procede aggiungendo 700 µl di buffer di lavaggio (RW1) e centrifugando successivamente per 30 secondi a 8000 rpm.

il passaggio successivo prevede, dopo la rimozione del nuovo eluato, l'aggiunta per due volte consecutive di 500 µl di RPE buffer, seguita da a centrifuga rispettivamente per 30 secondi a 8000 rpm e per 2 minuti a 8000 rpm.

Dopo aver preparato le provette da 1.5 ml vi si trasferisce la colonnina nella quale sono stati aggiunti 30 µl di acqua RNasi free.

Dopo ulteriore centrifuga per 1 minuto a 8000 rpm si raccoglie l'eluato contenente l'RNA e lo si sottopone a quantificazione spettrofotometrica.

### *Quantificazione spettrofotometrica*

Dopo l'estrazione si esegue una quantificazione dell'RNA tramite valutazione dell'assorbanza della soluzione attraverso uno spettrofotometro GENOVA (Jenway). Gli acidi nucleici assorbono radiazioni con lunghezza d'onda di 260 nm, mentre le proteine di 280 nm.

La concentrazione della soluzione è proporzionale all'assorbanza, ad un fattore di assorbanza tipico dell'acido nucleico e alla diluizione secondo la formula:

$$[\text{RNA}] = \text{OD} \times 40 \mu\text{g} / \text{ml} \times \text{fattore di diluizione}$$

Le letture sono eseguite in doppio in modo da ottenere una valutazione più precisa della concentrazione.

Oltre all'assorbanza viene valutata la purezza della soluzione calcolando il rapporto di assorbanza a 260nm e 280nm. Una soluzione di RNA è considerata pura se il rapporto è di 1,8.

## *Retrotrascrizione*

I campioni di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA usando il kit SuperScript III first-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

La retrotrascrizione (o trascrizione inversa) è la reazione eseguita da parte di particolari enzimi in cui si sintetizza una molecola di DNA a partire da RNA. L'enzima responsabile di questa caratteristica viene chiamato trascrittasi inversa, e deve il nome proprio al fatto che è in grado di compiere il passaggio inverso rispetto agli altri enzimi responsabili della trascrizione, che cioè sintetizzano RNA a partire da DNA, costituendo così una eccezione al dogma centrale della biologia molecolare.

Incubando l' RNA totale (quindi contenente anche RNA ribosomiale) estratto da una cellula con l'enzima trascrittasi inversa, precursori deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), tampone e ioni  $Mg^{++}$  è possibile in presenza di esameri casuali, inneschi (primers) corti che si legano in vari punti dell'RNA, formare un filamento complementare di DNA (cDNA).

Il processo di appaiamento dei primers al filamento utilizzato come stampo è detto *annealing*. Il primer fornisce un 3'-OH che la trascrittasi inversa usa per allungare la catena usando come stampo il trascritto.

La fase successiva della reazione in cui avviene la retrotrascrizione è detta di *allungamento* ed avviene alla temperatura di circa  $50^{\circ} C$  in 1 ora. Sintetizzato il primo filamento, prima di procedere con l'amplificazione del cDNA, viene aggiunto alla reazione l'enzima RNAasi (solitamente derivata dal batterio *Escherichia coli*) che degrada il filamento di RNA originale che è stato usato come stampo dalla trascrittasi inversa.

La reazione di retrotrascrizione è stata allestita per 1  $\mu g$  di campione con 0.2  $\mu l$  di Random primers o (random hexamers) sono primers corti che si legano in vari punti dell'RNA e ti permettono di retrotrascrivere qualsiasi tipo di RNA, 1  $\mu l$  di dNTPs e la restante parte di acqua per un volume finale di 13  $\mu l$ .

Il protocollo di retrotrascrizione prevede una prima fase di denaturazione a 65°C per 5 minuti e successivo trasferimento in ghiaccio per 1 minuto che ha lo scopo di eliminare le eventuali strutture secondarie.

Dopo la denaturazione viene aggiunta a ciascuna provetta 7 µl di cDNA Synthesis Mix costituito da 4µl 5X RT Buffer, 1 µl di DTT, 1 µl di RNaseOUT e 1µl di SuperScript III RT.

Alla fase di annealing a 25°C per 10 minuti segue la sintesi del cDNA a 50°C per 50 minuti.

La reazione viene interrotta per inattivazione enzimatica a 85°C per 5 minuti.

Infine viene rimosso l'RNA di partenza aggiungendo 0.2 µl di RNasi H e incubando a 37°C per 20 minuti.

### *PCR Real Time*

La PCR Real time è una metodica che consente di valutare, in tempo reale, la concentrazione iniziale di un acido nucleico. Allo stesso modo della PCR tradizionale, il DNA viene amplificato tramite le reazioni a catena della DNA polimerasi. La reazione prevede le seguenti fasi:

Denaturazione (95° C)

Annealing (in genere 30-55° C, a seconda della composizione dei primer utilizzati)

Allungamento (72° C)

Termine del ciclo.

Per la PCR real time sono stati utilizzati un termociclatore e un qPCR MasterMix Cabru contenente un fluoroforo che si intercala nel DNA denominato SYBR green.

L'incremento dei prodotti di reazione durante la PCR è stato monitorato misurando l'aumento di intensità di fluorescenza causata dal legame del SYBR green alla doppia elica del DNA accumulatosi durante i cicli di PCR.



Un detector raccoglie i dati di fluorescenza emessi da ciascun campione e li trasmette ad un computer; qui un software permette di visualizzare la progressione della reazione di amplificazione, rapportandola all'incremento della fluorescenza.

Il computer genera un grafico nel quale sull'asse delle ascisse viene riportato il numero di cicli di reazione e su quello delle ordinate l'incremento della fluorescenza. Inserendo opportuni campioni di riferimento è possibile costruire delle curve standard che consentono di eseguire una quantificazione relativa della quantità di DNA presente.

Per definire l'equazione della curva di riferimento si individua la *threshold* (o valore soglia), cioè quel valore di fluorescenza pari a dieci volte la deviazione standard della fluorescenza registrata nei primi cicli di amplificazione (background). Il ciclo al quale la curva del nostro campione interseca la retta di threshold prende il nome di *ciclo threshold* (Ct) e rappresenta il numero di cicli al quale si ha la produzione di fluorescenza specifica (Fig. 4).

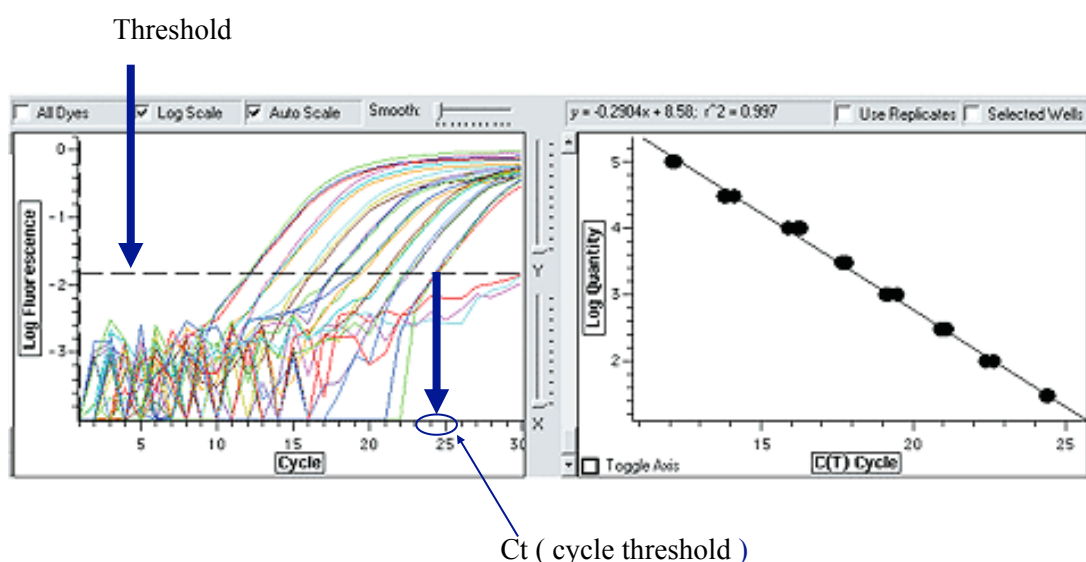


Fig. 4 Rappresentazione grafica del ciclo Threshold

La metodica di quantificazione da noi utilizzata è di tipo *relativo* in cui, attraverso il metodo della curva standard, il segnale emesso dal nostro campione sarà normalizzato rispetto a quello di un gene di riferimento espresso costitutivamente, nel nostro caso rappresentato dalla GAPDH.

La pendenza della retta, dà un'idea sull'efficienza di reazione. Tale efficienza dipende dalla purezza del campione e dalla bontà dei primers (studiati in modo tale che non si appaino a strutture secondarie).

Alla fine della reazione, il software calcola la curva di melting per ogni campione, relazionando la riduzione della fluorescenza con l'incremento della temperatura. Tale analisi finale consente di avere un'informazione indicativa sulle dimensioni dell'amplicone e sull'unicità del prodotto di amplificazione. La temperatura di melting ( $T_m$ ) è infatti correlata alla dimensione dell'amplicone ed al contenuto di CG (Fig.5).

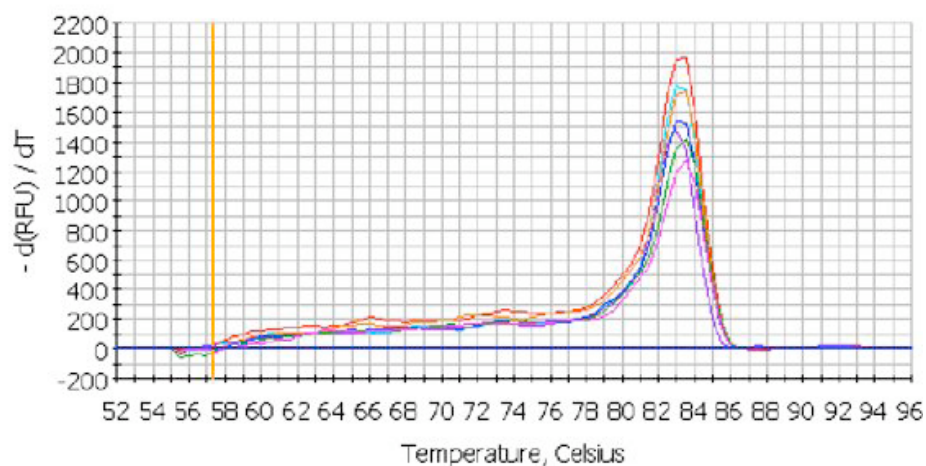


Fig. 5 Curva di Melting

I geni analizzati usando primers gene specifici sono stati fosfatasi alcalina (*ALP*), osteocalcina (*OC*), collagene di tipo I (*COL1A1*), osteonectina (*ON*), recettore della vitamina D (*VDR*), *RUNX2* e l'osteopontina (*SSPI*).

Le sequenze di primers e i prodotti amplificati attesi sono riportati nella successiva tabella 3:

Gene	Altro nome del gene	Sequenza forward	Sequenza reverse	T° Amplificazione	Prod. (bp)
ALPL	Fosfatasi alcalina	CACCCACGTCGATTG CATCT	TAGCCACGTTGGTGTT GAGC	58,33	211
COL1A1	Collagene di tipo I	GTCGAGGGCCAAGA CGAAG	CAGATCACGTCATCGC ACAAC	60,04	143
OC	Osteocalcina	CACTCCTCGCCCTAT TGGC	GCCTGGGTCTCTTCAC TACCT	61,28	138
ON	Osteonectina	ACAGAGGTGGTGGA AGAAAC	GAAGTGGCAGGAAGA GTCG	57,60	294
SSP1	Osteopontina	CTCCATTGACTCGAA CGACTC	CGTCTGTAGCATCAGG GTACTG	57,58	257
VDR	Recettore per la Vitamina D	GAAGCGGAAGGAGG AGGA	TGGGAGTGTGTCTGGA GTTG	59,99	206
GAPDH	Glicerolo 3-fosfato deidrogenasi	TCTCTGCTCCTCCTG TTC	GCCCAATACGACCAAA TCC	55,1	120
RUNX2	Cbfa1, fattore di trascrizione	CCAGGCAGGCACAG TCTTC	GTCAGAGGTGGCAGTG TCATC	59,10	182

Tab. 3

## *Disegno dello studio in vivo*

La scelta di valutare *in vivo* il comportamento di cellule di staminali multipotenti differenziate ha portato alla scelta di un modello animale adeguato. In generale, il modello animale ideale è rappresentato da quello che più si avvicina alla situazione clinica in un paziente. Nel 1986, Schmitz e Hollinger sono stati tra i primi a postulare il razionale per l'uso di tecniche di ingegneria tissutale in difetti ossei critici su una gerarchia di modelli animali. Il concetto per cui l'entità e la velocità di riparazione ossea è inversamente proporzionale alla posizione di un modello animale lungo la scala filogenetica è ben noto. Nel presente studio preliminare è stato scelto come modello il ratto adulto.

Al fine di disegnare nel dettaglio materiali e metodi, abbiamo ricercato la presenza di articoli scientifici adeguati allo scopo.

La ricerca è stata effettuata on-line tramite PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), il motore di ricerca della U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health.

I termini inseriti sono stati:

“critical sized rat calvarial defect”

“critical rat calvarial defect” and “bio-oss”

“rat calvarial critical defect” and “stem cells”

“rat calvarial critical defect” and “mesenchymal stem cells”

“bio-oss” and “stem cells”

“mesenchymal stem cells and “bio-oss”

“human placental stem cells” and “rat calvarial bone”

“human placental stem cells” and “bio-oss”

“fetal mesenchymal stem cell” and “critical rat defect”

I risultati della ricerca sono riportati nella seguente tabella (Tab.4):

termini della ricerca	numero di papers
“critical rat calvarial defect”	23
“critical rat calvarial defect” and “bio-oss”	3
“rat calvarial critical defect” and “stem cells”	5
“rat calvarial critical defect” and “mesenchymal stem cells”	1
“bio-oss” and “stem cells”	10
“mesenchymal stem cells” and “bio-oss”	7
“human placental stem cells” and “rat calvarial bone”	0
“human placental stem cells” and “bio-oss”	0
“fetal mesenchymal stem cell” and “critical rat defect”	1

Tab.4

Gli articoli sono stati vagliati valutando la pertinenza alla richiesta della ricerca bibliografica, fino ad arrivare ad un numero di 30 articoli in totale. Valutando l’anno di pubblicazione, abbiamo notato come gli studi in questione siano molto recenti: oltre il 50% delle pubblicazioni non ha più di tre anni e solo uno di questi è antecedente al 2000. Venticinque studi sono stati condotti in maniera randomizzata e controllata (RCT). Nel presente studio preliminare è stato scelto un modello di ratto Wistar Han adulto e la sede ossea designata è stato l’osso parietale. La scelta è stata presa basandosi sulla disponibilità degli animali, sul costo relativamente contenuto e sulla possibilità di poter gestire gli animali stessi in modo autonomo. Inoltre, il difetto osseo parietale nel ratto adulto è un modello ampiamente studiato e documentato nella letteratura riferita alla biologia ossea<sup>106-122</sup>. Per difetto osseo critico può essere definito come la più piccola dimensione di un difetto tissutale che non guarisce spontaneamente con tessuto osseo durante la vita dell’animale. Ne consegue che in un difetto osseo critico non trattato, la guarigione risulta in una riparazione tissutale con tessuto connettivo fibroso<sup>123</sup>.

Dalla letteratura scientifica a disposizione, la maggior parte degli studi che hanno trattato sperimentalmente difetti ossei parietali nel ratto adulto hanno descritto difetti di 5-8 mm. Nel nostro caso, i difetti provocati sono stati di 6 mm di diametro, permettendoci di eseguirne due per ogni ratto.

Tra i vari biomateriali utilizzati come sostituti ossei nelle procedure di aumento dei volumi ossei, il Bio-Oss rappresenta uno dei prodotti commerciali maggiormente diffusi e studiati in campo odontoiatrico e maxillo-facciale<sup>18, 118, 124-130</sup>. Il Bio-Oss è un minerale osseo di origine bovina, la cui struttura deriva dall'osso naturale attraverso diversi processi di purificazione dalla matrice proteica fino all'ottenimento di una struttura spongiosa di idrossiapatite con spazi compresi tra 300µm e 1500µm con cristalli di idrossiapatite di 10-60nm<sup>129</sup>. La scelta del Bio-oss Collagen è stata effettuata in quanto il materiale è in forma di blocchetti, facilmente sagomabili per essere adattati al difetto osseo creato.

Per quanto accennato precedentemente, abbiamo ipotizzato che cellule staminali multipotenti di origine placentare potessero essere positivamente differenziate in senso osteogenico e, successivamente, innestate in un difetto osseo critico. La letteratura scientifica a disposizione ci ha dimostrato come in realtà le conoscenze riguardo a questo tipo di cellule sia ancora molto limitata. La maggior parte degli studi presenti, è riferito a cellule mesenchimali prelevate da midollo osseo<sup>116, 126, 127, 129</sup>, adipociti<sup>108, 122</sup>, ma anche da tessuto muscolare adulto<sup>121</sup>, o polpa dentaria<sup>18</sup>.

Solamente uno studio simile alla nostra idea sperimentale è stato trovato in letteratura<sup>131</sup>, a dimostrazione del fatto che l'uso di cellule staminali di origine fetale ai fini dell'ingegneria tissutale ossea, risulta essere ancora quasi completamente un'incognita.

L'uso di biomateriali di diversa natura come carrier di cellule staminali mesenchimali è stato dimostrato con successo; lo stesso Bio-Oss è stato documentato come tale seppure in un esiguo numero di recenti studi<sup>18, 126-130</sup>.

La coltivazione e differenziazione di cellule staminali da placenta umana su Bio-Oss è stata condotta con successo *in vitro* anche dal nostro gruppo di studi; le stesse cellule sono state successivamente utilizzate nel protocollo *in vivo* della presente tesi.

### *Impianto degli scaffold nel modello animale*

Da un blocchetto di 250 mg di Bio-Oss Collagen sono stati ricavati cilindri di 6 mm di diametro per 1,5 mm di spessore (43 mm<sup>3</sup> di volume approx.) (Fig.6). Le cellule staminali sono state trasdotte con Lentivirus, per poter essere distinte dalle cellule dell'organismo ospite. Brevemente, le cellule sono state coltivate in piastre Petri (Falcon) da 10 cm in medium completo. Le cellule sono state trattate con Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Sigma) alla concentrazione di 8 µg/ml e successivamente sono state incubate con particelle lentivirali esprimenti Green Fluorescent Protein (GFP, Sigma) ed una cassetta di resistenza alla Puomicina. Dopo 48 ore il medium è stato sostituito con medium fresco addizionato con Puomicina alla concentrazione di 5 µg/ml, determinate da esperimento pilota precedente, è stata aggiunta per 3 giorni, fino alla eliminazione delle cellule non trasdotte. Le cellule sono poi state fatte crescere fin a raggiungere la confluenza, tripsinizzate e sono state fatte sgocciolare sui campioni di Bio-Oss dopo averlo bagnato con il medium osteogenico.

Tre ratti di tipo Wistar Han di circa 470 g di peso sono stati utilizzati per l'esperimento.

I ratti sono stati anestetizzati con medetomidina cloridrato (Domitor, Pfizer Animal Health, USA), 0,015mg/100 g di peso del soggetto (tot.=0,07 ml) e Ketamina cloridrato 1000:0,04/100 mg di peso (tot:0,2 ml) (Imalgene 1000) tramite un'unica infiltrazione intraperitoneale. Il cranio è stato depilato nella zona parietale e deterso con Iodio Povidone (Betadine). E' stata praticata una unica incisione fino al piano osseo lunga la linea sagittale del cranio, dalla linea congiungente le pupille, fino al processo occipitale. I lembi sono stati delicatamente scollati dalla calotta cranica, senza lacerazioni del periostio (Fig. 7). Tramite l'uso di una fresa carotatrice tipo trephine (Biomet 3i,USA) di 6 mm di diametro esterno montata su un manipolo da implantologia con riduzione 20:1 (Sirona) e un micromotore chirurgico (ATR 3000 Plus, Simit, Italia) sono state effettuate due osteotomie circolari a tutto spessore delle ossa parietali, con particolare attenzione a non lacerare le membrane meningehe sottostanti (Fig. 8).

L'operazione è stata praticata a 1400 rpm sotto abbondante irrigazione di soluzione fisiologica raffreddata a +4°C.

I frammenti ossei circolari derivanti dall'osteotomia (circa 5 mm di diametro) sono stati accuratamente scollati dalla dura madre.

Nei siti osteotomici sono stati inseriti i dischetti di Bio-Oss Collagen preparati: a destra quello vuoto, a sinistra quello seminato con le cellule staminali placentari (Fig. 9). I dischetti sono stati leggermente ridotti in spessore intraoperatoriamente con l'uso di una lama da bisturi fino allo spessore della teca cranica (circa 1 mm), per evitare che il riaccollamento dei lembi creasse compressione sul cervello dell'animale

I lembi sono stati delicatamente riaccollati e suturati in due strati: la sutura profonda è stata effettuata con punti staccati in materiale riassorbibile (Vycril 4-0, Ethicon, USA), la sutura superficiale con punti staccati a materasso interno orizzontale in polipropilene (Prolene 3-0, Ethicon, USA), senza tensione o deiscenze (Fig.10).

Non è stato necessario ricorrere all'uso dell'antidoto preparato per il Domitor (Antisedan nella stessa dose del sedativo) in quanto il ratto si è svegliato autonomamente pochi minuti dopo la fine dell'intervento.

Circa 40 giorni dopo l'intervento è stata somministrata calceina sottocute (5mg/kg) con pH 7,5.

Il ratto 0 è deceduto durante l'intervento chirurgico, probabilmente a causa della compressione della trachea. L'intervento è stato comunque terminato.

Il ratto 1 è stato sacrificato a 60 giorni dall'intervento chirurgico; in quel momento il peso corporeo era di 475 g. L'animale è stato anestetizzato con 75 µL di Domitor e 200 µL di Imalgene e successivamente sacrificato con cloroformio e CO<sub>2</sub>.

Il ratto 2 (473 g di peso) è stato sottoposto all'intervento chirurgico di innesto dei dischetti di Bio-Oss Collagen con le stesse modalità del ratto 1. A differenza del ratto 1, sono stati somministrati 5 mg/kg pH 7,5 di calceina in quarta, quinta e sesta giornata dopo l'intervento.

Il ratto è stato sacrificato 30 giorni dopo la chirurgia con la stessa tecnica utilizzata per il ratto 1. In tale data il peso corporeo era di 501 g.





Fig. 6 La preparazione degli scaffold di Bio-Oss



Fig.7 La teca cranica del ratto esposta

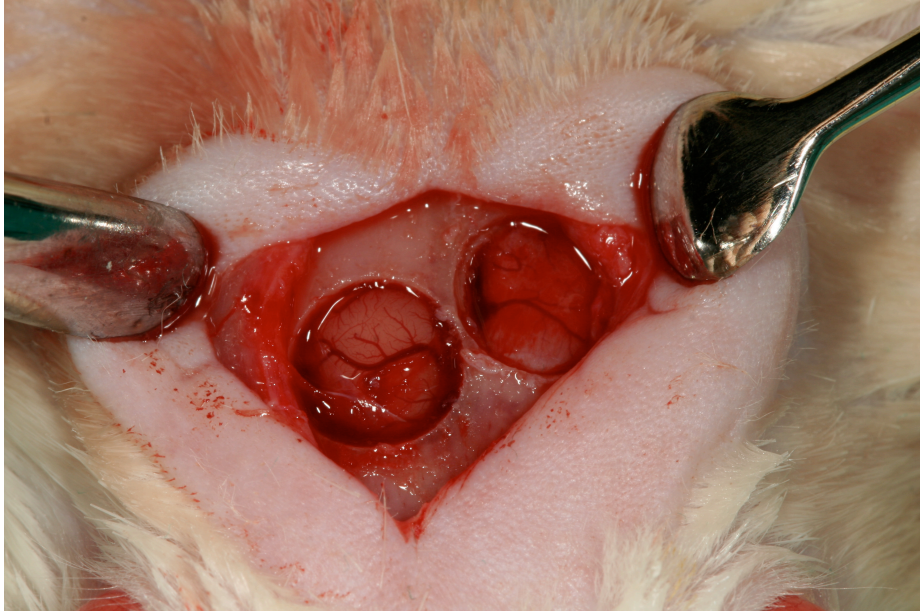


Fig.8 Le osteotomie circolari con le meningi sottostanti



Fig. 9 Gli innesti caricati con le cellule placentari umane differenziate (destra) e l'innesto non caricato (sinistra)

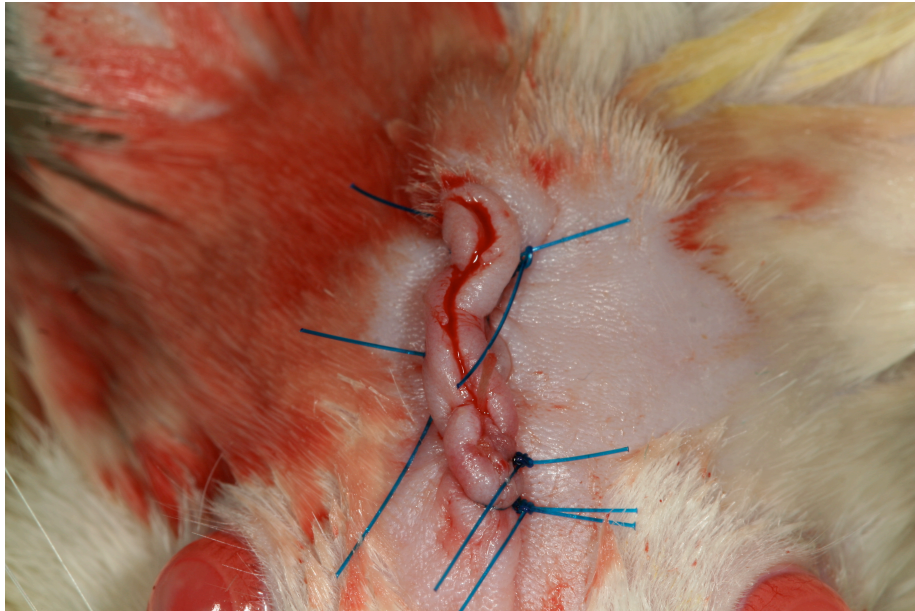


Fig.10 I lembi suturati per prima intenzione

### *Analisi istologiche*

Per verificare, da un punto di vista morfologico, la formazione e le caratteristiche del tessuto neoformato, sono stati condotti dei saggi istologici secondo il classico protocollo che prevede le seguenti fasi:

- Fissazione
- Disidratazione
- Chiarificazione
- Infiltrazione
- Inclusione
- Taglio
- Colorazione

Fissazione: ha lo scopo di preservare la morfologia di cellule e tessuti in uno stato quanto più possibile simile alle condizioni vitali. Deve avvenire nel più breve tempo possibile per evitare l'insorgenza dei fenomeni autolitici che portano alla distruzione irreversibile di cellule e tessuti. In genere si utilizza la formalina neutra tamponata al 10%.

Disidratazione: è necessario rimuovere l'acqua, normalmente presente nei tessuti, e sostituirla con un solvente miscibile con i solventi della paraffina. L'agente disidratante più usato è l'alcool etilico, utilizzato a concentrazioni progressivamente crescenti.

Chiarificazione: è un passaggio che viene effettuato per rimuovere dai tessuti l'agente disidratante che verrà poi sostituito con un solvente miscibile con la paraffina. Esempio di agente chiarificante è lo xilene, utilizzato per più cambi per un tempo totale di circa due-tre ore.

Infiltrazione: consiste nella rimozione dell'agente diafanizzante (xilene) e sua sostituzione con il mezzo di infiltrazione/inclusione liquido (paraffina). La paraffina è liquida a temperature elevate e solida a temperatura ambiente: nella sua forma liquida penetra nei tessuti trasformandoli in una massa omogenea.

Inclusione: al termine dell'infiltrazione la paraffina permea i tessuti. Per l'inclusione si abbassa la temperatura fino al raggiungimento della temperatura ambiente, in questo modo la paraffina solidifica e crea un supporto attorno e all'interno del prelievo, portando alla formazione di un blocchetto pronto al taglio.

Taglio: il taglio viene effettuato generalmente al microtomo, strumento utilizzato per la realizzazione di sezioni sottili (3-20  $\mu\text{m}$ ) da materiale biologico incluso in paraffina. È costituita da una lama molto affilata e un meccanismo di avvicinamento del blocchetto alla lama che può essere rotativo o a slitta. Le sezioni ottenute sono state raccolte e sottoposte a colorazione.

Colorazione: una volta reidratate le sezioni sono state colorate e disidratate mediante una serie di passaggi in etanolo a concentrazioni crescenti a cui ha fatto seguito la chiarificazione con xilene e, infine, l'applicazione del vetrino copri oggetto o di pellicole apposite.

La colorazione di routine che è stata effettuata per mettere in evidenza le strutture cellulari (nucleo e citoplasma) è la colorazione Ematossilina-Eosina (EE). Essa prevede una colorazione di base, una colorazione combinata successiva e l'uso di mordenti. L'ematossilina è un colorante basico naturale che ha una composizione in cristalli di color giallo-bruni, poco solubili in acqua, ma più solubili in alcool etilico. Non è un vero colorante in quanto manca di un gruppo cromoforo; il colorante vero e proprio è rappresentato dal suo prodotto di ossidazione (ottenuta naturalmente o indotta artificialmente), l'emateina. Tale ossidazione ha un vantaggio: può produrre un colorante immediatamente attivo. L'ematossilina diventa un ottimo colorante solo dopo la sua combinazione con un mordente che ne consente il legame ai tessuti. Il complesso così formato (ematossilina-mordente) agisce come colorante basico, colora i nuclei, ma anche fibre elastiche, collagene, striature muscolari etc. L'eccesso di colorante viene rimosso mediante differenziazione con l'utilizzo di un acido diluito. Viene alzato, successivamente, il pH con un trattamento alcalino per favorire la formazione di composti stabili che danno colore blu ai nuclei: in questo modo si apprezza meglio il contrasto con controcolorazioni citoplasmatiche.

La controcolorazione, che segue la colorazione con ematossilina, fornisce le informazioni supplementari e viene prevalentemente effettuata mediante l'uso di un colorante artificiale debolmente acido, l'eosina. L'eosina è solubile in acqua e in alcool, viene spesso usata in soluzione acquosa (0.3-1 %), apparendo di colore giallo-arancio. L'aggiunta di acido alla soluzione rende la stessa più rossa, migliorando, così, il contrasto con i nuclei. L'eosina colora i citoplasmici, il tessuto connettivo, gli eritrociti, in tonalità di rosa più o meno intense.

La formazione di depositi calcifici nei provini ex vivo è stata valutata nelle sezioni istologiche tramite colorazione con Alizarin Red e Calceina, come descritto nella sezione in vitro. Le sezioni istologiche sono state anche esaminate previa colorazione immunoistochimica per GFP, tramite anticorpo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, CA) marcato con fluoroforo CY5, seguendo il protocollo precedentemente descritto, per evidenziare la presenza di cellule placentari umane nelle sezioni istologiche. La controcolorazione è stata effettuata con DAPI.

L'RNA totale viene estratto dai tessuti previa polverizzazione degli stessi in corrente di azoto liquido con l'utilizzo di un mortaio e di pestello. I tessuti polverizzati venivano successivamente omogeneizzati con una soluzione di guanidina in fenolo utilizzando il reagente OMNIzol TM (Euroclone ltd. U.K.) e seguendo la procedura descritta nel rispettivo manuale d'uso. In breve a circa 100 mg di tessuto polverizzato si aggiunge 1 ml del reagente e successivamente una quantità di cloroformio pari a 1/10 del volume totale, agitando vigorosamente e si lasciano i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti. Le provette vengono quindi centrifugate a 12000g per 15 minuti, in questo modo otteniamo una separazione del lisato in tre fasi ben distinte, quella acquosa che contiene l'RNA totale, seguita da un'interfaccia lattiginosa con le proteine e parte del DNA ed una fase organica di colore giallo che contiene il rimanente DNA cellulare. La fase acquosa con l'RNA viene trasferita in nuove provette Eppendorf e l'RNA è successivamente precipitato aggiungendo un ugual volume di isopropanolo, incubando in ghiaccio per 15 minuti.

L'RNA viene raccolto centrifugando le provette a 12000g a 4°C per 15 minuti, e poi lavando il pellet raccolto con 1ml di etanolo 75% e centrifughiamo a 8000 g a 4°C per 15 minuti.

Il pellet così ottenuto viene disciolto in acqua "RNAsi free".

## Risultati

### Risultati dello studio in vitro

#### *Immunocitochimica e colorazioni*

Per verificare l' avvenuto differenziamento in senso osteogenico le cellule giunte al termine del periodo di trattamento sono state analizzate tramite immunocitochimica e colorazioni tessuto specifiche.

#### *Colorazione con Alizarin Red*

Con la colorazione in Alizarin Red, specifica per l'osso, si è voluto valutare se le cellule mesenchimali placentari sottoposte a differenziamento osteoblastico presentassero zone di accumulo di calcio.



Fig. 11 PLN17 controllo 1mg/ml Bio-Oss-Microscopia a contrasto di fase 20X O.M.

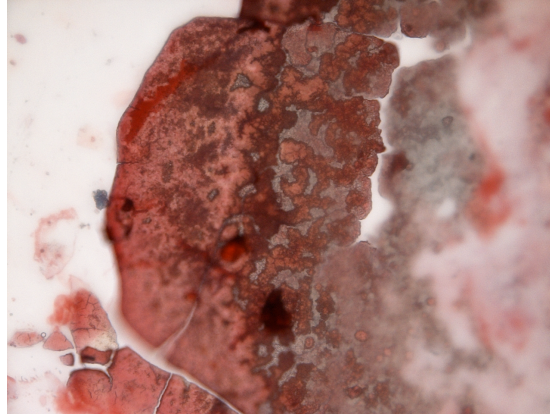


Fig. 12 PLN17 medium osteogenico, 1mg/mlBio-Oss –Microscopia a contrasto di fase 20X  
O:M:

Nelle cellule coltivate in medium di differenziamento in presenza di 1 mg/ml di Bio-Oss spongiosa si riscontra un evidente colorazione rossa che dimostra una neo-deposizione di calcio. Al contrario, nel controllo in cui le cellule sono state fatte crescere in un medium di mantenimento in presenza di 1 mg/ ml di Bio-Oss, non si osserva alcuna deposizione.

#### *Colorazione con calceina*

Durante l'ultima settimana di coltura è stata aggiunta la calceina alla concentrazione di 1 µg/ml sia nelle cellule in medium di differenziamento in presenza di Bio-Oss sia nelle cellule controllo. La fluoresceina va a chelare il calcio delle neodeposizioni e, se illuminata alla luce UV, produce una colorazione verde brillante. Questa colorazione risulta essere ben evidente nelle cellule poste in differenziamento e documenta la capacità di tali cellule di deporre calcio, componente fondamentale della matrice ossea. Al contrario nessun tipo di segnale è stato rilevato nel controllo.



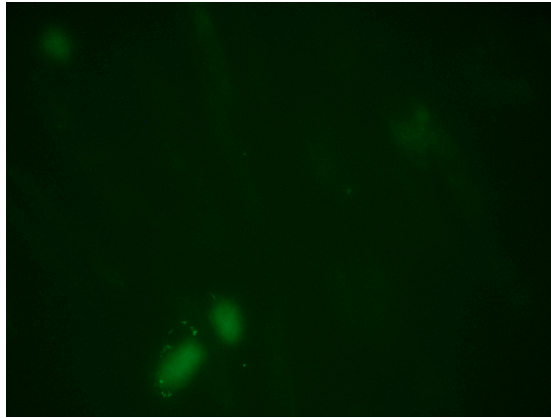


Fig. 13 PLN17 controllo; Microscopia a fluorescenza 1mg/ml Bio-Oss- 20X O.M.

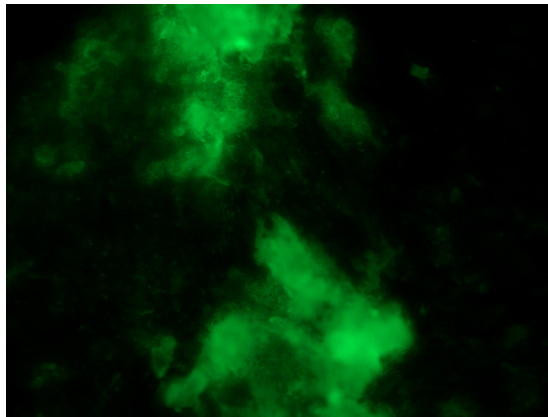


Fig. 14 PLN17 medium osteogenico; Microscopia a fluorescenza 1mg/ml Bio-Oss -20X  
O.M.

#### *Analisi immunocitochimica*

Per verificare l'avvenuto differenziamento in senso osteogenico abbiamo valutato la presenza o meno di collagene I utilizzando un anticorpo primario successivamente visualizzato tramite marcatura con anticorpo secondario coniugato con AMCA (7-amino-4-metilcumarina-3-acido acetico). Questo marcatore emette fluorescenza blu assorbendo ad una lunghezza d'onda di 345-347 nm ed emettendo a 425-444 nm.

È stata effettuata anche la colorazione dei nuclei attraverso l'uso di DAPI

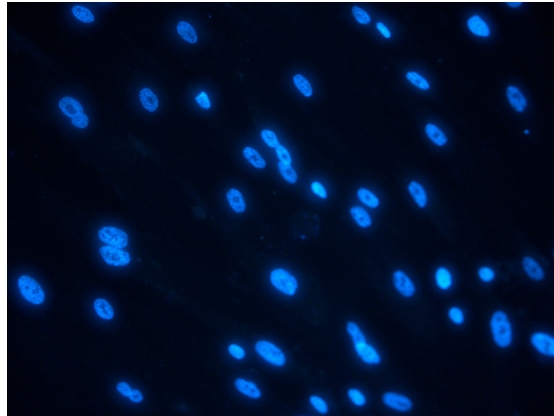


Fig. 15 PLN17 controllo; Microscopia a fluorescenza 1mg/ml Bio-Oss- 20X O.M.

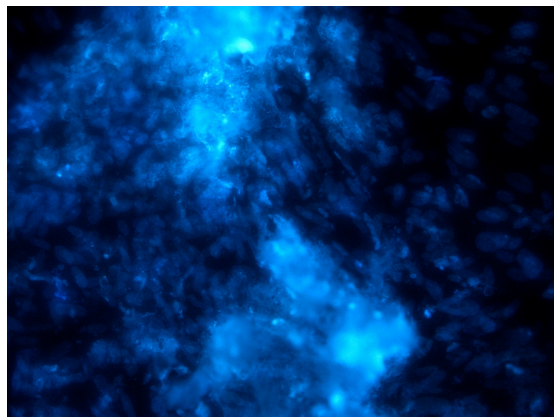


Fig. 16 Cellule PLN17 medium osteogenico; Microscopia a fluorescenza 1mg/ml Bio-Oss  
-20X O.M.

Nel controllo possiamo notare la presenza dei soli nuclei in blu delle cellule non differenziate: la marcatura con AMCA risulta essere assente. Nell'immagine in cui sono rappresentate le cellule in differenziamento possiamo identificare invece con assoluta chiarezza la colorazione blu tipica del fluoroforo che suggerisce una deposizione di collagene I. In secondo piano si intravedono i nuclei marcati con DAPI. La presenza dell'osteopontina ,quale segno di differenziamento osteoblastico, è stata rilevata attraverso l'uso di un anticorpo primario anti-osteopontina al quale è stato poi legato un anticorpo

secondario coniugato con rodamina che ha uno spettro di assorbimento a 498 nm e quello di emissione a 520 nm ed emette fluorescenza di colore rosso.

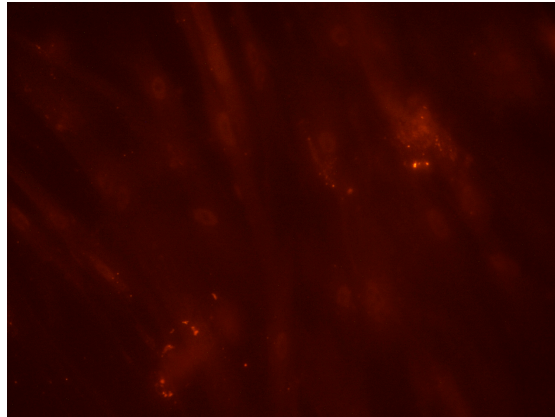


Fig. 17 PLN17 controllo; Microscopia a fluorescenza 1mg/ml Bio-Oss- 20X O.M.

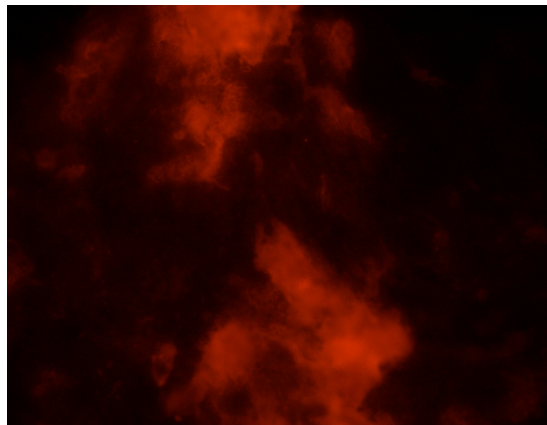


Fig.18 Cellule PLN17 medium osteogenico; Microscopia a fluorescenza 1mg/ml Bio-Oss  
-20X O.M

Dall'osservazione dell'immagine appare chiara la presenza di addensamenti di colore rosso che indicano la presenza della sialoproteina avvalorando l'ipotesi del differenziamento delle PLN17 in senso osteogenico. Anche in questo caso l'analoga colorazione sulle cellule di controllo non ha rivelato positività. Per verificare la colocalizzazione dei differenti markers analizzati nella matrice ossea, (grazie al

programma Photoshop) le immagini relative alle precedenti colorazioni (con DAPI, AMCA, calceina ed osteopontina) sono state sovrapposte.

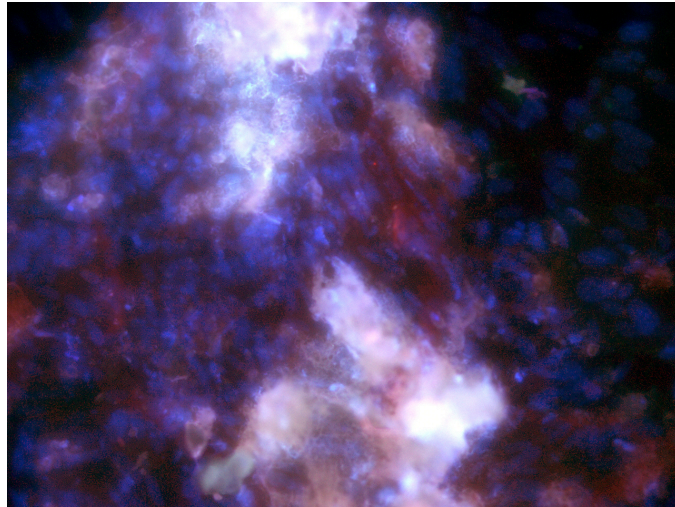


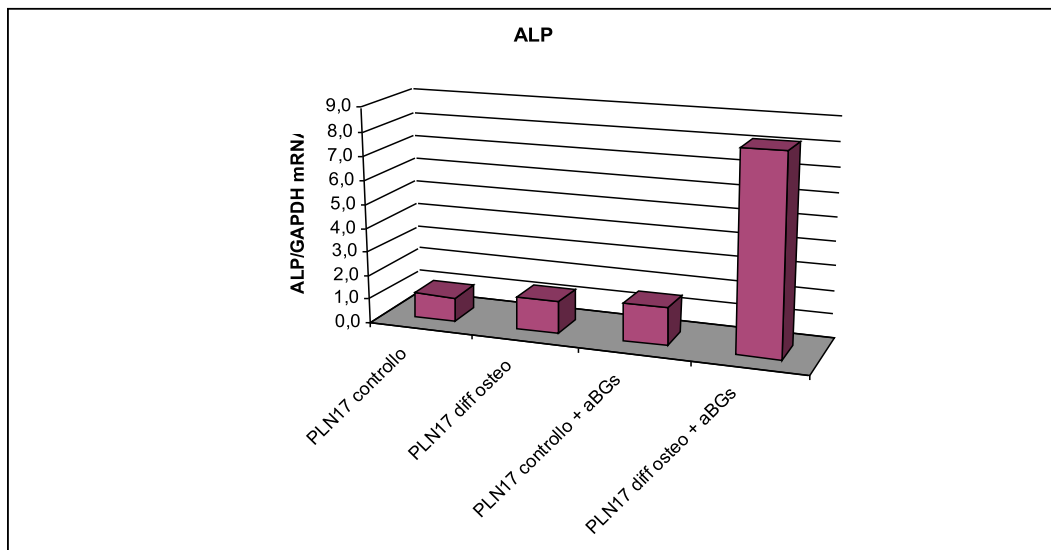
Fig. 19 Cellule PLN17 medium osteogenico; Microscopia a fluorescenza 1mg/ml Bio-Oss -20X O.M

Nell'immagine si evidenzia una zona di colore bianco, indice della presenza contemporanea di tutti i coloranti a conferma dell'ipotesi che la matrice ossea sia stata deposta in maniera strutturata.

#### *Analisi dell'espressione genica*

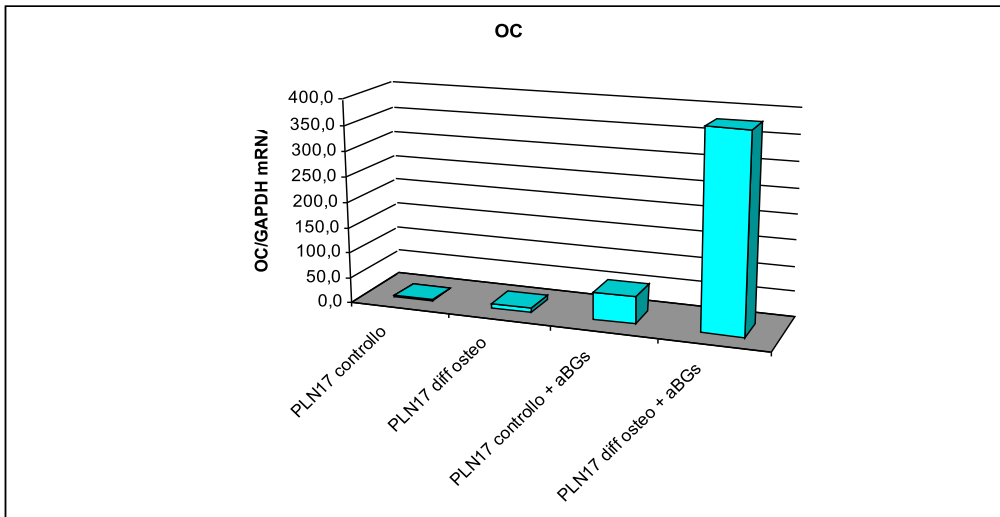
I risultati morfologici precedentemente discussi ottenuti dall'analisi citologica sono stati in seguito confermati con l'analisi dell'espressione genica dei markers ossei mediante RT-PCR. I geni analizzati sono stati i codificanti per fosfatasi alcalina (*ALP*), osteocalcina (*OC*), collagene di tipo I (*COL1A1*), osteonectina (*ON*), recettore della vitamina D (*VDR*), *RUNX2* e l'osteopontina (*SSPI*).

## Fosfatasi alcalina (ALP)



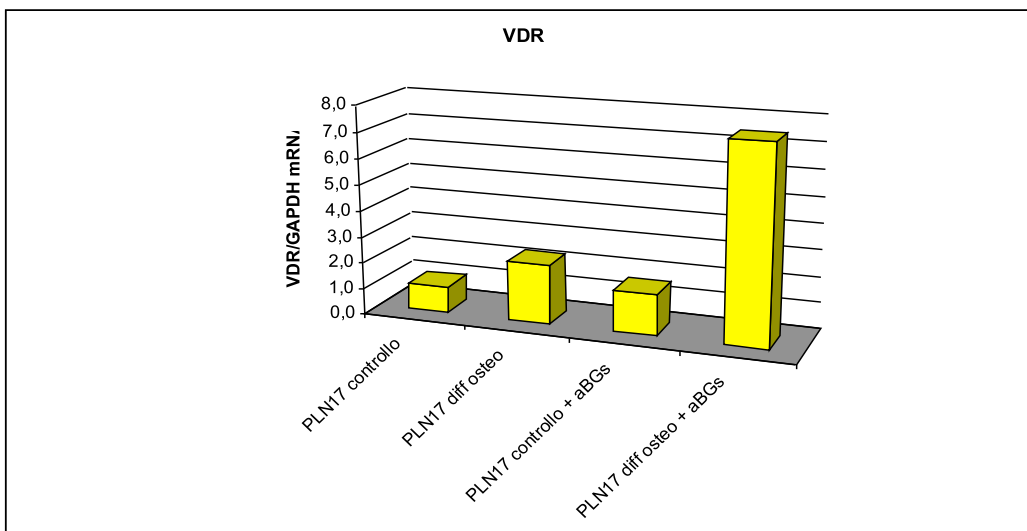
L'espressione genica di questa proteina nelle cellule poste in differenziamento in presenza di Bio-Oss è risultata essere fortemente superiore rispetto a quella ritrovata nelle altre condizioni di coltura, documentando il differenziamento per effetto combinato del medium differenziativo e del Bio-Oss spongiosa. Infatti, mentre le PLN17 coltivate in condizioni basali (PLN17 controllo) hanno mostrato un'espressione dell'RNA messaggero dopo correzione per lo House-keeping gene (ALP/GAPDH mRNA) analoga alle PLN17 coltivate in medium osteogenico (PLN17 diff osteo) e alle PLN17 coltivate su Bio-Oss con medium standard, le PLN17 coltivate in medium osteogenico in presenza di Bio-Oss hanno mostrato un significativo aumento dell'espressione del gene stesso.

## Osteocalcina (OC)



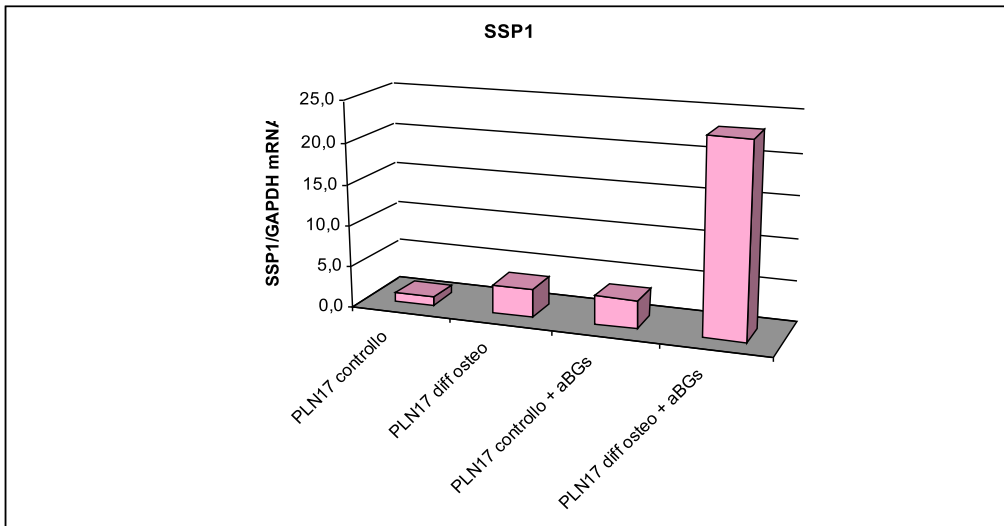
Come emerge dal grafico risulta evidente che l'espressione della proteina nelle cellule coltivate in medium di induzione aumenta significativamente, sebbene la presenza di Bio-Oss spongiosa determini un incremento decisamente maggiore dell'espressione di OC. Tali dati confermano il potere osteoinduttivo del biomateriale.

## Vitamin D Receptor (VDR)



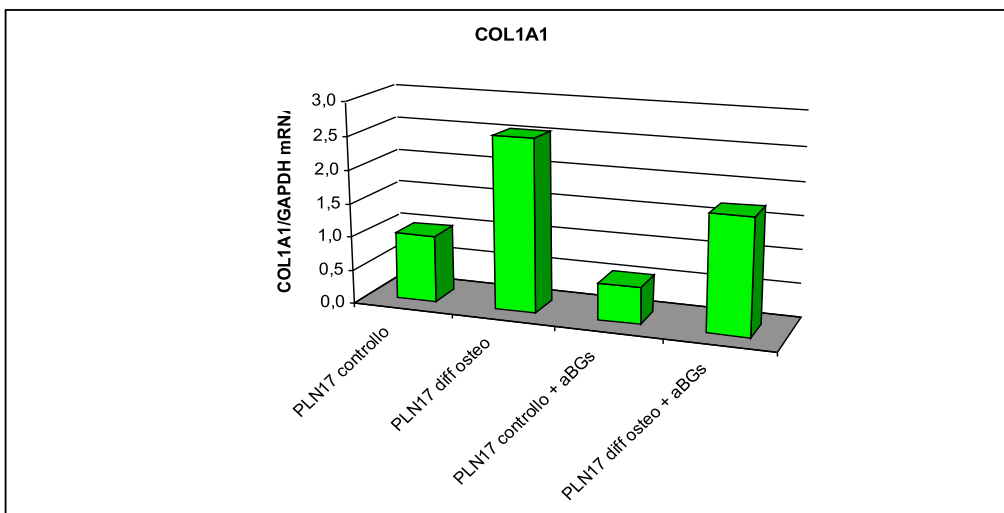
L'espressione del VDR ritrovata nelle cellule in differenziamento in presenza di Bio-Oss è esplicativa del fatto che tali cellule siano responsive alla presenza dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nel medium e che il Bio-Oss ne aumenti ulteriormente l'espressione.

## Osteopontina (SSP1)



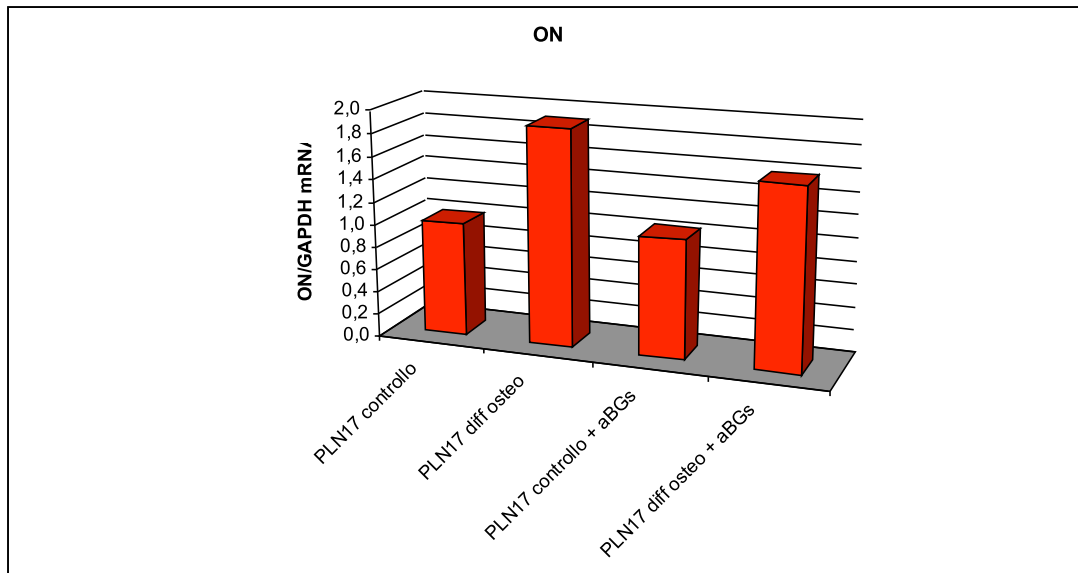
L'SSP1, marker funzionale dell'osso insieme al Collagene di tipo I, alla Fosfatasi Alcalina e all'Osteocalcina, risulta essere fortemente espresso nelle cellule in medium differenziativo in presenza di Bio-Oss confermando l'ipotesi dell'avvenuto differenziamento indotto da tale condizione.

## COL1A1



Dai risultati ottenuti sembra che l'aumento di espressione di questo gene, rilevato nelle cellule trattate, non sia riconducibile al Bio-Oss in quanto anche le cellule fatte crescere nel solo medium di differenziamento presentano alti valori del suddetto marker.

## Osteonectina (ON)



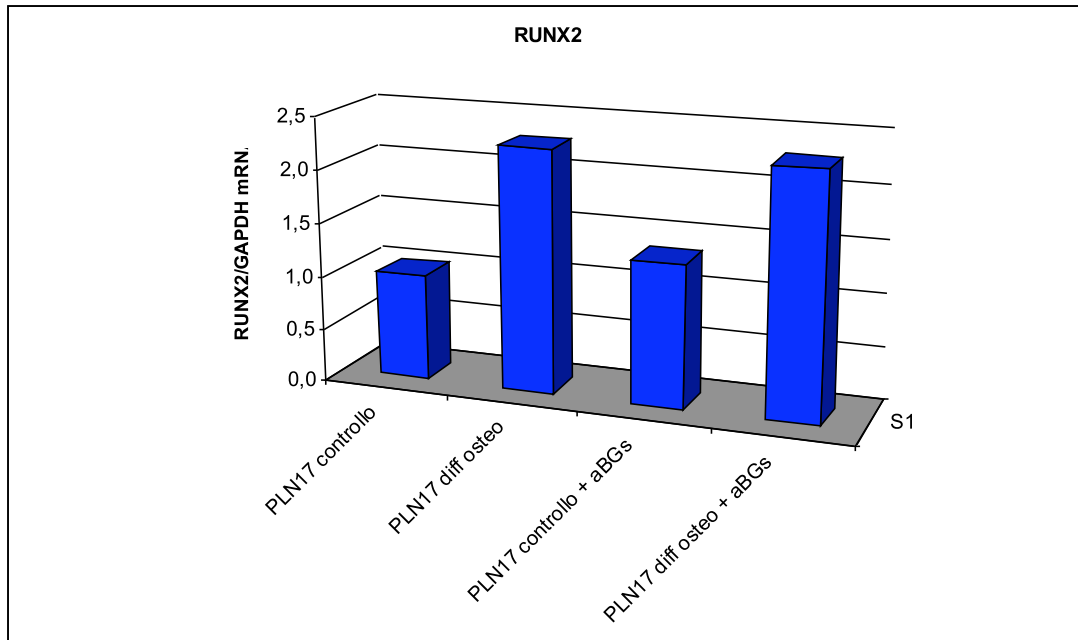
Anche in questo caso l'espressione di ON sembra non essere influenzata dalla presenza del Bio-Oss in quanto non risultano differenze significative tra le cellule coltivate in assenza o presenza di Bio-oss spongiosa.

Ciò suggerisce che l'incremento di espressione genica sia da attribuire al solo medium di differenziamento.

## RUNX 2

Runx 2 gioca un ruolo di fondamentale importanza nel commitment in senso osteogenico ed è necessario per la maturazione nel fenotipo ipertrofico dei condrociti. Runx2 attiva direttamente alcuni marcatori osteoblastici come il Collagene di tipo I, l'Osteopontina e l'Osteocalcina.





In linea con i risultati precedentemente discussi anche Runx 2, fattore di trascrizione di molti dei markers ossei, presenta espressione incrementata nelle cellule poste in coltura con medium di differenziamento indipendentemente dall'assenza o dalla presenza di Bio-Oss. Il Bio-Oss induce quindi l'espressione di alcuni geni osteogenici tipici, ma da solo non è in grado di incrementare l'espressione di COL1A1 e ON, impedendo la deposizione di una matrice osteoide organizzata.

## Risultati dello studio *in vivo*

### *Analisi istologica*

#### Tempo 0

I campioni di Bio-Oss inseriti nel difetto di ratto in assenza di cellule placentari a tempo 0 si presentano privi di infiltrato cellulare nelle trabecole di idrossiapatite.

Un coagulo ematico riempie gli spazi lacunari tra le spicole come evidenziato dalla colorazione Ematossilina-Eosina (Fig. 22).

I campioni caricati di cellule placentari sono stati processati con colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-GFP (Fig. 20) e CY5 (Fig. 21) per evidenziare la presenza della proteina espressa dai lentivirus e distinguere le cellule dell'ospite da quelle impiantate. E' evidente un segnale di positività lungo le trabecole di idrossiapatite, ad indicare una localizzazione delle cellule placentari sullo scaffold. Alla colorazione DAPI le immagini dello scaffold caricato con cellule (Fig. 23) e di quello di controllo (Fig. 24) non presentano differenze sostanziali.

E' da segnalare che la procedura di decalcificazione ha reso il campione capace di reagire con il DAPI, rendendo di fatto indistinguibili i nuclei delle cellule.

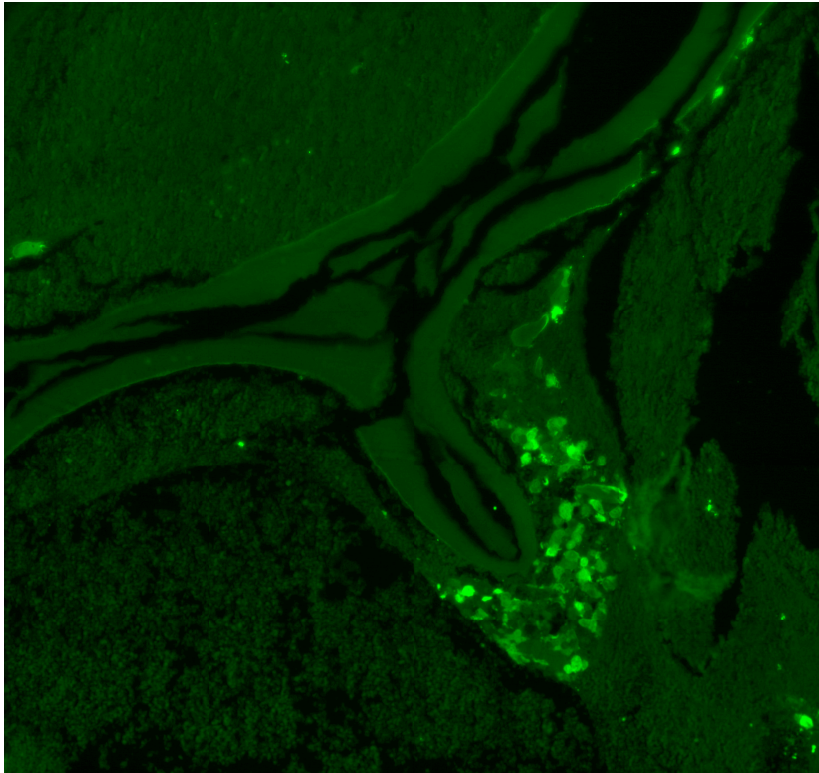


Fig.20 Lo scaffold caricato con cellule placentari esprimenti GFP



Fig.21 Il provino test alla colorazione con CY5 su DAPI

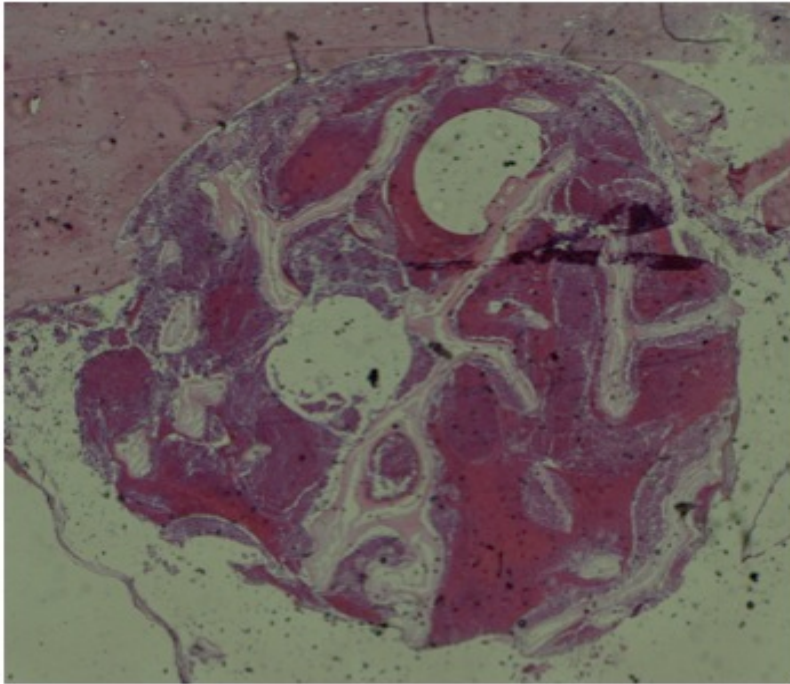


Fig. 22 Il provino test alla colorazione con Ematossilina e Eosina

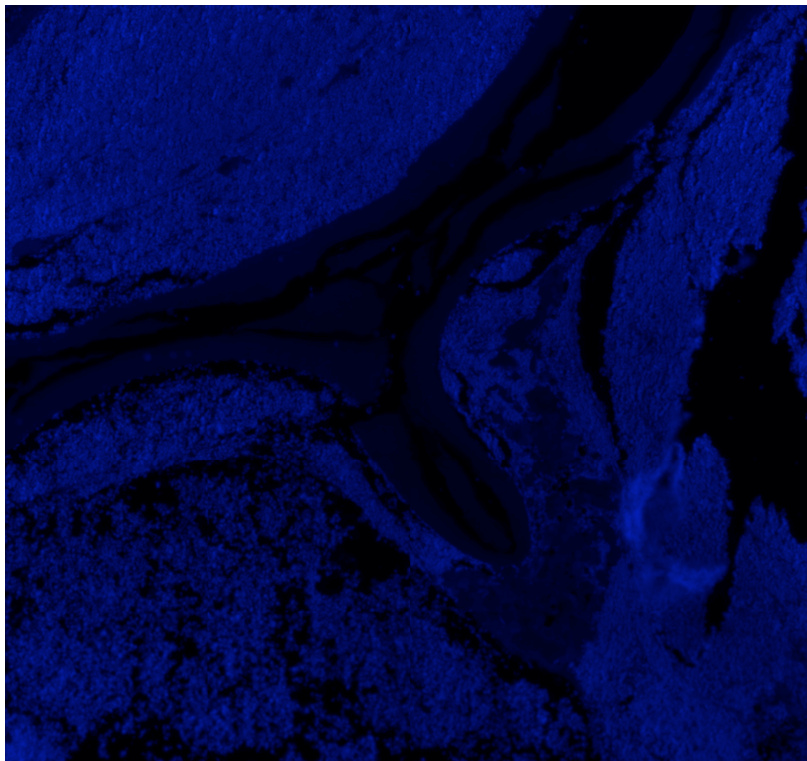


Fig. 23 Provino test alla colorazione con DAPI

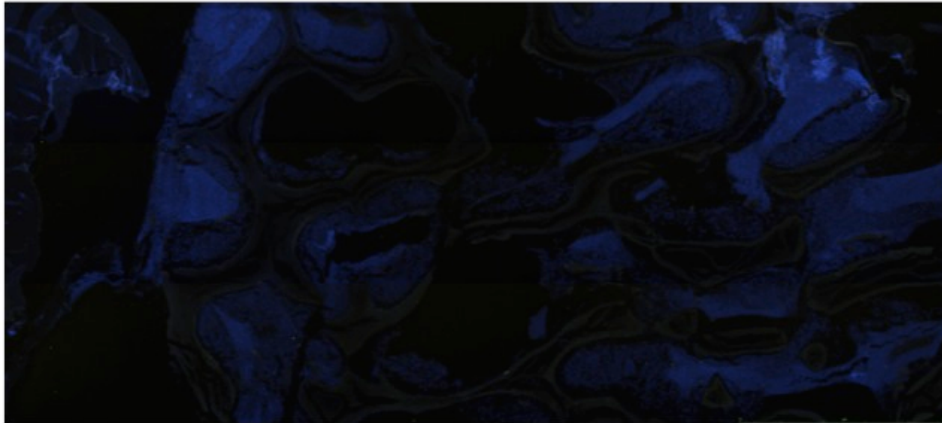


Fig. 24 Provino controllo senza cellule placentari alla colorazione con DAPI

### 30 Giorni

Dopo 30 giorni, la colorazione E-E mostra come, in assenza di cellule placentari, il coagulo ematico si sia organizzato negli spazi tra le trabecole del biomateriale in un tessuto connettivo lasso. La guarigione è avvenuta senza incidenti, in assenza di un importante processo infiammatorio. Nei campioni caricati con cellule placentari, invece, le cellule umane si sono replicate lungo le trabecole dello scaffold e nelle porosità dell'idrossiapatite, come visibile alla colorazione con anticorpi anti-GFP. Non sono visibili cellule placentari nel tessuto connettivo circostante, popolato solo di cellule dell'ospite come evidente dal confronto tra la colorazione al DAPI e quella per GFP. Considerata la tridimensionalità dello scaffold, è lecito ipotizzare che le cellule placentari abbiano invaso la matrice di Bio-Oss e in parte si siano sostituiti alla componente minerale dell'impianto, suggerendo una parziale riabitazione dell'impianto stesso.

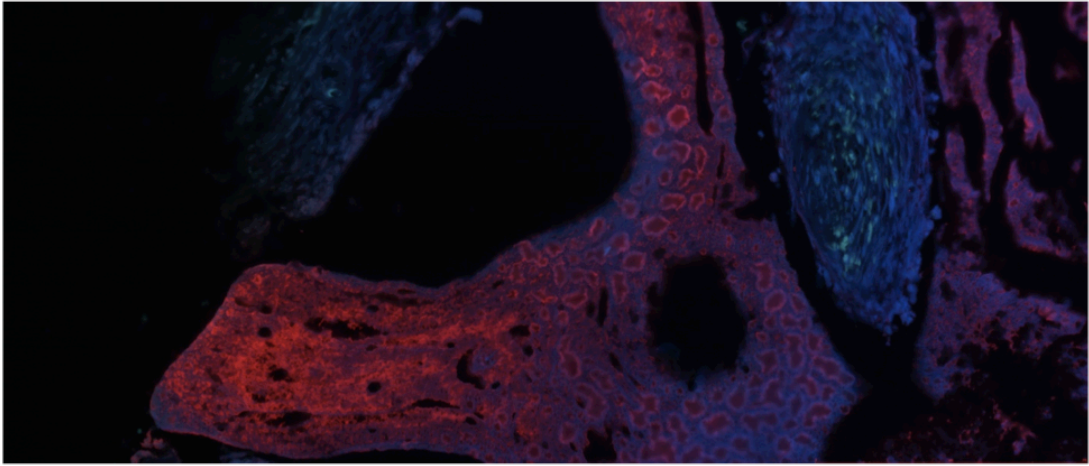


Fig. 25 Bio-Oss coperto da cellule placentari (alla fluorescenza rossa con CY5). Nella parte destra dell'immagine è presente un agglomerato di cellule murine tra gli spazi dello scaffold

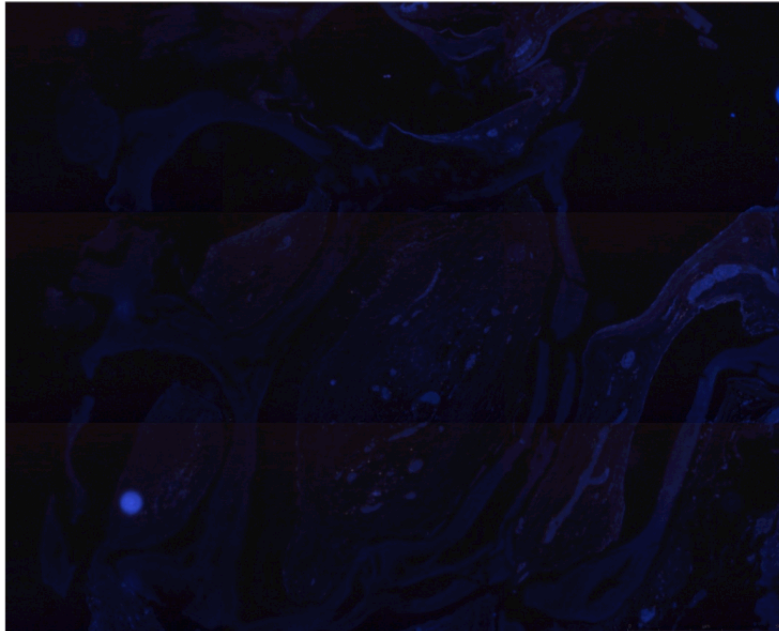


Fig. 26 Lo scaffold di controllo alla colorazione con DAPI

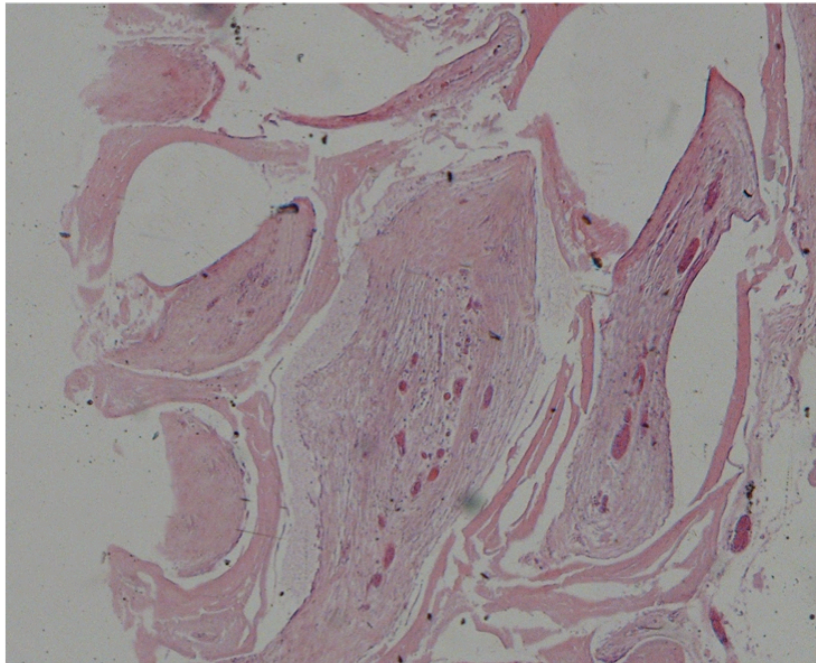


Fig. 27 Lo scaffold di controllo alla colorazione con Ematossilina e Eosina

60 Giorni

Nei provini test, sono presenti aree fortemente positive alla colorazione con anticorpi anti-GFP, che mostrano una crescita delle cellule placentari rispetto ai campioni a 30 giorni. Anche a questo time point, le cellule umane sono limitate alle superfici dello scaffold e non hanno colonizzato gli spazi tra le trabecole.

Alla colorazione con Ematossilina-Eosina, il connettivo intertrabecolare non presenta segni di infiltrato infiammatorio.

AL momento della stesura della presente tesi, non sono ancora disponibili i risultati della PCR Real Time.

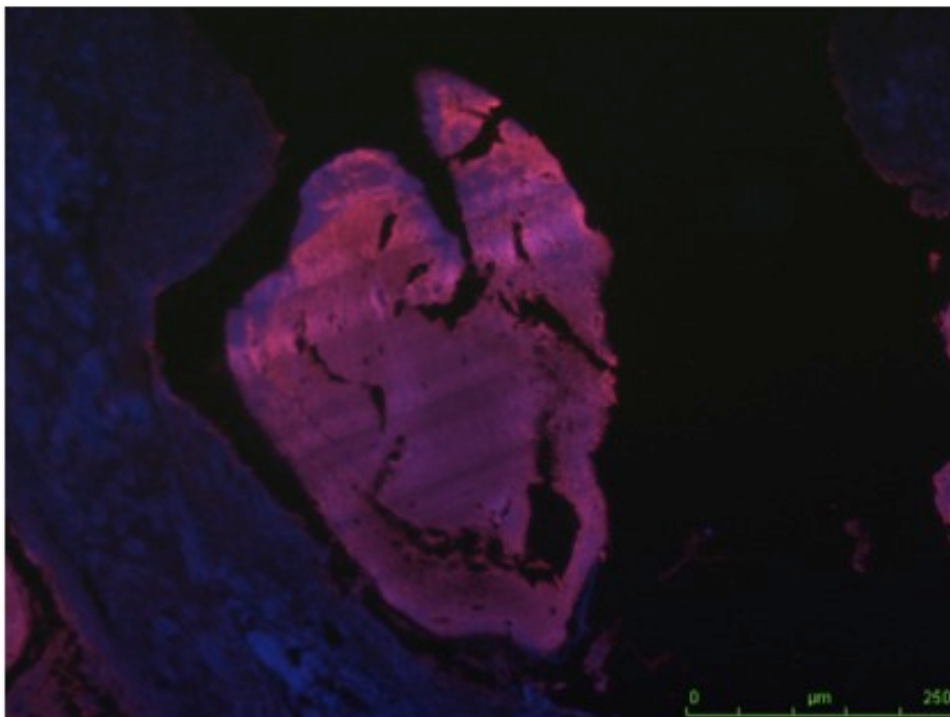


Fig. 28 Lo scaffold test alla colorazione con CY5 e DAPI a 60 giorni

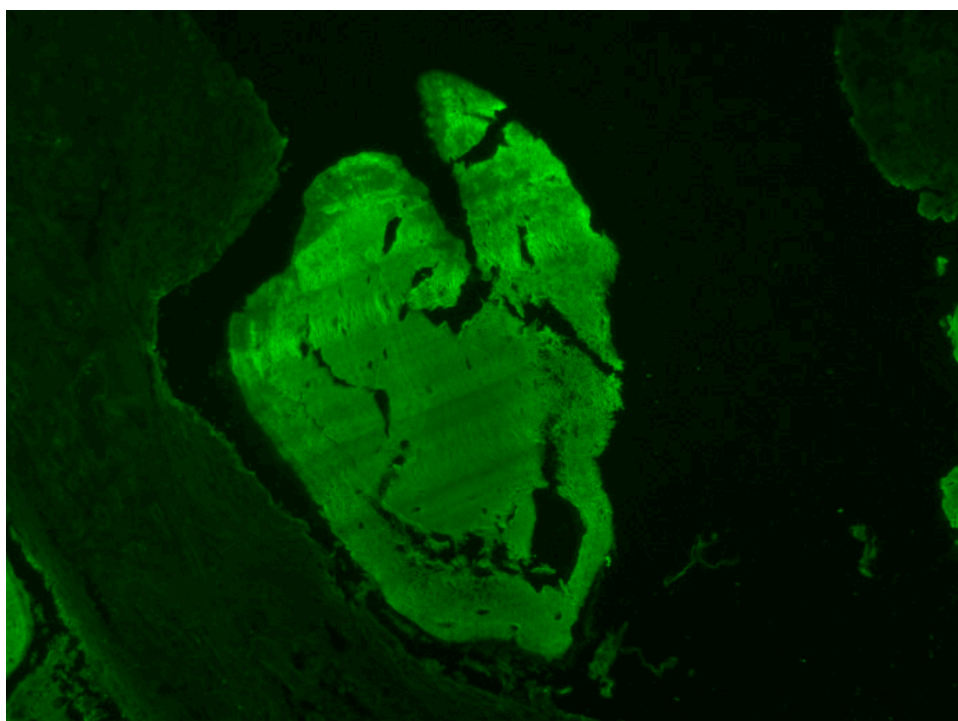


Fig. 30 Lo scaffold caricato con le cellule placentari alla colorazione per GFP



## Discussione

L'ingegneria tissutale può essere definita come “una branca interdisciplinare nella quale i principi dell'ingegneria e delle scienze vitali hanno come obiettivo lo sviluppo di sostituti biologici che riparinano, mantengano o migliorino le funzioni di un tessuto o di un intero organo”<sup>132</sup>.

L'approccio terapeutico rigenerativo costituisce l'evoluzione naturale della terapia delle patologie, in particolar modo delle patologie di interesse chirurgico, poichè mira alla restituzione *ad integrum* del tessuto danneggiato tramite un nuovo tessuto in tutto e per tutto analogo a quello perso.

Questo obiettivo pone naturalmente dei problemi importanti, poichè le capacità rigenerative intrinseche all'organismo presentano importanti limiti e varie soluzioni tecniche, che sfruttino le scoperte e le conoscenze delle più disparate branche della scienza, devono essere necessariamente impiegate per superare i confini talora angusti che la natura ha posto alla guarigione.

La ricostruzione in vitro di un tessuto organico come l'osso rappresenta in particolare una delle sfide più ardue e affascinanti nel campo della ricerca scientifica, poichè il tessuto osseo non si limita ad assolvere ad una funzione estetica, o metabolica, o strutturale, ma somma in se' funzionalità e compiti non altrimenti efficacemente vicariabili.

Il tessuto osseo è un tessuto estremamente complesso, a lento turnover, caratterizzato da molti compartimenti funzionali e la cui biologia inizia solo oggi ad essere elucidata in modo lontanamente soddisfacente.

Negli ultimi anni l'uso di cellule progenitrici, staminali, sembra poter offrire potenzialità prima insperate per la rigenerazione tissutale.

Le cellule staminali, protagoniste di una nuova era scientifica, sono considerate le nuove “armi” della medicina rigenerativa, armi così potenti che il loro potenziale, anche distruttivo, non è ancora completamente sotto controllo.

Esse rappresentano strumenti efficacissimi impiegati per facilitare la riparazione di organi e per curare in modo definitivo diverse malattie, poichè le cellule staminali possiedono caratteristiche uniche: le cellule staminali, in quanto tali, sono cellule indifferenziate che conservano un potenziale differenziativo 1) verso tutti i tessuti dell'organismo, e vengono allora definite totipotenti, o 2) verso una molteplicità di tessuti, e prendono allora il nome di multipotenti.

Le uniche cellule totipotenti conosciute sono quelle embrionali, nelle primissime fasi dello sviluppo, fino allo stadio di morula a 4 o 8 cellule, mentre la maggior parte delle cellule cosiddette staminali ricavate da feti o organismi adulti presentano solo limitate capacità differenziative.

Inoltre le cellule staminali sono caratterizzate da una replicazione mitotica definita asimmetrica, in cui tipicamente una delle due cellule figlie risultanti dalla citodieresi si differenzia, acquisendo caratteri tipici di un tessuto, ma perdendo progressivamente in capacità proliferativa, mentre la seconda cellula figlia mantiene caratteri di staminalità e rimane indifferenziata, evitando così di depletare il pool di cellule staminali tissutali.

Come dimostrano gli studi degli ultimi anni, le cellule staminali sono presenti in quasi tutti i tessuti, persino in tessuti tradizionalmente considerati privi di capacità rigenerative, come quello nervoso e, nell'ambito rigenerativo osseo, l'attenzione della ricerca si è primariamente rivolta verso le cellule staminali mesenchimali, un gruppo di cellule in grado di differenziarsi in cellule della linea ossea, cartilaginea, adiposa o muscolare, e normalmente presenti, in piccole quantità in questi tessuti, anche allo stato adulto.

Una volta isolate possono essere indotte ad espandere e differenziare nei normali contenitori e supporti per colture cellulari o su scaffold che presentino caratteristiche tali da guidare la crescita, la deposizione di matrice extracellulare ed il differenziamento verso un fenotipo prestabilito, anche in concomitanza con l'uso di fattori bioattivi.

Successivamente, le cellule così amplificate e sviluppate potrebbero essere usate per trapianti cellulari, terapie geniche e per la creazione di organi bio-artificiali in sostituzione di tessuti persi ma anche in caso di malattie degenerative come patologie ematologiche, cardiovascolari, ortopediche, neurologiche e gastrointestinali, associate per esempio alla perdita di funzione delle cellule staminali adulte.

Recentemente, molti gruppi di ricerca hanno diretto la loro attenzione verso le cellule staminali mesenchimali di annessi embrionali come la placenta, per la loro elevata biodisponibilità. Questo studio è stato eseguito per valutare le capacità differenziative in senso osteogenico di cellule placentari umane e di valutare, in via preliminare, la loro utilizzabilità per il trattamento di difetti ossei critici nella calvaria di ratto.

Questo modello presenta alcuni vantaggi rispetto ai difetti ossei nella diafisi delle ossa lunghe. Innanzitutto consente di creare in modo semplice un difetto di dimensione ben controllabile e che non guarisca in modo spontaneo.

Qualsiasi risultato venga reperito è riconducibile quindi alle proprietà del campione testato. Inoltre le caratteristiche istologiche del tessuto di calvaria sono quelle di un tessuto corticale con una diploe trabecolare marcata e l'origine embrionale, di tipo intermembranoso, presenta delle analogie con i tessuti mascellari, a differenza delle ossa lunghe che presentano una ossificazione endocondrale.

La calvaria poi non è sottoposta a carico meccanico, permettendo di distinguere quindi effetti biologici da quelli più propriamente meccanici che possono intervenire come fattore confondente nelle ossa lunghe. Come scaffold è stato utilizzato dell'idrossiapatite naturale, di origine bovina, porosa, commercialmente utilizzata nella pratica clinica. Questo scaffold quindi mima una situazione clinicamente riscontrabile, oltre a fornire un microambiente osteogenico che possa riprodurre la matrice extracellulare ossea, guidare le cellule placentari nella crescita e costituire un'impalcatura di inizio rigenerazione per il tessuto neoformato. Come abbiamo precedentemente dimostrato le cellule placentari che abbiamo studiato mostrano un notevole potenziale proliferativo e differenziativo.

Sono in grado in vitro di produrre noduli calcifici, una proprietà tipica delle cellule ossee, oltre a presentare un profilo di espressione genica che permette di collocarle lungo la linea osteoblastica. In particolar modo queste cellule sembrano rispondere in modo molto sensibile all'uso di medium di coltura osteogenico e alla presenza dello scaffold di idrossiapatite, che inducono l'espressione di elevati livelli di fosfatasi alcalina, osteocalcina, osteopontina e vitamin D receptor.

Questi risultati sottolineano anche le proprietà osteoinducenti dello scaffold scelto, che sembra in grado, in presenza di un adeguato microambiente extracellulare di orientare potentemente il fenotipo di cellule progenitrici verso la linea osteoblastica. Del resto un'interazione preferenziale tra la popolazione di cellule staminali placentari testate e lo scaffold di idrossiapatite viene sottolineato con forma anche dai risultati in vivo.

In seguito ad impianto dello scaffold nella calvaria di ratto gli spazi lacunari tra le trabecole di scaffold vengono colmati da un coagulo ematico che si riorganizza progressivamente e viene ampiamente colonizzato dalle cellule dell'organismo ospite. Le cellule umane comunque, caricate sullo scaffold prima del suo inserimento, ne colonizzano le porosità proliferando attivamente, ma non vengono riscontrate nel connettivo tra le trabecole.

Che non vi siano impedimenti meccanici che trattengano le cellule sullo scaffold viene provato dal reperimento (dato non riportato) di alcune cellule nella milza di uno dei ratti usati per l'esperimento pilota.

Tali cellule non sembravano aver dato origine a formazioni neoplastiche, e le caratteristiche fenotipiche non sono state ancora adeguatamente definite. La loro presenza sembra però indicare la presenza di meccanismi di homing preferenziale, che, nel caso della calvaria, viene espletato verso lo scaffold.

Questa concentrazione di cellule impiantate sullo scaffold e all'interfaccia può chiaramente costituire un vantaggio in termini delle capacità rigenerative di queste cellule, in quanto la deposizione di tessuto avviene proprio all'interfaccia tra il tessuto ospite e il biomateriale.

Un elemento di estrema rilevanza per l'utilizzo biomedicale di queste cellule comunque è l'assenza, anche a tempi prolungati, di infiltrato infiammatorio nello o intorno allo scaffold.

L'elevata tollerabilità delle cellule staminali mesenchimali di origine placentare ha importanti ricadute applicative, poichè potenzialmente consente l'utilizzo di cellule omologhe, una prospettiva impraticabile con cellule adulte, in grado di elicitare una sostenuta risposta immunitaria.

Questa proprietà viene attualmente sfruttata per la terapia delle ustioni, delle ulcere cutanee e per la ricostruzione della superficie oculare, laddove le membrane amniotiche vengono abitualmente impiegate per facilitare la guarigione tissutale, con notevole successo e senza eventi avversi. E' noto che cellule placentari esprimono elevati livelli di HLA-G, un antigene non polimorfico di classe IB, anche in forma solubile.

Questa molecola sopprime i linfociti CD8 attivati ed inibisce la proliferazione di linfociti CD4 citotossici, oltre a modulare la funzionalità di cellule Natural Killer<sup>133</sup>.

Un dato di estremo interesse, che si evince dai risultati presentati in questa ricerca, è che il mascheramento immunitario di queste cellule non è attivo solamente nelle prime fasi successive all'isolamento, ma si mantiene anche durante il differenziamento cellulare, a 30 e 60 giorni dopo l'impianto, nonostante sia stato riportato in letteratura che cellule placentari, dopo differenziamento in epatociti e cellule pancreatiche esprimono HLA di classe IA e in minor percentuale HLA di classe II<sup>134</sup>.

Questo prolungato mantenimento della tollerabilità immunitaria può essere spiegato attraverso un meccanismo adattativo da parte del microambiente cellulare, o attraverso un'attiva soppressione dei cloni linfocitari reattivi dell'organismo ospite da parte delle cellule impiantate attraverso i meccanismi sopracitati. Inoltre altri autori hanno riportato capacità anti-infiammatorie di cellule mesenchimali placentari, mediate dalla secrezione di Migration Inhibitory Factor, un soppressore della chemotassi<sup>135 136</sup>, e dalla inibizione di IL1a e IL1b.

Le cellule placentari inoltre secernono diversi fattori anti-infiammatori che riducono la presenza di antigen presenting cells<sup>137</sup>, l'apoptosi<sup>138, 139</sup>, migliorano la guarigione delle ferite e la proliferazione cellulare<sup>84</sup>.

L'estrema capacità proliferativa e differenziativa delle cellule staminali di origine embrionale pone inoltre dei problemi di sicurezza anche per quanto riguarda il loro potenziale oncogenico, per la possibilità di insorgenza di teratomi, tumori caratterizzati dalla presenza di disparati tessuti differenziati. Le cellule placentari utilizzate in questo studio comunque sono state preventivamente impiantate in topi SCID (Severe Combined Immuno Deficiency), privi di sistema immunitario attivamente funzionante: le cellule di controllo, una linea cellulare murina mesenchimale di origine tumorale hanno dato luogo all'insorgenza di neoplasie già dopo 15 giorni dal loro impianto, mentre i topi che hanno ricevuto le cellule placentari non hanno mostrato patologie anche dopo 3 mesi dall'impianto, quando sono stati sacrificati (dati non riportati).

Questo indica con ancora maggior forza come l'utilizzo di queste cellule possa presentare indubbi vantaggi in termini di sicurezza rispetto ad altre fonti di cellule staminali, e soprattutto non ponga problematiche etiche, poichè la loro provenienza è da un annesso fetale, la placenta, che non rientra nella costituzione dell'individuo adulto, che verrebbe comunque scartato, e che viene già usato dall'industria farmaceutica e cosmetica sotto forma di estratto. In un recente studio analogo, Zhang et al. hanno dimostrato che l'uso di scaffold di TCP caricato con cellule midollari fetali migliora la guarigione di difetti critici nel femore di ratto, in maniera analoga a quanto da noi osservato in calvaria.

E' necessario notare comunque che l'uso di cellule midollari di feto umano, oltre a porre evidenti problemi etici, ha richiesto, a differenza di quanto avvenuto nella presente sperimentazione, l'immunosoppressione tramite ciclosporina. Inoltre gli autori hanno osservato una progressiva riduzione del numero di cellule umane impiantate, fino alla loro completa scomparsa dopo 4 settimane per possibili fenomeni necrotici. Al contrario, gli esami immunostochimici ci hanno permesso di evidenziare l'assenza di fenomeni infiammatori o necrotici e la sopravvivenza persistente delle cellule placentari a 60 giorni. Inoltre la disponibilità di questo tessuto permette l'estrazione di buoni quantitativi di cellule e ne contiene notevolmente i costi produttivi.

Sommando queste considerazioni quindi, le cellule staminali mesenchimali di origine placentare sembrano rappresentare una via di estremo interesse nell'ingegneria tissutale, da esplorare accuratamente, per gli indubbi vantaggi che esse possiedono. All'entusiasmo di fronte a questi risultati preliminari così positivi deve tuttavia fare da controparte una lucida valutazione dei costi biologici e dei rischi che questo approccio terapeutico alberga. A ciò si sommano le restrizioni legislative che esitano da un vuoto giuridico che in questo campo medico ancora in fase embrionale stenta a trovare una risoluzione.

Di fronte alla obbligatoria cautela nell'uso di cellule omologhe multipotenti allora, è doveroso contemplare e valutare soluzioni terapeutiche alternative, che si avvantaggino della versatilità delle caratteristiche metaboliche delle cellule esaminate ma che evitino, per esempio, l'impianto di cellule vitali nell'organismo.

Tale per esempio sarebbe la coltura di queste cellule su scaffold analoghi a quello testato, o customizzati per questo utilizzo specifico, al fine di permettere la deposizione da parte delle cellule placentari di una abbondante matrice extracellulare biomimetica, ricca non solo delle proteine strutturali collgeniche e non, proprie del tessuto osseo, ma anche di quei fattori di crescita come FGF, PDGF e TGF $\beta$  che vengono secreti dalle cellule mesenchimali e sono sequestrati nella matrice.

Uno dei grandi limiti infatti dell'uso di fattori bioattivi e di fattori di crescita è la difficoltà di un drug delivery paragonabile a quello naturale, che eviti i picchi di somministrazione che sono tipici dei boli dei farmaci e che sono poco utili per esercitare una funzione così delicata come quella dei fattori di crescita

La presenza invece di molecole bioattive all'interno della matrice che possano essere gradualmente rilasciate o che agiscano in modo specifico sulle cellule mesenchimali aderenti potrebbe rappresentare una svolta nell'uso di questa classe di molecole. Inoltre, una matrice extracellulare veramente biomimetica, come quella depositata dalle cellule staminali mesenchimali offrirebbe un array di molecole di adesione non riscontrabile negli scaffold attualmente in commercio, con un notevole aumento di biocompatibilità e bioattività.

Questo approccio alternativo cell-based ma cell-free all'atto dell'utilizzo clinico rappresenta un'ulteriore direzione di sviluppo che la ricerca preliminare qui presentata renderà possibile e che potrebbe fornire risultati di notevole interesse in un futuro non lontano.



## Bibliografia

1. Branemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials* 1983;4:25-28.
2. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977;16:1-132.
3. Evans MJ. Potential for genetic manipulation of mammals. *Mol Biol Med* 1989;6:557-565.
4. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-7638.
5. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-687.
6. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2003;58:278-291.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
8. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000;6:88-95.
9. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998;353:831-837.
10. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11879-11883.
11. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994;123:213-257.

12. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-776.
13. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-222.
14. Alison M. Hepatic stem cells. *Transplant Proc* 2002;34:2702-2705.
15. Bussolati B, Bruno S, Grange C, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005;166:545-555.
16. Al-Awqati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney. *Kidney Int* 2002;61:387-395.
17. Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002;197:492-509.
18. Tete S, Mastrangelo F, Carone L, et al. Morphostructural analysis of human follicular stem cells on highly porous bone hydroxyapatite scaffold. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007;20:819-826.
19. Bernex F, De Sepulveda P, Kress C, Elbaz C, Delouis C, Panthier JJ. Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development* 1996;122:3023-3033.
20. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95:911-921.
21. Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 2006;127:1137-1150.
22. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997;90:1345-1364.
23. Sun L, Lee J, Fine HA. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest* 2004;113:1364-1374.
24. van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem-cell antigen *Sca-1* is a member of the *Ly-6* antigen family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:4634-4638.

25. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. *In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. Blood* 1992;80:3044-3050.
26. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. *Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. J Biol Chem* 2004;279:11384-11391.
27. Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, et al. *Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. J Cell Biol* 2000;150:1085-1100.
28. Caplan AI. *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol* 2007;213:341-347.
29. Tortelli F, Cancedda R. *Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage in vitro. Eur Cell Mater* 2009;17:1-14.
30. Rao MS, Mattson MP. *Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mech Ageing Dev* 2001;122:713-734.
31. Evangelista M, Soncini M, Parolini O. *Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? Cytotechnology* 2008;58:33-42.
32. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. *Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. Stem Cells* 2008;26:300-311.
33. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. *Implantation and the survival of early pregnancy. N Engl J Med* 2001;345:1400-1408.
34. Loke YW, King A, Burrows TD. *Decidua in human implantation. Hum Reprod* 1995;10 Suppl 2:14-21.
35. Cross JC, Baczyk D, Dobric N, et al. *Genes, development and evolution of the placenta. Placenta* 2003;24:123-130.
36. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy* 2006;8:315-317.

37. Yamashita Y, Hooker SW, Jiang H, et al. CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;28:2981-2990.
38. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, et al. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004;95:814-821.
39. Strohmeier GR, Lencer WI, Patapoff TW, et al. Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J Clin Invest* 1997;99:2588-2601.
40. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110:1225-1232.
41. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 2006;177:6780-6786.
42. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-1265.
43. Haruta Y, Seon BK. Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:7898-7902.
44. Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, Bernabeu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* 1994;301 ( Pt 3): 765-768.
45. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995;1:1623-1634.
46. Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, et al. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res* 2000;6:2037-2043.

47. Graulich W, Nettelbeck DM, Fischer D, Kissel T, Muller R. Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene* 1999;227:55-62.
48. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, et al. Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 2002;100:4001-4010.
49. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, et al. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 2001;188:1-7.
50. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene* 2003;22:6557-6563.
51. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:19027-19030.
52. Lastres P, Letamendia A, Zhang H, et al. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 1996;133:1109-1121.
53. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999;274:584-594.
54. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003;98:257-265.
55. Letamendia A, Lastres P, Botella LM, et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998;273:33011-33019.
56. Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 2002;277:29197-29209.

57. Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Langa C, et al. Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:36-44.
58. Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, et al. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1999;78:614-623.
59. Botella LM, Sanz-Rodriguez F, Sanchez-Elsner T, et al. Lumican is down-regulated in cells expressing endoglin. Evidence for an inverse correlation between Endoglin and Lumican expression. *Matrix Biol* 2004;22:561-572.
60. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22:1338-1345.
61. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:664-673.
62. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007;13:1173-1183.
63. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:296-305.
64. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003;12:545-552.
65. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 2007;7:11-11.
66. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005;79:528-535.

67. Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S. Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter. *Biochem J* 1994;303 ( Pt 1):255-262.
68. Prince CW, Oosawa T, Butler WT, et al. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem* 1987;262:2900-2907.
69. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993;7:1475-1482.
70. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000;19:615-622.
71. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8819-8823.
72. Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, et al. Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 1991;266:20369-20374.
73. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 1999;59:219-226.
74. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van de Water L. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell* 1994;5:565-574.
75. Smith LL, Cheung HK, Ling LE, et al. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J Biol Chem* 1996;271:28485-28491.
76. Bayless KJ, Davis GE. Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem* 2001;276:13483-13489.

77. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 1999;162:1024-1031.
78. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650-1659.
79. Chung UI, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 2001;107:295-304.
80. Hall BK. Intracellular and extracellular control of the differentiation of cartilage and bone. *Histochem J* 1981;13:599-614.
81. Wezeman FH. Morphological foundations of precartilag development in mesenchyme. *Microsc Res Tech* 1998;43:91-101.
82. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 2004;18:980-982.
83. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423:349-355.
84. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 1999;13:3037-3051.
85. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-1815.
86. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513-520.
87. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999;87:57-66.
88. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88:873-884.



89. Einhorn TA, Lee CA. Bone regeneration: new findings and potential clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001;9:157-165.
90. Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA. Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2002;17:221-230.
91. Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 1997;10:77-86.
92. Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* 2009:CD003607.
93. Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* 2008:CD003607.
94. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992;7:683-692.
95. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991;14:27-40.
96. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner* 1992;17:15-29.
97. Lian JB, Shalhoub V, Aslam F, et al. Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology* 1997;138:2117-2127.

98. Ogston N, Harrison AJ, Cheung HFJ, Ashton BA, Hampson G. Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics. *Steroids* 2002;67:895-906.
99. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol* 1990;140:132-138.
100. Shalhoub V, Conlon D, Tassinari M, et al. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem* 1992;50:425-440.
101. Majeska RJ, Nair BC, Rodan GA. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *Endocrinology* 1985;116:170-179.
102. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994;134:277-286.
103. Pockwinse SM, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: interrelationship of morphology and gene expression by in situ hybridization. *Exp Cell Res* 1995;216:244-260.
104. Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol* 1991;147:111-120.
105. Atmani H, Audrain C, Mercier L, Chappard D, Basle MF. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2002;85:640-650.

106. Acarturk TO, Hollinger JO. Commercially available demineralized bone matrix compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:862-873.
107. Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2003;74:787-797.
108. Bohnenblust ME, Steigelman MB, Wang Q, Walker JA, Wang HT. An experimental design to study adipocyte stem cells for reconstruction of calvarial defects. *J Craniofac Surg* 2009;20:340-346.
109. Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng* 2007;13:501-512.
110. Hyun SJ, Han DK, Choi SH, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;76:1667-1674.
111. Kalish BP, Schuster GS, Peacock ME, et al. Influence of matrix-suspended demineralized bone on osseous repair using a critical-sized defect in the rat (*Rattus norvegicus*) calvarium. *J Oral Implantol* 2008;34:83-89.
112. Kim SS, Gwak SJ, Kim BS. Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:245-253.
113. Matzenbacher SA, Mailhot JM, McPherson JC, 3rd, et al. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in the rat calvarium. *J Periodontol* 2003;74:1641-1646.
114. Miljkovic ND, Cooper GM, Hott SL, et al. Calcium aluminate, RGD-modified calcium aluminate, and beta-tricalcium phosphate implants in a calvarial defect. *J Craniofac Surg* 2009;20:1538-1543.
115. Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg* 2008;12:73-78.

116. Mylonas D, Vidal MD, De Kok IJ, Moriarity JD, Cooper LF. Investigation of a thermoplastic polymeric carrier for bone tissue engineering using allogeneic mesenchymal stem cells in granular scaffolds. *J Prosthodont* 2007;16:421-430.
117. Pang EK, Paik JW, Kim SK, et al. Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;76:1526-1533.
118. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:372-378.
119. Rizzi SC, Ehrbar M, Halstenberg S, et al. Recombinant protein-co-PEG networks as cell-adhesive and proteolytically degradable hydrogel matrixes. Part II: biofunctional characteristics. *Biomacromolecules* 2006;7:3019-3029.
120. Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 2009;30:2479-2488.
121. Taub PJ, Yau J, Spangler M, Mason JM, Lucas PA. Bioengineering of calvaria with adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2009;123:1178-1185.
122. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 2007;13:619-627.
123. Schmitz JP HJ. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986;Apr:299-308.
124. Acil Y, Springer IN, Broek V, Terheyden H, Jepsen S. Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem* 2002;86:90-98.
125. Acil Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res* 2000;51:703-710.

126. Herten M, Rothamel D, Schwarz F, Friesen K, Koegler G, Becker J. Surface- and nonsurface-dependent *in vitro* effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig* 2009;13:149-155.
127. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:63-72.
128. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e14-24.
129. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:356-362; discussion 363.
130. Liu Y, Lin XP, Tan LS, Wei W. [Construction of tissue engineered bone by osteoblasts from canine bone marrow mesenchymal stem cells and Bio-Oss: an *in vitro* study]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2006;15:627-631.
131. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*;31:608-620.
132. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
133. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009;30:2-10.
134. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007;77:577-588.

135. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85:444-449.
136. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:900-907.
137. Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 2006;25:S53-58.
138. Hori J, Wang M, Miyashita M, et al. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 2006;177:5928-5935.
139. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1285-1290.