



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
XXIV CICLO

RICOSTRUZIONE IN VITRO DI “SOFT AND HARD TISSUE” A PARTIRE DA CELLULE STAMINALI ADULTE: TECNICHE DI INGEGNERIA DEI TESSUTI ED ANALISI DI CITOGENETICA MOLECOLARE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottoranda LETIZIA FERRONI

Indice

Riassunto	pag. 1
Abstract	pag. 2
Introduzione	pag. 3
L'ingegneria dei tessuti	pag. 3
I biomateriali	pag. 4
Le cellule staminali	pag. 10
Le cellule staminali da tessuto adiposo	pag. 12
Le cellule staminali da polpa dentale	pag. 13
Le cellule staminali da pelle	pag. 14
Il tessuto nervoso	pag. 16
Organizzazione cellulare del tessuto nervoso	pag. 16
Struttura del Neurone	pag. 16
Classificazione strutturale dei neuroni	pag. 18
Classificazione funzionale dei neuroni	pag. 18
Neuroglia	pag. 19
Neuroglia nel SNC	pag. 19
Neuroglia nel SNP	pag. 21
Il tessuto osseo	pag. 23
Morfologia del tessuto osseo	pag. 23
Matrice extracellulare dell'osso	pag. 24
Cellule dell'osso	pag. 27
Istogenesi dell'osso	pag. 29
Il dente	pag. 31
Struttura macroscopica del dente	pag. 31
Struttura microscopica del dente	pag. 32
Istogenesi del dente	pag. 35
Scopo della tesi	pag. 39

Materiali e metodi	pag. 41
Isolamento e coltura di cellule staminali adulte	pag. 41
Biomateriali	pag. 42
Differenziamento	pag. 43
Test di proliferazione	pag. 45
Studio morfologico	pag. 46
Espressione genica mediante Real Time PCR	pag. 48
Analisi di citogenetica	pag. 51
Esperimenti in vivo	pag. 53
Risultati	pag. 55
Coltura di cellule staminali adulte	pag. 55
Ricostruzione in vitro di “soft and hard tissue”	pag. 57
Ricostruzione in vitro di tessuto nervoso	pag. 58
Ricostruzione in vitro di tessuto osseo vascolarizzato	pag. 66
Ricostruzione in vitro di tessuto simil-dentale	pag. 73
Discussione	pag. 79
Ricostruzione in vitro di tessuto nervoso	pag. 79
Ricostruzione in vitro di tessuto osseo vascolarizzato	pag. 82
Ricostruzione in vitro di tessuto simil-dentale	pag. 86
Bibliografia	pag. 89

Riassunto

In questo lavoro sono stati ricostruiti *in vitro* “soft and hard tissue” seminando Cellule Staminali Adulte su supporti tridimensionali in presenza di opportuni fattori differenziativi. In particolare, sono stati preparati i seguenti costrutti: (a) tessuto nervoso a partire da cellule staminali di pelle (SKP) e tessuto adiposo (ADSC) seminate su un supporto a base di acido ialuronico o fibrina; (b) tessuto osseo vascolarizzato utilizzando ADSC seminate su scaffold a base di idrossiapatite e (c) tessuto simil-dentale associando le cellule staminali della polpa dentale (DPSC) a un biomateriale a base di acido ialuronico.

Lo studio ha previsto una fase preliminare in monostrato, in cui il differenziamento delle cellule staminali è stato valutato mediante analisi di immunofluorescenza. Stabilita la plasticità delle cellule staminali ai fattori differenziativi, sono stati effettuati gli esperimenti nelle tre dimensioni. A diversi tempi, i costrutti sono stati sottoposti a test di proliferazione, ad analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione e ad analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR. Inoltre sono state condotte analisi di citogenetica mediante cariotipo e CGH array per verificare la stabilità genetica delle cellule durante il differenziamento.

I dati raccolti hanno mostrato: (a) il differenziamento neuronale e gliale delle SKP e delle ADSC su supporti a base di acido ialuronico e fibrina mediante un processo che non altera l'assetto cromosomico delle cellule differenziate. (b) Il co-differenziamento osteogenico ed endoteliale delle ADSC su supporti a base di idrossiapatite e la generazione *in vitro* di un sostituto osseo bioingegnerizzato privo di alterazioni geniche e dalla promettente osteointegrazione. (c) Un possibile modello per la rigenerazione della polpa dentale che associa le DPSC a un supporto tridimensionale a base di acido ialuronico sottoforma di tessuto non tessuto, dove il co-differenziamento gliale, neuronale ed endoteliale delle DPSC favorisce la rigenerazione della componente nervosa e vascolare del tessuto pulpare.

Abstract

The aim of this study was the *in vitro* reconstruction of "soft and hard tissue". Adult Stem Cells were seeded onto three-dimensional scaffolds with appropriate differentiation factors. In particular, the following constructs were prepared: (a) hyaluronic acid or fibrin scaffolds seeded with Skin Precursors Cells (SKPs) and Adipose Derived Stem Cells (ADSCs) for the regeneration of nervous tissue; (b) hydroxyapatite scaffold seeded with ADSCs to regenerate a vascularized bone tissue substitute; (c) hyaluronic acid biomaterial seeded with Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) to generate a dental pulp-like tissue.

First of all, the differentiation of stem cells was assessed in monolayer cultures by means of immunofluorescence analysis. Subsequently, the same differentiation conditions were applied on three-dimensional cultures. Proliferation test, scanning electron microscopy morphological analysis and gene expression analysis by Real Time PCR were performed at different time points. Furthermore, the genetic stability of the differentiated cells was verified by means of karyotype and CGH array analysis.

The overall data showed: (a) the neuronal and glial commitment of SKPs and ADSCs on hyaluronic acid and fibrin scaffolds and the chromosomal stability of these three-dimensional cultures. (b) The concurrent osteogenic and endothelial commitment of ADSCs on hydroxyapatite scaffold and the *in vitro* generation of a tissue-engineered bone graft with a great osteointegration potential. (c) The concurrent glial, neuronal, and endothelial commitment of DPSCs onto non-woven hyaluronic acid scaffold, defining a possible model to restore the nervous and vascular components of the dental pulp tissue.

Introduzione

L'ingegneria dei tessuti

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione *in vitro* di tessuti od organi, definendo una nuova branca delle scienze biomediche conosciuta come *ingegneria dei tessuti*. L'insieme di queste tecnologie rendono possibile l'espansione *ex vivo* di cellule autologhe e il loro impiego nella riparazione di lesioni e nella rigenerazione di tessuti attraverso l'uso di matrici tridimensionali biocompatibili. Modulando opportunamente le caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche di tali matrici è possibile utilizzarle come supporti per la semina, la crescita e il differenziamento di cellule autologhe al fine di rigenerare *in vitro* diversi tessuti specializzati.

L'ingegneria dei tessuti permette di associare le potenzialità del trapianto di cellule viventi alla tecnologia degli organi artificiali per la realizzazione di strutture funzionali. Per questo, l'ingegneria tissutale con l'introduzione di strutture bioartificiali rappresenta un'evoluzione rispetto ai sostituti di prima generazione: organi artificiali tradizionali come protesi valvolari cardiache, pacemakers e protesi ortopediche, la cui alternativa clinica era rappresentata dal trapianto di organi da donatori.

La ricostruzione *in vitro* di un tessuto o di un intero organo richiede però non solo uno studio approfondito della composizione e struttura delle matrici tridimensionali, ma anche delle forze fisiche che agiscono su di esso. Inoltre, essa necessita di conoscenze circa i fattori chimici e molecolari che regolano la crescita e il differenziamento delle cellule e dei tessuti.

Si può quindi affermare che l'ingegneria dei tessuti si basa su due componenti principali: il supporto tridimensionale e la componente biologica. Il supporto tridimensionale è rappresentato dai biomateriali, mentre la componente biologica comprende sia le cellule che i fattori molecolari.

I biomateriali

Il biomateriale è il supporto tridimensionale necessario alle cellule per distribuirsi nelle tre dimensioni e per deporre matrice extracellulare. Un biomateriale è dunque un elemento o una combinazione di più elementi impiegati nel trattamento, miglioramento o sostituzione di un tessuto oppure di un intero organo.

I biomateriali per essere adatti all'ingegneria dei tessuti devono possedere le seguenti caratteristiche:

- Biocompatibilità con il tessuto o organo ricevente;
- Biodegradabilità: la velocità di degradazione ideale corrisponde alla velocità di formazione del nuovo tessuto;
- Atossicità;
- Non immunogenicità;
- Proprietà meccaniche ottimali per inserirsi nel tessuto circostante;
- Porosità e morfologia adeguata per il trasporto di cellule, gas, metaboliti, nutrienti e molecole sia all'interno del biomateriale che tra il biomateriale e l'ambiente circostante.

In generale i biomateriali vengono progettati e costruiti ispirandosi alla matrice extracellulare perché essa garantisce la comunicazione fra cellule e la stabilità dei tessuti tramite le molecole di adesione. In generale, la matrice extracellulare è composta da sostanza fondamentale, un gel molto idratato che conferisce alla matrice una resistenza alla compressione, da fibre che conferiscono resistenza alla trazione e da acqua che favorisce la rapida diffusione di sostanze. Questi elementi, comuni a tutte le matrici extracellulari, si combinano in rapporti differenti in ciascun tessuto. Al fine di ottenere strutture tridimensionali compatibili con la matrice extracellulare del tessuto da rigenerare sono stati utilizzati biomateriali naturali, sintetici o semisintetici. I biomateriali naturali sono ad esempio il collagene, la gelatina, la fibrina, l'acido ialuronico, la cellulosa, la chitina, gli alginati, l'idrossiapatite e materiali da cadavere o da animali. Essi possiedono diversi vantaggi come l'adesione selettiva (collagene), la biodegradabilità (gelatina e chitina) e proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti naturali (valvole cardiache e vasi sanguigni da animali). I biomateriali naturali presentano anche degli svantaggi: possibilità di trasmettere infezioni virali, antigenicità e instabilità. I biomateriali sintetici sono invece l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il politetrafluoroetilene (PTFE), la ceramica e le leghe. Essi possiedono un'architettura tridimensionale soddisfacente ma una biocompatibilità discutibile, inoltre la maggior parte dei

biomateriali sintetici possiede uno scarso contenuto di informazioni e di segnali per le cellule. Infine i semisintetici derivano da alterazioni dei biomateriali naturali al fine di migliorarne le prestazioni. Alcuni esempi sono l'acido ialuronico modificato e i derivati dell'idrossiapatite. In base alla loro applicazione, i biomateriali possono essere distinti in supporti per la ricostruzione di tessuti molli (*soft tissue*) o per la ricostruzione di tessuti compatti (*hard tissue*) [Bressan E., 2011].

Soft Tissue

Attualmente, le strategie per la ricostruzione di tessuti molli si basano sul trapianto di innesti di tessuto autologo o di impianti bioingegnerizzati costituiti da cellule seminate su supporti biocompatibili. A tale scopo, si utilizzano diversi biomateriali naturali, anche in associazione con materiali sintetici od organici.

Alcuni esempi di biomateriali impiegati nella rigenerazione di soft tissue sono:

- *Collagene*: è il componente principale della matrice extracellulare del tessuto connettivo. È ampiamente utilizzato per generare sostituti dermici grazie alla sua biocompatibilità, resistenza e flessibilità. Diversi scaffolds a base di collagene sono attualmente commercializzati come sostituti dermici, in particolare sotto forma di idrogel. Solitamente, questi sostituti vengono ottenuti attraverso la sospensione di fibroblasti dermici in un idrogel di collagene. Tuttavia, il loro impiego come innesto permanente è limitato a causa della loro scarsa resistenza alla degradazione, soprattutto se l'idrogel è a bassa concentrazione [Helary C., 2011]. In commercio sono disponibili sostituti dermici costituiti da uno strato di collagene associato a glicosaminoglicani dermici sovrapposti a uno strato di silicone. Questi sostituti sono stati impiegati con successo nel trattamento di ferite cutanee croniche [Kahn S. A., 2011].
- *Gelatina*: è prodotta dall'idrolisi del collagene, possiede elevato potere emostatico e non causa antigenicità. Grazie alle sue proprietà, la gelatina è stata ampiamente utilizzata come adesivo tissutale per la chiusura di ferite [Dhandayuthapani B., 2010].
- *Fibrina*: deriva dalla polimerizzazione del fibrinogeno in presenza della trombina. Essa non fa parte della matrice extracellulare, ma è temporaneamente presente durante la guarigione delle ferite in quanto è coinvolta nella coagulazione del sangue. Nel campo della medicina rigenerativa, la colla di fibrina è stata diffusamente utilizzata come adesivo tissutale. La colla di fibrina è commercializzata sottoforma di due soluzioni separate: una di fibrinogeno e l'altra di trombina, applicabili mediante una

doppia siringa o uno spray. Quando sono mescolate insieme, esse mimano le ultime fasi della cascata di coagulazione e formano un coagulo di fibrina [Thompson D. F., 1988]. La colla di fibrina è stata utilizzata, come alternativa ai punti metallici, in pazienti ustionati sottoposti all'asportazione della ferita e ad innesto cutaneo. Si è dimostrata sicura ed efficace, dando risultati migliori della pinzatura. Inoltre l'impiego della colla di fibrina ha incontrato la compliance dei pazienti, poiché la rimozione dei punti metallici è spesso dolorosa e richiede maggior tempo [Foster K., 2008].

- *Acido ialuronico*: è un polisaccaride della matrice extracellulare diffuso in modo ubiquitario. In ambiente acquoso esso genera matrici viscose garantendo l'idratazione tissutale, regola l'organizzazione dei proteoglicani di matrice, ed è inoltre coinvolto nell'adesione, proliferazione, migrazione e differenziamento cellulare. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno ampiamente dimostrato le sue potenzialità nella costruzione di supporti tridimensionali utili all'ingegneria dei tessuti [Solchaga L. A., 1999]. In commercio, sono disponibili derivati dell'acido ialuronico come lo HYAFF[®] 11 (Fidia, Italia), un derivato lineare dell'acido ialuronico modificato per esterificazione completa dei gruppi carbossilici dell'acido glucuronico con gruppi benzilici. Questa modificazione determina una minore idrofilia e degradazione da parte delle ialuronidasi. I derivati esterificati mantengono le stesse proprietà biologiche dell'acido ialuronico ma presentano un tempo di permanenza maggiore quando sono impiantati e possono essere processati mediante varie tecniche di tessitura producendo diversi manufatti come garze, spugne, microsfeere, granuli, membrane e feltri di non-tessuto, con caratteristiche adattabili a molteplici applicazioni cliniche [Rastrelli A., 1990].
- *Laminina*: è una glicoproteina della matrice extracellulare generalmente presente nella membrana basale. Promuove l'adesione, la migrazione, la crescita e il differenziamento cellulare. Nel campo dell'ingegneria dei tessuti la laminina è utilizzata per migliorare le funzionalità dei supporti tridimensionali e per evitare o minimizzare il rigetto immunitario. È stato dimostrato che l'associazione della laminina a un supporto a base di chitina (un elemento strutturale dell'esoscheletro di crostacei) è in grado di promuovere la guarigione di ferite, accelerando la riepitelizzazione attraverso la riduzione di infiltrati infiammatori e la maggiore proliferazione dei fibroblasti [Min S. K., 2010].

Hard Tissue

In generale, quando si parla di ricostruzione di *hard tissue* si intende la rigenerazione del tessuto compatto per eccellenza: il tessuto osseo. Attualmente, i progressi nel campo delle nanotecnologie hanno consentito di produrre sostituti ossei alternativi agli innesti di tessuto osseo derivanti dallo stesso paziente (autotrapianto) o da donatori (allograpianto). L'*autotrapianto* rappresenta ancora oggi il “gold standard” nella ricostruzione ossea perché gode di alcune importanti qualità:

- Osteoconduttività: garantire l'adesione e la proliferazione cellulare in una struttura che consenta la migrazione cellulare e la formazione di nuovi vasi;
- Osteogenicità: garantire la presenza di osteoblasti nella sede di adesione dell'innesto per favorire la generazione di nuovo tessuto osseo;
- Osteoinduttività: capacità di stimolare le cellule staminali od osteoprogenitrici circostanti a differenziare in osteoblasti.

Nonostante queste caratteristiche, l'autotrapianto è associato a numerosi effetti collaterali tra cui: dolore post-operatorio, formazione di ematomi, emorragie, lesioni nervose, infezioni e difetti estetici. L'*allograpianto*, invece, comporta un elevato rischio di trasmissione di malattie e risposte immunitarie; per questo motivo gli innesti ossei prima di essere impiantati vengono congelati o liofilizzati. Un'alternativa all'allograpianto è la *matrice ossea demineralizzata*, prodotta da osso corticale decalcificato e trattato con radiazioni e agenti chimici. Il risultato, una matrice ossea costituita da solo proteine denaturate, non è una struttura stabile ma un substrato osteoconduttivo da utilizzare in caso di lesioni ossee strutturalmente stabili. Nonostante esistano diverse forme di trapianto osseo, tutte sono accomunate da una ridotta osteoinduttività e l'assenza di una componente cellulare, poiché gli innesti donatori sono devitalizzati tramite irradiazione o liofilizzazione [Finkemeier C.G., 2002].

Un modo per ovviare agli inconvenienti connessi al trapianto di tessuto osseo è trattare i difetti ossei con sostituti bioingegnerizzati. Oltre alle già discusse caratteristiche di osteoconduttività, osteogenicità e osteoinduttività il sostituto osseo ideale deve possedere altre precise caratteristiche [Gardin C., 2012]:

- Osteointegrazione: capacità di formare legami con il tessuto osseo di origine;
- Biodegradabilità;
- Morfologia simile all'osso umano;
- Facile impiego clinico;
- Economico.

In commercio sono disponibili un gran numero di sostituti ossei, di origine naturale e sintetica, che promuovono la proliferazione, il differenziamento e la migrazione delle cellule.

Tra questi esistono biomateriali costituiti da:

- *Metalli*: sono stati ampiamente utilizzati, soprattutto il titanio, come materiali di sostituzione dell'osso per la loro resistenza meccanica. Tuttavia, gli impianti metallici dopo 10-15 anni devono essere sostituiti a causa della loro scarsa o incompleta osteointegrazione con l'osso circostante. Al fine di migliorare l'osteointegrazione, sono stati sviluppati impianti metallici con superfici nanostrutturate che ne aumentano la rugosità e la bagnabilità di superficie favorendo l'assorbimento di proteine, l'adesione e la proliferazione cellulare e la deposizione di calcio [Tran N., 2009].
- *Ceramiche*: a base di fosfato di calcio, come l'idrossiapatite (HA) e β -fosfato tricalcico (TCP), sono diffusamente utilizzate nella rigenerazione del tessuto osseo per la loro elevata biocompatibilità con le cellule e il tessuto osseo. Le ceramiche sono inoltre bioattive, cioè sono in grado di supportare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare. Nonostante HA e TCP assomiglino alle componenti inorganiche della matrice ossea, il loro utilizzo è limitato dalla loro fragilità e scarsa resistenza alla pressione. Inoltre, come i metalli, anche le ceramiche presentano una scarsa osteointegrazione, che può essere rimediata attraverso lo sviluppo di superfici nanoscalari. Rispetto alle ceramiche convenzionali, le ceramiche nanoscalari presentano una maggiore adesione e proliferazione cellulare e deposizione di calcio grazie alla maggiore bagnabilità ed adsorbimento di vitronectina, una delle proteine coinvolte nella adesione cellulare [Webster T. J., 2001].
- *Polimeri*: di origine naturale o sintetica. I polimeri naturali comprendono i polisaccaridi (alginato, chitina/chitosano, acido ialuronico e derivati) e le proteine (collagene, fibrina e seta). Il vantaggio dei polimeri naturali è l'elevata biocompatibilità, ma quelli sintetici sono privi di immunogenicità e possono essere lavorati per ottenere particolari caratteristiche [Balasundaram G., 2007]. I polimeri sintetici più utilizzati sono l'acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), e il loro co-polimero, l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA). Anche l'osteointegrazione dei polimeri può essere incrementata se modificati a livello nanoscalare, ad esempio, attraverso il legame con proteine o peptidi che possano incrementare l'adesione cellulare. Poiché l'attività biologica delle proteine di adesione si esplica mediante peculiari sequenze RGD (arginina-glicina-acido aspartico), la funzionalizzazione dei polimeri sintetici con tali sequenze ne incrementa l'interazione con le integrine, i

recettori di membrana delle sequenze RGD, favorendo l'adesione cellulare [Paletta J. R., 2010].

Poiché i sostituti ossei costituiti da un solo componente non rispecchiano tutte le caratteristiche di un sostituto ideale, la ricerca negli ultimi anni si sta concentrando sulla combinazione dei materiali sopra elencati.

Le cellule staminali

Si definisce cellula staminale, una cellula che può dividersi continuamente generando cellule figlie indifferenziate (*self-renewing*) o cellule specializzate (*multilineage differentiation*). Infatti esse possono dividersi simmetricamente, per aumentare il numero di cellule staminali, oppure asimmetricamente, per mantenere inalterato il numero di cellule staminali e generare cellule progenitrici che a loro volta daranno origine a cellule mature [Bluteau G., 2008].

Generalmente le cellule staminali si dividono in Cellule Staminali Embrionali (ESC) e Cellule Staminali Adulte (ASC). Le ESC derivano dalla massa interna della blastocisti di un embrione di pochi giorni. Vengono definite cellule staminali pluripotenti poiché sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari che costituiscono l'individuo adulto. Al contrario, le ASC sono solo multipotenti perché il loro potenziale di differenziazione è limitato a particolari linee cellulari. Le ASC risiedono in diversi organi e tessuti in microambienti, denominati “nicchie di staminalità”, composti da cellule eterogenee, matrice extracellulare e fattori solubili che supportano il mantenimento e l'auto-rinnovamento delle cellule staminali [Yen A, 2008]. Per questo motivo, le ASC sono anche denominate cellule staminali post-natali o somatiche. Le ASC non possono essere identificate con certezza, ma solo sulla base di proprietà indirette come l'espressione di un particolare repertorio di marcatori di superficie, il lento ciclo cellulare, la clonogenicità e lo stato indifferenziato. Il modo migliore per determinare la “staminalità” è la valutazione del *self-renewal* che si basa sull'isolamento di presunte cellule staminali e il loro successivo trapianto per poter valutare la loro capacità di ricostruire il tessuto ospite [Bluteau G., 2008].

Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) sono ASC non-ematopoietiche di origine mesodermica e neuroectodermica. Sono individuabili in molti tessuti (Tabella 1.1) come il midollo osseo, il tessuto adiposo, il cordone ombelicale e la polpa dentale. Si differenziano in cellule di origine mesodermica come adipociti, condrociti e osteociti, ma anche in cellule appartenenti agli altri foglietti embrionali (Tabella 1.2). Per l'appunto, è noto che le MSC possiedano un grado di plasticità maggiore rispetto ad altre popolazioni di ASC e che siano in grado di differenziarsi *in vitro* in linee cellulari non-mesodermiche come i neuroni e gli astrociti. Sembra che la loro funzione nel corpo umano sia di garantire un serbatoio di cellule riparative senza particolari caratteristiche ma recettive a segnali che possano guidarle a differenziare in linee cellulari specializzate. Il destino delle MSC può essere influenzato da segnali di diversa natura: da danni tissutali quali, traumi, fratture, infiammazione, necrosi e

tumori, da segnali chemotattici e da segnali provenienti dal microambiente circostante [Pountos I.,2005].

Oltre alla multipotenza, le MSC godono di altre importanti qualità: possono essere amplificate facilmente in laboratorio in condizioni standard di coltura e la fonte da cui vengono isolate non sembra incontrare problemi etici.

<i>Fonte</i>	<i>Referenza</i>
Stroma del midollo osseo	Jones E. A., 2002
Tessuto adiposo	Zuk P. A., 2001
Osso trabecolare	Tuli R., 2003
Cartilagine articolare	Alsalameh S., 2004
Membrana sinoviale	De Bari C., 2003
Muscolo	Young H. E., 2001
Tendini	Salingarnboriboon R. , 2003
Cordone ombelicale	Romanov Y. A., 2003
Vasi sanguigni	Abedin M., 2004
Sangue	Kuznetsov S. A., 2001
Pelle	Toma J. G., 2005
Polpa dentale	Gronthos S., 2000
Tessuti fetali	Muench M. O., 2002

Tabella 1.1: Elenco dei tessuti dove sono state individuate le MSC e le relative referenze.

<i>Differenziamento</i>	<i>Referenza</i>
Osteoblasti	Jones E. A., 2002
Condrociti	Jones E. A., 2002
Adipociti	Jones E. A., 2002
Cardiomiociti	Orlic D., 2001
Fibroblasti	Ogawa M., 2006
Miofibroblasti	Ogawa M., 2006
Muscolo scheletrico	De Bari C., 2003
Tenociti	Pittenger M., 2002
Neuroni	Long X., 2005
Astrociti	Mimura T., 2004
Epatociti	Lee K. D., 2004
Cellule pancreatiche	Chen L. B., 2004

Tabella 1.2: Elenco delle linee cellulari generate dalle MSC e le relative referenze.

L'ampia capacità proliferativa insieme alla multipotenza e all'elevato potenziale di differenziamento rende le MSC candidati interessanti per la rigenerazione tissutale.

Le MSC sono state scoperte e caratterizzate per la prima volta nello stroma del midollo osseo e denominate Cellule Staminali derivate dal Midollo Osseo (BMMSC) [Friedenstein A. J., 1970]. Esse possono essere ottenute facilmente, amplificate notevolmente *in vitro* e impiegate in terapie cellula-mediata e in tecniche dell'ingegneria tissutale. Tuttavia, l'uso clinico delle BMMSC è limitato da diversi problemi, tra cui il prelievo doloroso spesso associato ad un basso numero di cellule raccolte. Per queste ragioni, molti ricercatori hanno incominciato a cercare fonti alternative più accessibili e abbondanti da cui ricavare MSC con procedure di raccolta meno invasive.

Le cellule staminali da tessuto adiposo

Il tessuto adiposo, come il midollo osseo, deriva dal mesenchima ed è caratterizzato da uno stroma di sostegno facilmente isolabile. Il tessuto adiposo potrebbe quindi rappresentare una fonte alternativa al midollo osseo per l'isolamento di cellule staminali. Attraverso interventi di liposuzione è possibile raccogliere un gran numero di Cellule Staminali del tessuto Adiposo (ADSC) che possono essere facilmente amplificate *in vitro*. Infatti in condizioni di coltura standard, senza particolari accorgimenti, le ADSC crescono rapidamente con una cinetica di proliferazione stabile [Zuk P. A., 2001].

È stato dimostrato che le ADSC, come le BMMSC, possono differenziare *in vitro* in osteociti, adipociti, miociti e condrociti, se trattate con gli specifici fattori differenziativi [Zuk P. A., 2002]. Tale plasticità conferma ulteriormente che il tessuto adiposo è costituito da una popolazione di cellule staminali multipotenti con capacità differenziative pari alle BMMSC.

La staminalità delle ADSC è stata confermata dalla caratterizzazione dei marcatori antigenici CD (*cluster of differentiation*). Come le BMMSC, le ADSC esprimono sulla superficie cellulare i marcatori CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 e SH3, che insieme a SH2, è considerato un marcatore per le MSC [Haynesworth S. E., 1992]. Oltre a questi marcatori, sia le ADSC che le BMMSC esprimono STRO-1, un marcatore utilizzato per isolare le cellule progenitrici del midollo osseo [Dennis J. E., 2002]. Al contrario, le ADSC non esprimono i marcatori della linea emopoietica, CD31, CD34 e CD45. Inoltre esse sono positive al CD13 ma negative al CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104 e CD106. Le ADSC differiscono dalle BMMSC solo per l'espressione di due marcatori antigenici: CD49d e CD106. In particolare, le ADSC esprimono il CD49d ma non il CD106, mentre viceversa è stato

osservato nelle BMMSC [Zuk P. A., 2002]. L'espressione del CD106 è funzionalmente associata all'emopoiesi [Levesque J. B., 2001], quindi l'assenza di espressione di questo marcatore antigenico da parte delle ADSC è coerente con la loro localizzazione in un tessuto non emopoietico.

Poiché il tessuto adiposo, come lo stroma del midollo osseo, deriva dal mesoderma non è inaspettato osservare il differenziamento delle ADSC in cellule della linea mesodermica. Tuttavia, è stato documentato anche il loro differenziamento in cellule dal fenotipo neuronale, generando cellule con morfologia simile ed espressione di marcatori proteici simili alle cellule nervose [Franco Lambert A. P., 2009].

In conclusione, le ADSC possiedono tutte le caratteristiche tipiche delle MSC: la morfologia fibroblastoide, la capacità di formare singole colonie denominate CFU-F (fibroblastoid colony-forming units), l'espressione del tipico set di marcatori di superficie, multipotenza e la capacità di differenziare in cellule della linea mesodermica [Kern S., 2006].

Le cellule staminali da polpa dentale

La polpa dentale è il tessuto connettivo lasso di origine mesenchimale intrappolato all'interno della cavità pulpare del dente. Nella polpa è possibile distinguere quattro strati: uno strato più esterno costituito da odontoblasti generanti dentina; un secondo strato, chiamato "*cell free zone*", povero in cellule ma ricco di fibre collagene; un terzo strato, chiamato "*cell rich zone*", costituito da cellule progenitrici e da cellule indifferenziate, alcune delle quali staminali; uno strato più interno che costituisce il nucleo della polpa, ricco in vasi e nervi. Le cellule staminali e indifferenziate della "*cell rich zone*" possono migrare verso i vari distretti dove, sotto la spinta di diversi stimoli, possono originare nuove cellule differenziate e tessuti specializzati [d'Aquino R., 2009]. La polpa dentale di terzi molari, nonostante sia spesso scartata, rappresenta una fonte di MSC facilmente accessibile. Solo nel 2000 sono state identificate e isolate, per la prima volta, le Cellule Staminali della Polpa (DPSC) in base alle loro capacità clonogeniche e alla elevata velocità proliferativa [Gronthos S., 2000]. Successivamente sono state identificate più di quattro tipi cellulari di MSC derivanti da polpa dentale: le Cellule Staminali da Denti Decidui Esfoliati (SHED) [Miura M., 2003], le Cellule Staminali del Legamento Periodontale (PDLSC) [Seo B. M., 2004], le Cellule Staminali della Papilla Apicale (SCAP) [Sonoyama W., 2006] e le Cellule Precursori del Follicolo Dentale (DFPC) [Morscheck C., 2005]. Tutte loro dimostrano multipotenza e la capacità di rigenerare diversi tessuti dentali e periodontali *in vitro* e *in vivo* [Huang G. T., 2009].

Inoltre mostrano positività ai marcatori: STRO-1, CD13, CD24, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, Oct4, Nanog e β 2 integrina, ma negatività per CD14, CD34, CD45 e HLA-DR. La persistenza di negatività al CD45 e positività al CD34 dimostra che le DPSC non derivano da una fonte ematopoietica, ma sono di origine mesenchimale [d'Aquino R., 2007]. Come tutte le MSC, le DPSC sono una popolazione eterogenea e i diversi marcatori precedentemente elencati possono essere espressi in sottopopolazioni delle stesse cellule [Huang G. T., 2009].

Esse possono sopravvivere in coltura per lunghi periodi ed essere mantenute per diversi passaggi: non sono stati osservati chiari segni di senescenza fino a più di 80 passaggi. Inoltre, possono essere crio-conservate per lunghi periodi senza perdere la loro multipotenza [Laino G., 2005].

È stato dimostrato il loro differenziamento in odontoblasti, le cellule che producono la matrice mineralizzata della dentina [Gronthos S., 2000]. Ma le DPSC possono differenziare anche in adipociti e neuroni esibendo sia la morfologia che i rispettivi marcatori genici. Inoltre, è stato osservato il loro differenziamento condrogenico e miogenico *in vitro*. La plasticità e la multipotenza delle DPSC può essere correlata alle origini della polpa dentale, costituita sia da componenti ectodermiche che mesodermiche e da cellule derivanti dalla cresta neurale [d'Aquino R., 2009].

Le cellule staminali da pelle

Il trapianto di cellule e la rigenerazione tissutale richiede l'impiego di cellule precursori multipotenti. È fondamentale quindi individuare una popolazione di cellule precursori facilmente accessibili e isolabili attraverso piccole biopsie per un loro impiego autologo. A tale scopo, dal derma di mammifero adulto è stata isolata e caratterizzata una popolazione di cellule multipotenti, denominate skin-derived precursors (SKP).

Nel 2001, le SKP sono state isolate per la prima volta dalla pelle di roditori ed hanno dimostrato la loro multipotenza dando origine *in vitro* a una progenie neurale e mesodermica. Esse infatti hanno dato origine a neuroni, una linea cellulare che non era mai stata individuata nella pelle prima di allora [Toma J. G., 2001].

Successivamente le SKP sono state isolate ed amplificate anche da piccoli pezzi di pelle umana. Le SKP umane, come quelle di roditore, generano cellule sia neuronali che mesodermiche, differenziando in neuroni, cellule gliali, cellule muscolari lisce e adipociti.

Infine è stato dimostrato che le SKP mantengono la stessa multipotenza anche dopo diversi passaggi di coltura [Toma J. G., 2005].

Le potenzialità differenziative delle SKP in fenotipo neurale e mesodermico suggerisce la possibilità che esse siano utili per diversi scopi terapeutici, come il trapianto di cellule autologhe.

Nell'adulto le SKP possono essere sfruttate come una fonte accessibile di precursori neurali per il trattamento di danni nel sistema nervoso. Infatti, è stato dimostrato che le SKP, come le cellule staminali della cresta neurale, possono differenziare in cellule di Schwann se stimolate con neuregulina, un fattore trofico appartenente alla famiglia dei fattori di crescita epiteliali. Inoltre studi *in vitro* e *in vivo* dimostrano che le cellule di Schwann derivate dalle SKP si associano agli assoni assumendo un fenotipo mielinizzante in risposta a segnali rilasciati dagli stessi assoni. Infine studi *in vivo* hanno dimostrato che l'ambiente del cervello neonatale e dei neuroni periferici rigeneranti è sufficiente per spingere le SKP a differenziare in cellule di Schwann in grado di mielinizzare i neuroni del sistema nervoso centrale e periferico. Quindi, le SKP garantiscono una fonte altamente accessibile di cellule di Schwann utilizzabili nella terapia cellulare [McKenzie I A, 2006].

La multipotenza e le capacità differenziative delle SKP in linee cellulari neuronali e mesodermiche sono riconducibili alla loro origine embrionale. Si ritiene che durante lo sviluppo embrionale esse migrino dalla cresta neurale alla pelle dove è possibile individuarle ancora in età adulta anche se in minor quantità. Tale ipotesi è confermata dal fatto che le SKP condividono con le cellule staminali della cresta neurale le stesse capacità differenziative [Fernandes K J, 2004].

Il tessuto nervoso

Organizzazione cellulare del tessuto nervoso

Nel tessuto nervoso possiamo distinguere due tipologie cellulari che derivano dal neuroectoderma: i *neuroni*, che svolgono le funzioni tipiche del tessuto nervoso e le cellule della glia o *neuroglia*, che svolgono funzioni accessorie.

I neuroni sono costituiti da un corpo cellulare detto *soma* o *pirenoforo*, nel quale si trovano il nucleo e la maggior parte degli organuli, da *ramificazioni dendritiche* e da un lungo *assone* (detto anche *neurite*) che termina con uno o più *terminazioni sinaptiche*. La comunicazione tra i neuroni avviene attraverso le sinapsi, mentre tramite le giunzioni citoneurali, essi comunicano con elementi non neuronali (come le fibre muscolari). La trasmissione dell'impulso attraverso le sinapsi e le giunzioni citoneurali avviene tramite un mediatore chimico detto *neurotrasmettitore*.

La neuroglia costituisce una rete tridimensionale attorno le cellule nervose. Essa ricopre diversi compiti tra cui fungere da sostegno ai neuroni ed eliminare detriti e patogeni mediante fagocitosi. Le cellule gliali sono più piccole dei neuroni e possiedono capacità proliferativa, una caratteristica persa dalla maggior parte dei neuroni.

Struttura del Neurone

Pirenoforo

Il pirenoforo può essere di dimensioni variabili in rapporto alla funzione esplicata dal neurone stesso. Esso contiene un nucleo alquanto voluminoso e gli organuli citoplasmatici coinvolti nell'attività secretoria particolarmente sviluppati. Il nucleo è disposto centralmente ed è caratterizzato dalla cromatina finemente dispersa, manifestazione di un'intensa attività metabolica. È scarsamente evidenziato dai coloranti basofili, che invece colorano la grande quantità di reticolo endoplasmatico rugoso (RER), mostrando zolle intensamente colorate in corrispondenza degli aggregati di ribosomi. Anche l'apparato citoscheletrico del pirenoforo è molto sviluppato ed è costituito da una fitta rete di *neurotubuli* o *microtubuli*, *neurofilamenti* e *microfilamenti* che si estendono anche nei processi neuronali. I microtubuli hanno un diametro di circa 24 nm e si dispongono nel neurone con l'estremità *plus* orientata verso l'estremità dell'assone, e quella *minus* verso il pirenoforo. I neurofilamenti o filamenti intermedi invece hanno un diametro di 10 nm e sono connessi tra loro e con i microtubuli da piccole sporgenze laterali. I microfilamenti, invece, dal diametro di 3-5 nm, sono prevalentemente concentrati nell'assone.

Dendriti

I dendriti sono dei corti processi neuronali che originano direttamente dal soma e che si assottigliano all'estremità ramificandosi ad angolo acuto. I dendriti presentano gli stessi costituenti citoplasmatici del soma ovvero, mitocondri, RER, reticolo endoplasmatico liscio (REL) e un ricco apparato citoscheletrico, fatta eccezione per l'apparato del Golgi, che è localizzato esclusivamente in sede perinucleare. Tuttavia, quando le ramificazioni portano ad un assottigliamento del calibro del dendrite, la quantità degli organuli diminuisce finché alle estremità delle ramificazioni non rimangono che elementi del citoscheletro rappresentati da neurotubuli e da filamenti intermedi.

Sulla superficie i dendriti presentano numerose estroflessioni del plasmalemma, dette *spine* o *gemmule dendritiche*, che sono le sedi dei contatti sinaptici. In corrispondenza delle spine, il dendrite riceve impulsi eccitatori o inibitori attraverso l'assone di un altro neurone e a sua volta li trasmette all'assone del neurone a cui appartiene.

Assone

L'assone è un lungo processo neuronale con un decorso più rettilineo rispetto ai dendriti. Esso conduce l'impulso nervoso dal corpo cellulare verso le terminazioni di altri neuroni o fibre muscolari. La velocità di conduzione è direttamente proporzionale al calibro dell'assone e al numero di neurofilamenti contenuti al suo interno. Lungo il loro decorso possono emettere alcune collaterali ad angolo retto rispetto all'asse maggiore del neurite a notevole distanza dal pirenoforo. Queste ramificazioni hanno lo scopo di incrementare la sfera di influenza di un neurone sulle cellule nervose circostanti.

Il citoplasma dell'assone (*assoplasma*), al contrario di quello dei dendriti, non contiene gli stessi organuli del pirenoforo. Il citoscheletro è costituito da microfilamenti, numerosi neurotubuli e neurofilamenti disposti parallelamente all'asse maggiore del neurite. Sono presenti inoltre sottili mitocondri, particolarmente numerosi nei terminali assonici. Data la scarsa presenza di organuli citoplasmatici, l'assone presenta una forte dipendenza metabolica rispetto al pirenoforo. Tale dipendenza comporta un continuo movimento dal soma alla terminazione assonica di proteine, enzimi, neurotrasmettitori, vescicole sinaptiche, subunità di neurotubuli e neurofilamenti che prende il nome di *flusso assonico*.

Il flusso assonico può realizzarsi a velocità diversa; esiste infatti un *flusso assonico lento* e un *flusso assonico veloce*. Il flusso lento avviene alla periferia del neurite con una velocità di qualche millimetro al giorno. Tramite esso vengono trasportati particelle grossolane, mitocondri ed enzimi dal pirenoforo verso l'estremità dell'assone, per sintetizzare i

neurotrasmettitori nel cosiddetto elemento presinaptico. Il flusso assonico veloce invece avviene nella porzione centrale del neurite con una velocità di un centinaio di millimetri al giorno. Esso è bidirezionale (anterograde e retrograde) e si realizza mediante lo scorrimento delle vescicole lungo i microtubuli grazie a proteine motrici, come la chinesina e la dineina. Attraverso il flusso anterograde, dal pirenoforo alla terminazione nervosa, vengono trasportate vescicole vuote per consentire il turnover del plasmalemma e vescicole contenenti i precursori dei neurotrasmettitori. Mentre attraverso il flusso retrograde, che avviene in direzione opposta, giungono al pirenoforo le molecole di segnale captate alla periferia del neurite.

Classificazione strutturale dei neuroni

In base al numero di processi che emergono dal corpo cellulare i neuroni si classificano in (Figura 1.1):

- *Neuroni unipolari*: il dendrite e l'assone di questi neuroni sono continui, a formare un solo prolungamento. Essi hanno la peculiarità di potersi riprodurre, al contrario degli altri neuroni. Un esempio è rappresentato dai fotorecettori della retina.
- *Neuroni dipolari*: possiedono due prolungamenti, un assone e un dendrite disposti ai poli opposti del soma. Sono piuttosto rari, ma giocano un ruolo importante nello scambio di informazioni sensoriali, olfattive e uditive.
- *Neuroni multipolari*: sono i più frequenti. Hanno un assone e un numero variabile di dendriti. In base alla forma del pirenoforo essi sono distinti in neuroni a forma stellata (motoneuroni), piramidali (corteccia cerebrale) e piriformi (corteccia cerebellare).
- *Neuroni amacrinici*: presenti solo nella retina. Possiedono solo prolungamenti dendritici in quanto la funzione di assone viene svolta da un tratto del corpo cellulare.
- *Neuroni pseudounipolari*: anche detti neuroni a T. Dal corpo cellulare sferico si diparte un unico prolungamento che ben presto si biforca in due branche di cui una è di natura dendritica e l'altra è di natura assonica. Ne sono un esempio i neuroni dei gangli sensitivi.

Classificazione funzionale dei neuroni

I neuroni possono essere classificati in tre categorie funzionali:

- *Neuroni sensoriali*: sono neuroni unipolari che formano la porzione *afferente* del sistema nervoso periferico (SNP). La loro funzione è propagare gli stimoli dai recettori sensoriali della periferia verso il sistema nervoso centrale (SNC).

- *Neuroni motori*: sono neuroni multipolari che formano la componente *efferente* del sistema nervoso. Il loro compito è guidare l'attività dei tessuti periferici.
- *Interneuroni*: sono neuroni sia eccitatori che inibitori. Si collocano tra neuroni sensoriali e neuroni motori, dove svolgono la funzione di analizzare gli stimoli sensoriali e coordinare gli stimoli motori.

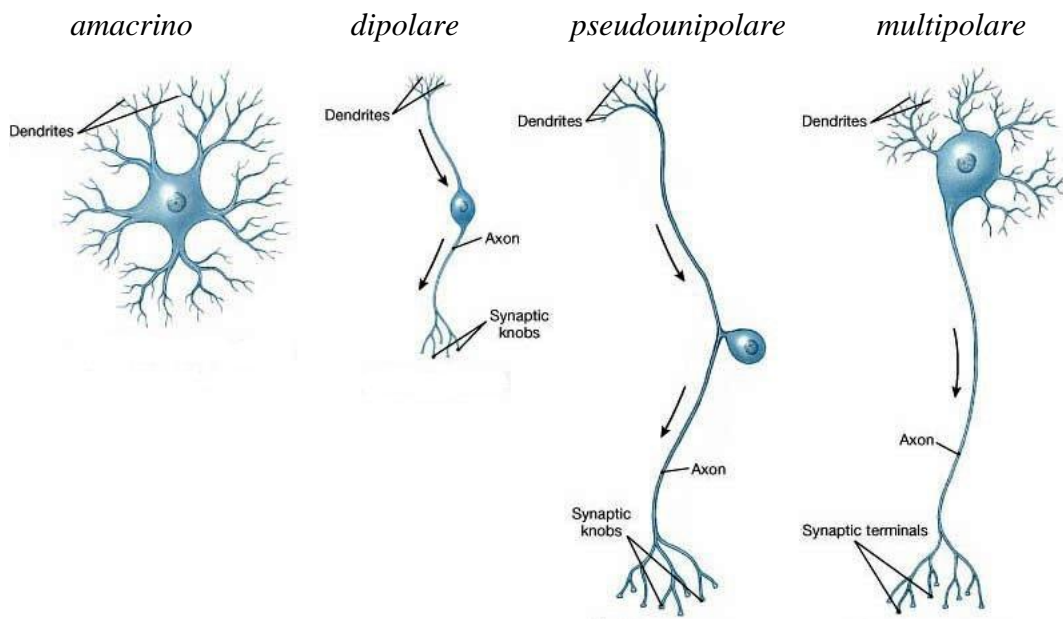


Figura 1.1: Classificazione strutturale dei neuroni.

Neuroglia

La neuroglia svolge nel tessuto nervoso le stesse funzioni svolte dal tessuto connettivo negli altri parenchimi. Le funzioni principalmente svolte sono le seguenti:

- Formare l'impalcatura di sostegno per le cellule nervose;
- Controllare il fluido tissutale che circonda i neuroni;
- Svolgere la funzione di difesa, alcune cellule della neuroglia sono macrofagi;
- Costituire la guaina mielinica che avvolge gli assoni.

Neuroglia del SNC

Nel SNC troviamo quattro tipi diversi di cellule gliali: *astrociti*, *oligodendrociti*, *microglia* e *cellule ependimali*. Esse si differenziano per dimensione, organizzazione intracellulare e per la presenza di specifici processi citoplasmatici (Figura 1.2).

Astrociti

Sono le cellule gliali più grandi e più numerose. I loro processi si pongono in contatto con i soma, gli assoni e con le pareti dei capillari. Esse proteggono i neuroni dal contatto diretto con altri neuroni e limitano la loro esposizione ai liquidi interstiziali. Svolgono una funzione di sostegno per i neuroni e di regolazione della conduzione del segnale. I loro prolungamenti, infatti, entrano in stretto rapporto sia con i vasi sanguigni che con i neuroni e, attraverso le numerose pompe ioniche di cui sono dotati, modulano la propagazione degli stimoli nervosi e il flusso sanguigno per mantenere l'ambiente ionico adatto alla conduzione del segnale.

Gli astrociti si occupano anche della riparazione del tessuto nervoso danneggiato. In caso di danni, essi proliferano generando tessuto cicatriziale per stabilizzare il tessuto nervoso danneggiato.

Oligodendrociti

Gli oligodendrociti rispetto agli astrociti hanno corpi cellulari più piccoli e un numero inferiore di processi. Essi si occupano di tenere uniti gli assoni di più neuroni per migliorarne le funzionalità. Attraverso le estremità appiattite dei processi, gli oligodendrociti si avvolgono attorno agli assoni formando una guaina pluristratificata composta principalmente da fosfolipidi, denominato *mielina*, che migliora la velocità di propagazione dell'impulso nervoso. In genere più oligodendrociti cooperano nella formazione della guaina mielinica che si estende lungo l'intera lunghezza dell'assone. La guaina di mielina è quindi costituita da più parti giustapposte; le interruzioni tra le porzioni di mielina vengono denominate *nodi di Ranvier*. Non tutti gli assoni vengono mielinizzati dagli oligodendrociti, esistono infatti neuroni amielinici.

Microglia

Le cellule della microglia sono le più piccole cellule gliali. Sono caratterizzate da sottili processi citoplasmatici che si dividono in numerose sottili ramificazioni. Nel SNC la microglia svolge la funzione di difesa poiché si occupa di inglobare detriti cellulari, prodotti di rifiuto e agenti patogeni. In caso di infezioni o insulti, le cellule della microglia si dividono aumentando notevolmente il loro numero.

Cellule ependimali

Sono le cellule cubiche poco differenziate che formano l'ependima, l'epitelio che riveste i ventricoli cerebrali e il canale centrale del midollo spinale. Le cellule ependimali oltre a

controllare il flusso del liquido cerebrospinale tra i due versanti, ne regola anche la composizione.

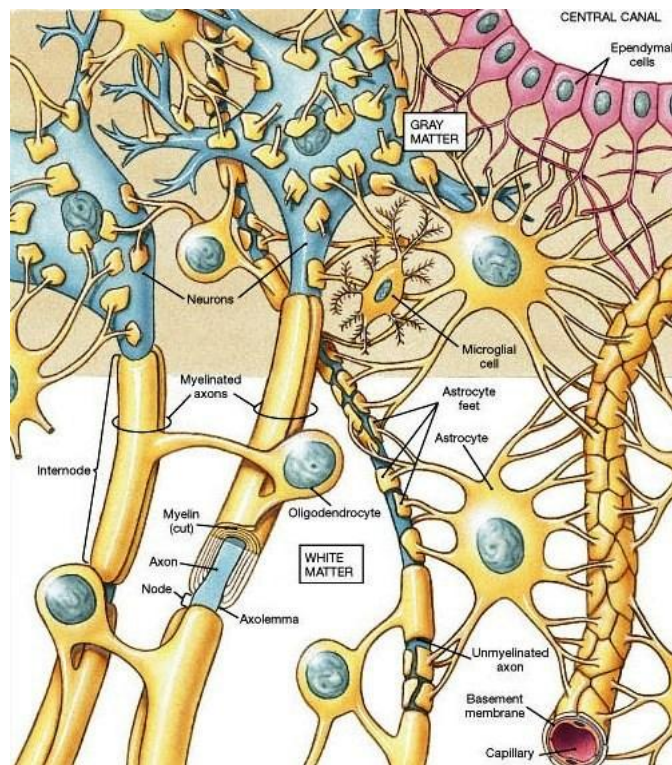


Figura 1.2: Neuroglia del Sistema Nervoso Centrale.

Neuroglia del SNP

Nel SNP i pironofori si trovano raggruppati in *gangli*, mentre gli assoni sono tenuti insieme da tessuto connettivale a formare i *nervi periferici*. I pironofori e gli assoni del SNP sono protetti dall'ambiente circostante da due tipi di cellule gliali: le *cellule di Schwann* e le *cellule satelliti*.

Cellule di Schwann

Le cellule di Schwann proteggono gli assoni del SNP rivestendoli completamente oppure avvolgendoli con la guaina mielinica. Sebbene il meccanismo di mielinizzazione delle cellule di Schwann differisca da quello degli oligodendrociti, anche gli assoni del SNP presentano i nodi di Ranvier e la guaina di mielina che aumentano la velocità di conduzione dell'impulso nervoso. Inoltre, nel SNP una singola cellula di Schwann può rivestire diversi assoni mielinici (Figura 1.3).

Cellule satelliti

Avvolgono completamente i corpi cellulari dei neuroni gangliari interrompendosi soltanto a livello dei loro prolungamenti. Regolano gli scambi di nutrienti e scorie tra i pirenofori e il fluido extracellulare.

[Nico B., 2007; Martini F. H., 2002]

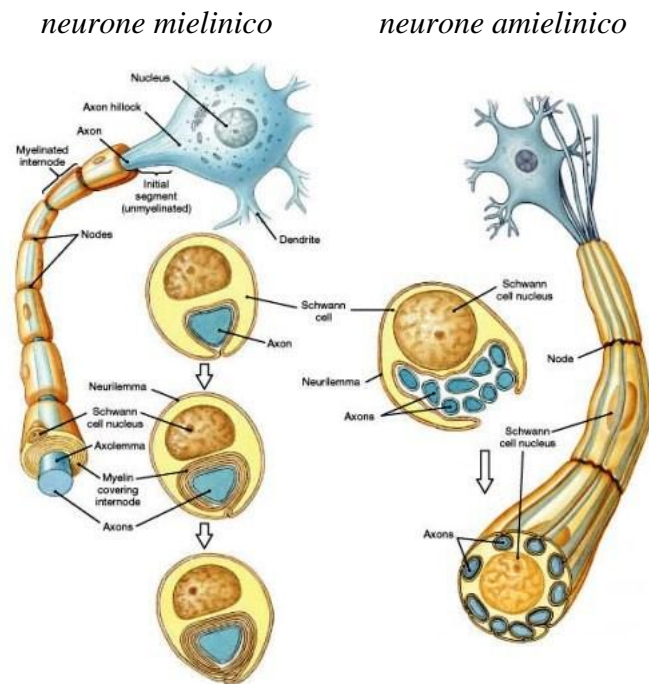


Figura 1.3: Cellula di Schwann e assoni periferici.

Il tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato nella funzione di sostegno. L'appartenenza del tessuto osseo ai tessuti connettivi è confermata sia dalla sua origine dal mesenchima, il tessuto embrionale da cui derivano tutti i tessuti connettivi, sia dalla sua composizione, essendo la matrice extracellulare costituita da fibre collagene e sostanza fondamentale anista.

La peculiarità del tessuto osseo è di essere mineralizzato. La presenza di minerali e la particolare distribuzione delle componenti organiche nella matrice extracellulare 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 rappresenta 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 ioni 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.

Morfologia del tessuto osseo

Da un punto di vista macroscopico, si distinguono due varietà di osso: l'osso compatto e l'osso spugnoso (Figura 1.4).

Ossso compatto

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.

La matrice ossea dell'osso compatto è organizzata in lamelle che formano delle cavità denominate lacune ossee, all'interno delle quali si trovano gli osteociti. Le lamelle dell'osso compatto si organizzano generalmente in 3 modi diversi:

- Concentricamente attorno a canali vascolari formando strutture cilindriche orientate lungo l'asse maggiore dell'osso denominate *sistemi di Havers* od *osteoni*;
- Negli spazi attorno gli osteoni, assumendo varie dimensioni e forme irregolari, costituiscono i *sistemi interstiziali*;

- Sotto il periostio (strato di tessuto connettivale sulla superficie esterna delle ossa) e sopra l'endostio (il tessuto connettivo sulla superficie interna delle ossa) a formare le lamelle *circonferenziali esterne ed interne*.

Nell'osso compatto si possono distinguere due categorie di canali vascolari:

- i *canali di Harves*: canali longitudinali disposti al centro degli osteoni contenenti uno o due vasi;
- i canali di *Volkman*: canali trasversali che interconnettono i canali di Harves.

Osso spugnoso

L'osso spugnoso lo si ritrova principalmente all'interno delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe.

Esso è costituito da una rete tridimensionale di spicole ossee ramificate denominate *trabecole*, che delimitano un labirinto di spazi interconnessi occupati dal midollo osseo ematopoietico.

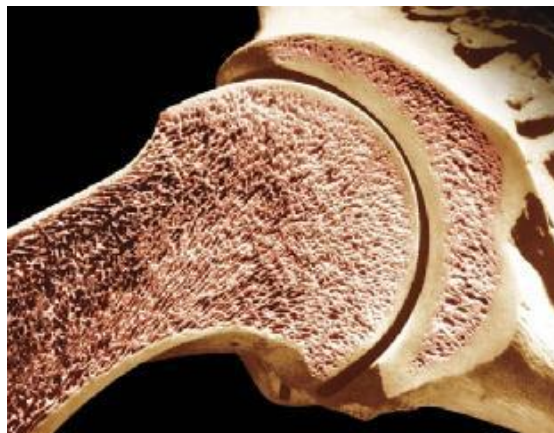


Figura 1.4: Distribuzione dell'osso compatto e dell'osso spugnoso nelle ossa.

Matrice extracellulare dell'osso

Essendo un tessuto connettivo, il tessuto osseo contiene una quota rilevante di matrice extracellulare organica, composta da fibre connettivali e da sostanza fondamentale anista, a cui si aggiunge inoltre la componente minerale.

Matrice organica

Favorisce la resistenza alla trazione e alla pressione. È composta da:

- *fibre connettivali*: sono rappresentate per la quasi totalità da fibre collagene di tipo I, caratterizzate da un gran numero di legami crociati che tengono unite le singole molecole

di tropocollagene. L'abbondante contenuto in collagene è la causa principale della marcata acidofilia della sostanza intercellulare dell'osso.

Le fibre di collagene si aggregano a formare fibre collagene di spessore rilevante (5-10 μm) soltanto nel cosiddetto *tessuto osseo fibroso*, invece nel *tessuto osseo lamellare* le microfibrille collagene (spesse circa 60 nm) formano una rete tridimensionale omogenea.

Le fibre connettivali sono particolarmente abbondanti nel periostio da dove 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.

- *fibre elastiche*: sono virtualmente assenti nel tessuto osseo e le fibre reticolari sono localizzate solo a livello della membrana basale che circonda i vasi sanguigni intraossei.
- *sostanza fondamentale anista*: ha una composizione peculiare e in buona misura diversa da quella degli altri tessuti connettivi. È composta da diverse macromolecole:
 - . Proteoglicani: composti da glicosaminoglicani acidi solforati (cheratansolfato, condroitinsolfato) uniti assieme da brevi catene proteiche.
 - . Glicoproteine: includono diverse molecole alcune delle quali sono ritenute giocare un ruolo fondamentale nel controllo dei processi di mineralizzazione. Tra queste si distinguono:
 - a) 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 vicinanze creando così le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio.
 - b) 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.
 - c) Fosfatasi alcalina: un enzima capace di idrolizzare i gruppi fosfato di substrati organici in ambiente basico. È coinvolta nei processi di mineralizzazione, mettendo a disposizione gli ioni fosfato per la formazione dei cristalli minerali.

- . Sialoproteine (BSP): particolari glicoproteine contenenti residui di acido sialico. Queste proteine possiedono le sequenze aminoacidiche RGD (Arg-Gly-Asp) responsabili dell'adesione delle cellule alla matrice ossea. Ad esse appartiene l'osteopontina.
- . Proteine contenenti l'acido γ -carbossiglutammico (GLA): grazie alla presenza del GLA esse sono in grado di chelare cationi bivalenti come lo ione calcio. Nell'osso si distinguono due proteine contenenti il GLA:
 - a) Osteocalcina: una piccola proteina contenente 3 o 5 residui di GLA. È coinvolta nell'inibizione della mineralizzazione della matrice in quanto lega ioni calcio e li rende indisponibili per la combinazione con lo ione fosfato, inibendo così l'accrescimento dimensionale dei cristalli minerali. Essa abbonda nel tessuto osseo maturo mentre è scarsa nel tessuto osseo in via di sviluppo (tessuto osteoide).
 - b) Proteina GLA della matrice: dal peso molecolare maggiore rispetto alla osteocalcina, è presente sia nell'osso maturo che nel tessuto osteoide, nonché nella cartilagine destinata a essere sostituita da tessuto osseo.

Matrice inorganica

La componente minerale rappresenta il 65% del peso secco dell'osso. La sua funzione è quella di conferire durezza e rigidità al tessuto osseo. Essa è costituita da cristalli di calcio, prevalentemente fosfato di calcio a cui si aggiungono quantità minori di carbonato di calcio, fluoruro di calcio e fosfato di magnesio. Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{2+}$) le cui cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni ossidrile (OH^-), formando così l'idrossiapatite.

I cristalli di idrossiapatite hanno la forma di aghi lunghi e sottili, spessi circa 2 nm e lunghi 20-40 nm, che tendono a disporsi parallelamente tra sé e le microfibrille collagene, ricoprendone la superficie e permeandone le porosità.

Durante il processo di mineralizzazione dell'osso, il fosfato di calcio precipita inizialmente sotto forma di minutissimi aggregati amorfi. Questi nuclei iniziali di concrezione minerale vengono rapidamente rimpiazzati da sottilissimi cristalli aghiformi disposti parallelamente alle molecole filamentose della sostanza fondamentale detti filamenti assili. Tali cristalli crescono assumendo l'aspetto tipico dei cristalli di apatite, occupando progressivamente gran parte dello spazio interposto tra le microfibrille collagene e permeando le microfibrille stesse. Una volta formati i cristalli di apatite, la deposizione di nuovo minerale può avvenire sia per

formazione di nuovi cristalli che per apposizione sui cristalli preesistenti. Tale fenomeno è finemente regolato dalle cellule ossee tramite la produzione di specifiche molecole della matrice ossea.

Cellule dell'osso

Nel tessuto osseo si distinguono quattro tipi di cellule: le cellule *osteoprogenitrici* (dette anche pre-osteoblasti), gli *osteoblasti*, gli *osteociti* e gli *osteoclasti*. Di queste, le cellule osteoprogenitrici, gli osteoblasti e gli osteociti sono in realtà fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare e derivano dalla cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi. Gli osteoclasti, invece, derivano da precursori immigrati dal sangue nel tessuto osseo, i cosiddetti pre-osteoclasti, i quali derivano dalle cellule staminali del midollo osseo ematopoietico.

Cellule osteoprogenitrici

I pre-osteoblasti hanno forma fusata o ovalare, nucleo a cromatina dispersa (eucromatico) con un grande nucleolo e un citoplasma scarso e basofilo per la presenza di un gran numero di poliribosomi liberi, mentre 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, il cosiddetto *strato osteogenico di Ollier*, riccamente vascolarizzato e a livello dell'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 può esplicarsi anche durante la vita adulta. Esse sono in grado di produrre e secernere i fattori di crescita e di differenziamento, le cosiddette, *bone morphogenetic proteins* (BMP). Quando imboccano la via del differenziamento, le cellule osteoprogenitrici si trasformano in osteoblasti.

Osteoblasti

Gli osteoblasti sono le cellule primariamente responsabili della sintesi della matrice extracellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Essi hanno forma globosa o poliedrica e tendono ad allinearsi formando delle lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Nella fase di attiva deposizione della matrice ossea, gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20 μm), un nucleo rotondeggiante eucromatico con grande nucleolo, un citoplasma abbondante e basofilo con granulazioni PAS-positive, un apparato del Golgi ben sviluppato e numerosi mitocondri di forma allungata. Gli osteoblasti si

caratterizzano per la positività alla fosfatasi alcalina ed appaiono provvisti di piccoli granuli citoplasmatici di colore rosa contenenti i precursori delle glicoproteine della matrice ossea. Nella parte rivolta verso la matrice ossea in via di mineralizzazione essi presentano numerose vescicole ricche di proteoglicani che, una volta espulsi, costituiranno i nuclei di mineralizzazione.

Gli osteoblasti sono collegati tra loro e con gli osteociti vicini tramite giunzioni serrate per lo scambio di molecole segnale che coordinano l'attività metabolica e la deposizione della matrice ossea.

Osteociti

Gli osteociti sono le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento e rimaneggiamento. Sono cellule terminali, con una autonomia di vita finita.

L'osteocita è una cellula stellata, con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e numerosi prolungamenti citoplasmatici. Presenta un nucleo eterocromatico (con cromatina condensata) con un piccolo nucleolo ed un citoplasma perinucleare piuttosto scarso e basofilo. Gli organuli citoplasmatici, RER e apparato del Golgi tendono a ridurre le proprie dimensioni a mano a mano che la cellula invecchia finché essa muore per apoptosi.

Nel tessuto osseo l'osteocita è racchiuso in una nicchia scavata nella matrice ossea, detta *lacuna ossea*, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i suoi prolungamenti si estendono all'interno di sottili canali definiti *canalicoli ossei*. Ogni osteocita è in contatto con gli osteociti circostanti attraverso giunzioni serrate alle estremità dei loro prolungamenti. Acqua e metaboliti riescono a raggiungere tutti gli osteociti, anche quelli più distanti dai vasi sanguigni, mediante il tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie interna comunicante delle lacune e dei canalicoli ossei. Inoltre metaboliti e molecole segnale disciolti nel citoplasma possono essere scambiate tra gli osteociti attraverso le giunzioni serrate.

Osteoclasti

Gli osteoclasti sono le cellule preposte al riassorbimento osseo. Esse derivano dai pre-osteoclasti che originano nel midollo osseo ematopoietico e vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi del riassorbimento osseo, dove fondono insieme originando gli osteoclasti attivi, elementi sinciziali capaci di dissolvere la componente minerale e di digerire le componenti organiche del tessuto osseo.

Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200 μm) con citoplasma acidofilo e plurinucleate; in un singolo osteoclasto possono essere presenti fino a 50 nuclei con cromatina

lassa e nucleolo ben evidente. Quando l'osteoclasto è attivato aderisce alla matrice mineralizzata e in seguito alla sua azione erosiva si crea una cavità, denominata *lacuna di Howship*. Il versante della cellula che si appone all'osso è caratterizzato dal cosiddetto *orletto increspato*, un ispessimento della superficie cellulare composto da un gran numero di lamine citoplasmatiche, diverse tra loro per calibro e lunghezza, che ampliano notevolmente l'estensione del plasmalemma. Attraverso l'orletto increspato l'osteoclasto aderisce strettamente alla superficie dell'osso da riassorbire, delimitando l'ambiente extracellulare dove libera le sostanze osteolitiche, denominata *zona sigillata*. Il riassorbimento della matrice ossea inizia con la dissoluzione della componente minerale dovuta all'acidificazione del microambiente della zona sigillata, seguita dall'esocitosi di enzimi lisosomiali che digeriscono i componenti organici della matrice ossea. Inoltre, l'osteoclasto stimola gli osteoblasti a liberare l'enzima collagenasi che contribuisce con la sua attività litica alla digestione della matrice organica dell'osso.

Una volta formata una prima lacuna, l'osteoclasto si distacca dalla matrice ossea, si muove per moto ameboide su una porzione di osso adiacente, aderisce nuovamente e forma una nuova lacuna.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali.

Istogenesi dell'osso

L'osso si sviluppa sempre per sostituzione di un preesistente tessuto, sia esso il mesenchima oppure un tessuto connettivo differenziato. I processi che portano alla genesi di tessuto osseo nel contesto di un altro tessuto prendono il nome di *ossificazione* o di *osteogenesi*. Questi processi sono massimi durante la vita prenatale e rimangono sostenuti per tutto il periodo dello sviluppo somatico.

Si distinguono due tipi di ossificazione:

- Ossificazione diretta, o membranosa;
- Ossificazione indiretta, o condrale.

Ossificazione diretta

L'ossificazione diretta, o membranosa, è tipica delle ossa piatte. Essa inizia da centri di ossificazione che si sviluppano nel mesenchima in fasi precoci della vita fetale, oppure in membrane di tessuto connettivo fibroso denso evolute dal mesenchima in fasi più tardive della vita intrauterina e nella vita postnatale.

L'ossificazione diretta ha inizio quando accanto a una ricca trama vascolare le cellule mesenchimali si differenziano in cellule osteoprogenitrici, le quali a loro volta si trasformano in osteoblasti. Mediante giunzioni serrate gli osteoblasti si dispongono in filiere simil-epiteliali ed iniziano a deporre la matrice organica dell'osso, il tessuto osteoide. Quando il tessuto osteoide va incontro a mineralizzazione si trasforma in osso fibroso e gli osteoblasti restano racchiusi in lacune ossee trasformandosi in osteociti. Successivamente i pre-osteoclasti differenziano in osteoclasti che dissociano l'osso fibroso, che viene rimpiazzato da osso lamellare.

Ossificazione indiretta

L'ossificazione indiretta, o condrale, è la variante più diffusa. Tipicamente, l'osso è preceduto da un abbozzo cartilagineo che richiama la forma del futuro segmento osseo e che viene successivamente riassorbito e rimpiazzato da tessuto osseo. L'osso si può formare sia all'interno dell'abbozzo cartilagineo (ossificazione endocondrale), sia sulla superficie esterna della cartilagine a contatto con il pericondrio (ossificazione pericondrale).

L'ossificazione pericondrale inizia nel pericondrio dove cellule osteoprogenitrici si differenziano in osteoblasti che depositano il tessuto osteoide, il quale mineralizzando si trasforma in osso fibroso poi rimaneggiato dagli osteoclasti, con successiva deposizione di osso lamellare. L'osso così generato si appone direttamente alla superficie della cartilagine, al di sotto del pericondrio che si trasforma in periostio.

L'ossificazione endocondrale ha inizio quando i condrociti dell'abbozzo cartilagineo vanno incontro a ipertrofia. Nel loro citoplasma compaiono gocce di grasso, accumuli di glicogeno e granulazioni PAS-positive simili ai globuli calcificanti degli osteoblasti; liberano vescicole inducendo la calcificazione della matrice cartilaginea e alla fine vanno incontro ad apoptosi.

La matrice cartilaginea calcificata viene in parte erosa grazie all'intervento di cellule di natura osteoclastica, provenienti dal osso circostante già formato, generando ampie lacune cartilaginee che confluiscono tra di loro all'interno delle quali penetrano vasi sanguigni che si fanno strada a partire dal pericondrio, accompagnati da cellule mesenchimali. Quest'ultime si differenziano in cellule osteoprogenitrici e poi in osteoblasti, i quali depongono osso fibroso a ridosso dei residui della matrice cartilaginea calcificata. In ultimo intervengono gli osteoclasti, che riassorbono sia l'osso fibroso che la matrice cartilaginea mineralizzata, mentre nuovi osteoblasti depongono osso lamellare. Parte delle cellule mesenchimali penetrate assieme ai vasi sanguigni danno origine a nuovi vasi e al midollo osseo ematopoietico.

[Zallone A., 2007; Capitani S, 1996]

Il dente

I denti derivano dalla mucosa orale; possono essere considerati come papille modificate la cui superficie è ricoperta da uno spesso strato di sostanza calcificata originante in parte dall'epitelio ed in parte dal tessuto connettivo.

Struttura macroscopica del dente

Tutti i denti sono costituiti da due porzioni: la *corona* che sporge dalla gengiva e la *radice* appuntita che è accolta in una cavità della mascella o della mandibola denominata *alveolo dentale*, connessa all'osso alveolare da un cuscinetto di tessuto connettivo fibroso, ovvero dal legamento parodontale. La regione in cui la corona e la radice si continuano l'uno con l'altro viene detta *colletto*.

Il dente contiene una piccola cavità denominata *cavità pulpare* che si continua in ciascuna radice con uno stretto canale che continua con la guaina periodontale tramite una o più aperture poste all'apice radicolare (Figura 1.5).

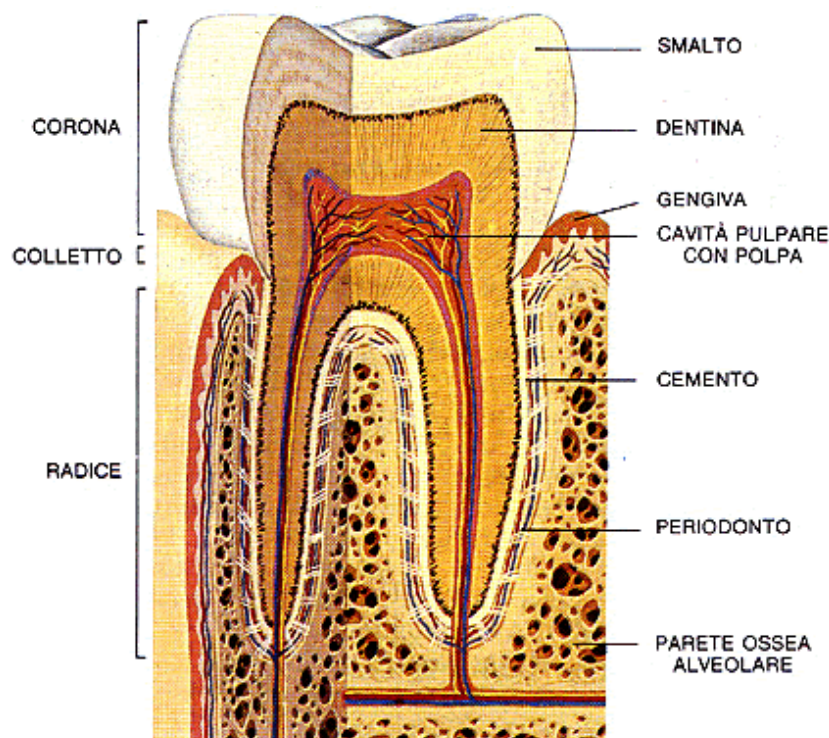


Figura 1.5: Struttura macroscopica del dente.

La sostanza compatta del dente è rappresentata da tre differenti tessuti: la dentina, lo smalto e il cemento. La maggior parte del dente è formata dalla *dentina* che circonda la cavità pulpare, raggiunge il massimo spessore nella corona e si assottiglia procedendo verso l'apice della radice. Nella regione della corona, la superficie esterna della dentina è ricoperta da uno strato di *smalto*, che raggiunge il suo massimo spessore nella parte esposta della corona e si assottiglia verso il colletto. Nella regione della radice, la dentina è ricoperta da un sottile strato di *cemento* che lascia libera l'apertura del canale radicolare. Smalto e cemento si incontrano in corrispondenza del colletto del dente.

Le parti molli del dente sono la *polpa*, che riempie la cavità pulpare, la *guaina periodontale*, che connette la superficie della radice ricoperta dal cemento con l'osso alveolare e la *gengiva* che è quella porzione della mucosa orale che circonda il dente.

Struttura microscopica del dente

Lo smalto

Lo smalto è il tessuto superficiale che riveste la corona del dente; in senso verticale si giustappone al cemento in corrispondenza del colletto.

Esso è un tessuto di derivazione ectodermica, avascolare, acellulare, privo di terminazioni nervose, durissimo ed altamente mineralizzato. Il 96% del peso dello smalto maturo è composto da materiale inorganico, l'1% da matrice organica e il 3-4% da acqua.

La componente inorganica presenta prevalentemente la struttura tipica dell'idrossiapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, mentre solo una piccola parte si trova sotto forma amorfa. Nella idrossiapatite dello smalto si possono verificare delle sostituzioni di ioni con altri di carica equivalente, andando così a modificare il reticolo cristallino originale e di conseguenza le caratteristiche fisiche e chimiche dello smalto stesso. La composizione dello smalto varia in base alla facilità con cui possono avvenire scambi di ioni nella struttura dell'apatite, infatti risente della concentrazione di ioni presenti nelle varie fasi di sviluppo e, ad eruzione avvenuta, nei fluidi orali. Ad esempio, nei primi stadi maturativi vengono incorporati sodio, carbonato, magnesio, mentre quando il dente erompe in arcata, è più facile l'incorporazione di fluoro.

I cristalli di idrossiapatite hanno la forma di poliedri a base esagonale con lunghezza media di 160 nm e larghezza di 40 nm. Essi costituiscono l'unità strutturale dello smalto, ovvero il *prisma dello smalto*. Lo smalto è formato da 4 a 13 milioni di prismi, che si estendono allineati tra loro dalla giunzione amelo-dentinale (linea di giunzione fra la dentina e lo smalto)

fino alla superficie esterna dello smalto. Fra un prisma e l'altro si interpone la matrice interprismatica non calcificata, la cui presenza è espressione di recente formazione dello smalto; infatti la matrice organica tenderà a scomparire progressivamente con l'avanzare dell'età. La matrice organica nello smalto maturo è composta da enameline, lipidi a basso peso molecolare, alcuni carboidrati e acidi organici (come citrato e lattato). Alla componente organica è legata una minima parte di acqua; essa è legata per la maggior parte alla componente minerale, dove è responsabile dello strato idratante necessario per facilitare gli scambi ionici e il trasporto di molecole.

Nonostante lo smalto sia il tessuto più duro dell'organismo, è molto fragile a causa dell'elevata elasticità e alla bassa forza di tensione. Ciò nonostante, durante la masticazione, riesce a sopportare grossi carichi grazie all'elevata resistenza alla compressione dello strato sottostante di dentina, che funge da cuscinetto. Lo smalto svolge anche un'altra importante funzione: protegge la polpa da stress termici grazie alla sua bassa conducibilità termica. Infine è scarsamente permeabile e solubile agli acidi.

La dentina

La dentina è un tessuto connettivo avascolare mineralizzato di origine mesenchimale. Essa circonda la polpa sia nella corona, nella quale sottende lo smalto, che nella radice dove è posta al di sotto del cemento.

La dentina è composta in peso per il 70% da materiale inorganico, per il 18% da matrice organica e per il 12% da acqua. Tali percentuali differiscono molto a seconda del livello di maturazione della dentina o della presenza di dentina sclerotica altamente calcificata. La matrice inorganica è costituita da cristalli di idrossiapatite più piccoli rispetto a quelli dello smalto, contenenti carbonati e tracce di altri elementi. La componente organica è costituita principalmente da collagene di tipo I, il rimanente 10-20% è formato da proteoglicani, da proteine altamente fosforilate, da lipidi (colesterolo e fosfolipidi), da proteine contenenti γ -carbossiglutammati, da acido citrico e da lattati.

Lo spessore della dentina aumenta in direzione centripeta lungo il corso della vita, sottraendo spazio alla polpa. La deposizione di dentina in strati successivi produce linee di accrescimento parallele denominate *linee di Owen*. Longitudinalmente sono invece presenti i *canalicoli dentinali*, che si irradiano dalla camera pulpare verso la periferia, permeando tutta la dentina. Ogni canalicolo dentinale contiene un prolungamento protoplasmatico degli odontoblasti denominato *fibra di Tomes*. Gli odontoblasti sono le cellule che producono dentina e che

costituiscono uno strato epitelioido sulla parete della cavità pulpare; da qui essi inviano i loro prolungamenti nei canalicoli dentinali.

Il diametro dei canalicoli dentinali è massimo vicino alla polpa (2-3 μm) e si riduce progressivamente in prossimità dello smalto o del cemento per aumento della dentina peritubulare. La dentina peritubulare è una dentina altamente mineralizzata che riveste la parete interna dei canalicoli dentinali. Con l'aumentare dell'età e in caso di difesa da stimoli irritanti, si ha un'ulteriore deposizione di dentina peritubulare con conseguente riduzione del diametro dei tubuli. La maggior parte della dentina è costituita da dentina intertubulare, meno mineralizzata.

Per quanto riguarda le proprietà fisiche, la dentina è meno dura e mineralizzata dello smalto ed è molto permeabile e sensibile, caratteristiche che aumentano con l'incremento del numero e del diametro dei canalicoli dentinali.

La polpa

La polpa è il tessuto connettivo lasso di origine mesenchimale, contenuto all'interno della camera pulpare della corona e dei canali radicolari, dove circonda vasi e nervi e comunica con il parodonto tramite uno o più forami apicali.

La polpa è composta da cellule immerse in una matrice extracellulare costituita da sostanza fondamentale e da fibre collagene. La matrice intercellulare è composta per il 25% da fibre collagene di tipo I di tipo III, e da sostanza fondamentale composta da acqua (75% della polpa) e proteoglicani. La sostanza fondamentale rappresenta il mezzo attraverso cui i metaboliti ed i prodotti di rifiuto si diffondono nella polpa.

La polpa è costituita da una popolazione eterogenea di fibroblasti, cellule mesenchimali indifferenziate, linfociti e macrofagi.

Con l'avanzare dell'età si verifica una progressiva diminuzione della popolazione cellulare e un aumento numerico e volumetrico delle fibre collagene, soprattutto a livello della radice.

La polpa contiene molti vasi sanguigni: piccole arterie, accompagnate da vene, penetrano in ciascuna radice e nella cavità pulpare a formare una fitta rete di capillari di grosso calibro a contatto con gli odontoblasti; da questa rete originano vene che occupano la parte centrale della polpa.

Attraverso i canali della radice penetra nella camera pulpare una ricca innervazione costituita da fibre mieliniche sensitive appartenenti al nervo trigemino, correlate alla percezione dello stimolo doloroso acuto, fibre amieliniche, sia ortosimpatiche regolatrici del flusso ematico

provenienti dal ganglio cervicale superiore, sia fibre sensitive che raccolgono stimoli termici, meccanici e chimici e che sono correlate al dolore spontaneo, gravativo e cronico.

Il cemento

Il cemento è il tessuto di origine mesenchimale che riveste la dentina a livello radicolare e che garantisce l'ancoraggio delle fibre del legamento parodontale alla superficie radicolare.

Da un punto di vista funzionale, oltre a fissare le fibre del legamento parodontale alla radice, il cemento contribuisce ai processi riparativi successivi a un danno della superficie radicolare.

Il cemento viene continuamente depositato dai cementoblasti nel corso della vita, il suo spessore aumenta quindi con l'età. L'incremento è maggiore a livello apicale, dove il cemento si presenta in uno strato di 150-250 μ m, mentre nella porzione del colletto lo spessore è di soli 20-50 μ m.

Il cemento è un tessuto meno duro e mineralizzato della dentina e dello smalto e presenta una forte somiglianza con l'osso, da cui differisce per l'assenza di vascolarizzazione propria; non possiede, inoltre, innervazione.

Il cemento è costituito per il 65% da matrice inorganica, rappresentata soprattutto da piccoli cristalli di idrossiapatite, e per il 23% da matrice organica formata in gran parte da fibre collagene di tipo I e in minima parte da sostanza fondamentale. Il restante 12% è costituito da cellule. Le fibre collagene possono essere intrinseche, ovvero prodotte dai cementoblasti, o estrinseche, derivanti dal legamento parodontale. Queste ultime prevalgono nel cemento acellulare, cioè nel sottile strato che riveste tutta la dentina radicolare. Le fibre intrinseche, invece, sono rappresentate soprattutto a livello del cemento cellulare, ovvero in quello strato di formazione più recente, nel quale i cementociti sono contenuti in lacune cementocitarie.

Istogenesi del dente

Le cellule delle creste neurali migrando nella regione della testa e del collo si mescolano alle cellule mesodermiche a formare l'*ectomesenchima* che differenziando darà origine alle strutture connettivali del cranio, collo, faccia e apparato dentale.

Le interazioni reciproche tra neuroectoderma e mesenchima controllano la morfogenesi dei denti, che si articola attraverso quattro fasi: lo stadio della lamina dentale, lo stadio a gemma, lo stadio a cappa e lo stadio a campana (Figura 1.6).

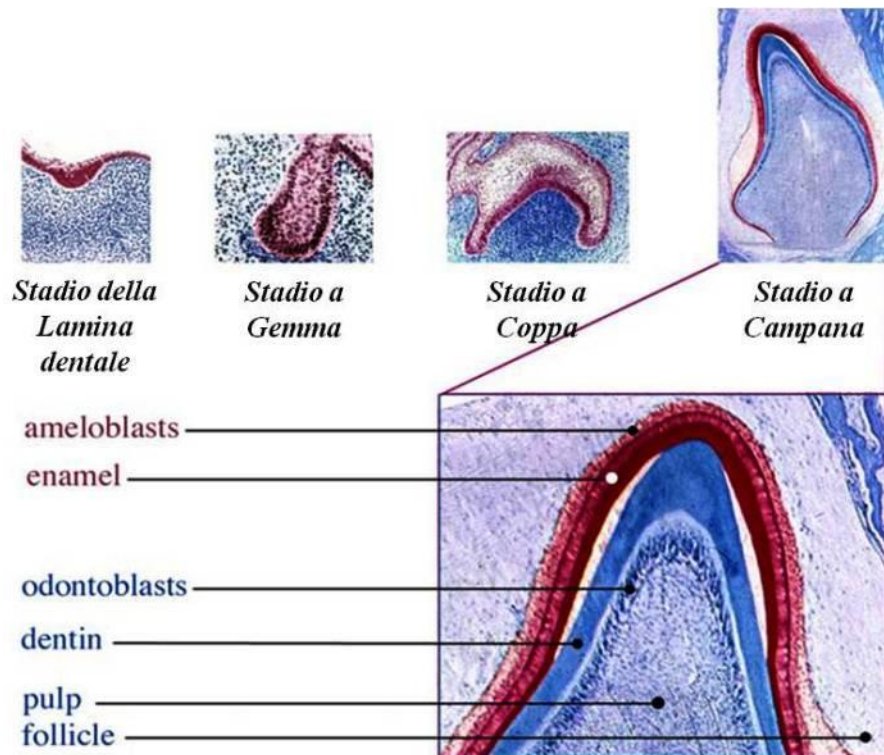


Figura 1.6: Le fasi di sviluppo del dente umano. Sezioni istologiche colorate con ematossilina eosina: in arancione i tessuti epiteliali e i suoi derivati (ameloblasti e smalto), in azzurro i tessuti mesenchimali e i suoi derivati (odontoblasti, dentina, polpa dentale e follicolo). [Bluteau G., 2008]

Stadio della Lamina Dentale

Durante la 6^a settimana di sviluppo dell'embrionale, si verifica un ispessimento del foglietto epiteliale che riveste la cavità orale, in corrispondenza dei punti dove verranno a trovarsi i processi alveolari. La proliferazione di questo epitelio determinerà la formazione della *lamina dentale* a forma di un ferro di cavallo, che proliferando darà origine alle porzioni ectodermiche delle strutture dentali.

Stadio a Gemma

Verso l'8^a settimana di sviluppo embrionale, la lamina dentale prolifera dando origine a una struttura sferoidale all'interno del mesenchima. Alla fine del processo proliferativo si ha la formazione dell'*organo dello smalto* da parte delle strutture ectodermiche, che assumono una conformazione concava. Questo cambiamento morfologico coincide con l'inizio della proliferazione del mesenchima negli abbozzi dentali.

Stadio a Coppa o Coppa

All'11^a settimana intrauterina, il mesenchima inizia a proliferare e si organizza a formare la *papilla dentale*, da cui deriverà la polpa dentale. Gli strati cellulari che avvolgono l'organo dello smalto e la papilla dentale iniziano a proliferare formando il *sacco follicolare* che avvolge completamente gli abbozzi dentari. Queste tre strutture: l'organo dello smalto, la papilla dentale e il sacco follicolare costituiscono il germe dentario che darà origine a tutte le strutture del dente e dei tessuti di sostegno (parodonto). Le strutture ectodermiche daranno origine allo *smalto*, la papilla produrrà la *dentina* e la *polpa*, mentre il follicolo darà vita al *cemento* e al *legamento parodontale*.

Stadio a Campana

Verso la 14^a settimana inizia la fase di differenziamento e la morfogenesi del dente. Le cellule dello strato epiteliale interno dell'organo dello smalto si differenziano in ameloblasti, che produrranno lo smalto. Subito dopo dal mesenchima si differenzieranno gli odontoblasti, che invece produrranno la dentina.

Verso la 18^a settimana, inizia la formazione dei tessuti dentali duri: l'amelogenesi e la dentinogenesi. Durante questa fase la lamina dentale si frammenta e si perde quindi la connessione tra l'organo dello smalto e l'epitelio di rivestimento.

Dopo il loro differenziamento, gli odontoblasti vanno incontro al processo di citodifferenziazione: si polarizzano, il nucleo si sposta nella porzione basale, produrranno un processo citoplasmatico allungato nella porzione apicale, ed inizieranno a produrre matrice dentinale. Parallelamente, dopo la formazione del primo strato di dentina, anche gli ameloblasti andranno incontro al processo di citodifferenziazione, polarizzando e producendo la matrice dello smalto.

[Fonzi L., 2000; Ferguson D. B., 2002; Goracci G, 1999; De Felici M., 2009]



Scopo della Tesi

Ad oggi, le potenzialità differenziative delle Cellule Staminali Embrionali sono note ai più, come anche i problemi di natura etica connessi al loro impiego. Da tempo la ricerca si è focalizzata sull'individuazione di fonti alternative di cellule staminali, scoprendo nell'organismo adulto colonie di cellule staminali, denominate Cellule Staminali Adulte. Esse sono state individuate in diversi tessuti specializzati localizzate in nicchie di staminalità, dove il microambiente circostante ne garantisce uno stato indifferenziato e dove svolgono la loro funzione primaria: garantire una scorta di cellule che possano, in seguito a stimoli di varia natura, differenziare nelle cellule specializzate che costituiscono il tessuto di appartenenza.

La plasticità delle Cellule Staminali Adulte e il loro differenziamento in molteplici linee cellulari ha suggerito il loro impiego terapeutico nella rigenerazione e riparazione di tessuti specializzati. In laboratorio, è possibile isolare e amplificare le Cellule Staminali Adulte da una biopsia prelevata da un paziente e ricostruire *in vitro* un tessuto bioingegnerizzato da poter impiantare nello stesso individuo. Il vantaggio principale che distingue le Cellule Staminali Adulte da quelle Embrionali è l'autotrapianto e l'assenza di rigetto.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato la ricostruzione *in vitro* di tessuti mediante la semina, su supporti tridimensionali e in presenza di opportuni fattori differenziativi, di Cellule Staminali Adulte isolate da pelle, tessuto adiposo e polpa dentale. In particolare, sono stati preparati i seguenti costrutti: tessuto nervoso a partire da cellule staminali di pelle e tessuto adiposo seminate su supporto a base di acido ialuronico o fibrina; tessuto osseo vascolarizzato utilizzando cellule staminali di tessuto adiposo seminate su scaffold a base di idrossiapatite e tessuto simil-dentale associando le cellule staminali della polpa dentale a un biomateriale a base di acido ialuronico.

La ricerca ha previsto una fase preliminare in cui è stato determinato il differenziamento in monostrato delle cellule staminali mediante analisi di immunofluorescenza. Appurato la reattività delle cellule staminali ai fattori differenziativi, sono stati effettuati gli esperimenti nelle tre dimensioni. A diversi tempi, i costrutti sono stati sottoposti a test di proliferazione, ad analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione e ad analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR. Inoltre sono state condotte analisi di citogenetica mediante cariotipo e CGH array per appurare la stabilità genetica delle cellule durante il differenziamento.



Materiali e Metodi

Isolamento e coltura di cellule staminali adulte

Cellule staminali adulte da tessuto adiposo (ADSC)

Le cellule staminali da tessuto adiposo (ADSC) sono state isolate da campioni di tessuto adiposo sottocutaneo di pazienti sottoposti ad addominoplastica, previo consenso informato.

Il grasso addominale, lavato in PBS e ridotto in piccoli pezzi è stato digerito in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. La digestione è stata effettuata con una soluzione allo 0.075% di *Collagenase from Clostridium histolyticum type II* (Sigma) in *Hank's Balanced Salts Solution* (HBSS, Lonza). L'attività enzimatica della collagenasi è stata bloccata con un egual volume di *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Lonza) completo, costituito da DMEM, 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) e 1% di Penicillina/Streptomicina (P/S, Lonza). Le cellule, raccolte tramite centrifugazione a 1200 rivoluzioni per minuto (rpm) per 4 minuti, sono state lavate in PBS e filtrate con colino da 70 µm (BD Biosciences) per eliminare i residui della digestione. Infine, le cellule raccolte sono state seminate in fiasche F75 (BD Falcon) con DMEM *low glucose* (Lonza) completo e poste in incubatore umidificato al 5% CO₂ e a 37°C.

A due giorni dalla digestione, le cellule non adese (adipociti maturi e globuli rossi) e il terreno di coltura sono stati eliminati e sostituiti con DMEM *low glucose* completo fresco. In seguito il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni.

Cellule staminali adulte da tessuto cutaneo (SKP)

Le biopsie di tessuto cutaneo sono state ricavate da cute addominale di pazienti sottoposti ad addominoplastica, previo consenso informato.

Le biopsie sono state lavate in PBS, tagliate in pezzi 1 mm × 2 mm e digerite con una soluzione di *Worthington Collagenase type I* a 80 U/ml in HBSS per una notte in incubatore a 37°C e 5% CO₂.

La digestione è stata bloccata aggiungendo un egual volume di DMEM completo e il materiale indigerito è stato allontanato mediante filtrazione con colino da 70 µm. La sospensione cellulare, centrifugata a 1200 rpm per 7 minuti, è stata risospesa in DMEM

completo e posta in F25 (BD Falcon) in incubatore umidificato al 5% CO₂ e a 37°C. Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 2 giorni.

Cellule staminali adulte da polpa dentale (DPSC)

La polpa dentale è stata estratta da terzi molari sani di soggetti adulti, previo consenso informato. Sono stati scelti donatori di ambo i sessi, non fumatori, non sottoposti a terapia farmacologica e privi di infezioni orali e sistemiche. L'estrazione dei terzi molari è stata preceduta da una seduta di igiene dentale.

La polpa dentale è stata isolata tramite rottura meccanica della corona entro 24 ore dall'estrazione di ciascun molare.

La polpa dentale, sminuzzata e lavata in PBS, è stata digerita con una soluzione in HBSS composta da *Worthington Collagenase type I* (3 mg/ml) e da *Dispase II (Roche)* (2 mg/ml) per 1 ora in incubatore umidificato al 5% CO₂ e a 37°C.

La digestione è stata bloccata aggiungendo un egual volume di DMEM completo. Le cellule, raccolte mediante centrifugazione a 1200 rpm per 4 minuti, sono state seminate in *24-well* (BD Falcon) con DMEM completo e poste in incubatore umidificato al 5% CO₂ e a 37°C.

Trascorsi 3 giorni dalla digestione, i residui della digestione e le cellule non adese sono stati eliminati e sostituiti con DMEM completo fresco. In seguito il terreno di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni.

Biomateriali

Sono stati impiegati i seguenti biomateriali:

- Acido ialuronico;
- Fibrina;
- Idrossiapatite.

Per la ricostruzione *in vitro* di tessuto nervoso e di tessuto simil-dentale è stato impiegato un derivato dell'acido ialuronico: lo HYAFF 11[®] (Fidia, Abano Terme, Pd). Poiché l'acido ialuronico è un polimero lineare altamente idrofilo, in ambiente acquoso esso genera un gel viscoso che ne riduce drasticamente la maneggevolezza. Per ridurre l'idrofilia, mantenendo inalterate le sue proprietà biologiche, l'acido ialuronico è stato sottoposto ad un processo di esterificazione dei gruppi carbossilici con alcol benzilico.

Lo HYAFF 11[®] è l'estere benzilico al 100% dell'acido ialuronico. È insolubile in soluzione acquosa ma biodegradabile, in quanto l'idrolisi del legame estereo determina la liberazione dell'acido benzilico (eliminato con le urine) e dell'acido ialuronico che segue la stessa via metabolica dell'acido ialuronico endogeno.

Lo HYAFF 11[®] è stato utilizzato nella forma di tessuto non-tessuto (*non woven*) con un peso specifico di 100 g/m², costituito da fibre spesse 20 µm e dalle dimensioni di 1 cm².

Per la ricostruzione *in vitro* di tessuto nervoso è stata inoltre utilizzata la colla di fibrina umana Tissucol[®] (Baxter, Austria). Il preparato è costituito da due componenti: una soluzione di Tissucol-aprotinina e una soluzione di trombina-cloruro di calcio. La soluzione Tissucol-aprotinina contiene proteine plasmatiche umane coagulabili, tra cui il fibrinogeno, la fibronectina plasmatica, il fattore XIII, il plasminogeno e l'aprotinina. Quando i due componenti vengono mescolati insieme, essi mimano l'ultima fase della coagulazione formando una soluzione viscosa di colla di fibrina bianca ed elastica.

Infine per la ricostruzione del tessuto osseo vascolarizzato sono stati impiegati due differenti biomateriali a base di idrossiapatite: Orthoss[®] (Geistlich Pharma AG, Svizzera) per gli esperimenti *in vitro* e Bio-Oss[®] (Geistlich Pharma AG, Svizzera) negli esperimenti *in vivo*.

Orthoss è costituito da carbonato-idrossiapatite nanocristallina naturale derivante dalla purificazione e sterilizzazione di ossa bovine. Si tratta quindi di una matrice ossea inorganica con una struttura micro e macroporosa simile all'osso spongioso umano. Negli esperimenti *in vitro* è stato utilizzato sottoforma di blocchi dalle dimensioni di 1 cm × 1 cm × 2 cm. Anche Bio-Oss deriva dalla componente minerale della matrice ossea bovina, ma si presenta sottoforma di granuli dalle dimensioni di 0.25-1 mm.

Differenziamento

Il differenziamento neuronale e gliale è stato sviluppato in due fasi: una prima fase in presenza di terreno proliferativo al fine di generare neurosfere, e una seconda fase di differenziamento vero e proprio in senso neuronale o gliale. Di seguito è riportata la composizione dei mezzi di coltura utilizzati a tale scopo.

- Terreno Proliferativo: - DMEM-Ham's F12 Medium 1:1;
- 10% FBS;
 - 1% P/S;
 - 40 ng/ml Fibroblast Growth Factor-basic (FGF-b);
 - 20 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF).

- Terreno Differenziativo Neuronale: - Neurobasal Medium;
- 1% FBS;
 - 1% P/S;
 - 50 ng/ml Nerve Growth Factor-beta (NGF- β);
 - 50 ng/ml Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF);
 - 10 ng/ml Neurotrophin-3 (NT-3).

- Terreno Differenziativo Gliale: - Neurobasal Medium;
- 1% FBS;
 - 1% P/S;
 - 4 mM Forskolina;
 - 10 ng/ml Eregulina β 1.

Per la ricostruzione *in vitro* di tessuto osseo vascularizzato è stato utilizzato un terreno di coltura contenente sia fattori differenziativi osteogenici sia fattori differenziativi endoteliali.

- Terreno Differenziativo Osteo-Endoteliale: - Endothelial Basal Medium;
- 2% FBS;
 - 1% P/S;
 - 10 ng/ml FGF-b;
 - 10 ng/ml EGF;
 - 10 mg/ml Eparina;
 - 1 mg/ml Idrocortisone;
 - 10 mM β -Glicerofosfato;
 - 10 nM Desametasone.

Infine la ricostruzione *in vitro* di tessuto simil-dentale è stata effettuata imbibendo il biomateriale in una miscela di fattori neuronali in presenza di terreno differenziativo endoteliale.

- Miscela di Fattori neuronali:
- 50 ng/ml NGF- β ;
 - 50 ng/ml BDNF;
 - 10 ng/ml NT-3;
 - 4 mM Forskolina;
 - 10 ng/ml Eregulina β 1;
 - 40 ng/ml FGF-b;
 - 20 ng/ml EGF.

- Terreno Differenziativo Endoteliale:
- Endothelial Basal Medium;
 - 2% FBS;
 - 1% P/S;
 - 3 ng/ml FGF-b;
 - 10 ng/ml EGF;
 - 10 mg/ml Eparina;
 - 1 mg/ml Idrocortisone.

Test di proliferazione

Saggio MTT

Il tasso di proliferazione cellulare è stato valutato mediante il saggio MTT, secondo il metodo di Denizot e colleghi [Denizot F., 1986]. Si tratta di un test colorimetrico che misura in modo quantitativo l'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi delle cellule in coltura. Questo enzima, attivo solo nei mitocondri delle cellule vitali, viene normalmente utilizzato come marcatore dell'attività metabolica, della vitalità e della crescita cellulare.

Il test si basa sulla riduzione del composto chimico MTT ovvero *bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*, un colorante azolico di colore giallo, in sali di formazano di colore blu, ad opera della succinato deidrogenasi mitocondriale. La quantità di formazano prodotta è proporzionale all'attività della succinato deidrogenasi mitocondriale e quindi direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. Tramite una lettura spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda di 570 nm, è possibile quantificare i sali di formazano e successivamente correlare il valore di densità ottica (O.D.) al numero di cellule.

Il saggio è stato effettuato incubando per 3 ore i campioni cellulari con 1 ml di soluzione 0.5 mg/ml di MTT in PBS in incubatore umidificato al 5% CO₂ e a 37°C. Successivamente, la soluzione MTT è stata delicatamente eliminata e i sali di formazano sono stati sciolti in 500 μ l

di soluzione estraente (90% isopropanolo e 10% dimetilsolfossido) per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine le soluzioni blu di formazano sono state lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570 nm.

Population Doubling Time

La valutazione della capacità proliferativa delle cellule DPSC ha previsto lo studio del Population Doubling Time (PDT).

L'analisi è stata effettuata ai passaggi p2, p5 e p8 seminando 5×10^4 cellule in pozzetti di *12-well* (BD Falcon). Ad intervalli di 24 ore dalla semina, per ciascun passaggio è stato determinato il numero di cellule adese staccandole con una soluzione di EDTA 0.02% e tripsina 0.25% (Lonza) e contandole con la camera di Bürker (Marienfeld Superior).

Il PDT è stato calcolato applicando la seguente formula:

$$\text{PDT} = (T - T_0) \times \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$$

dove $(T - T_0)$ indica il tempo di coltura espresso in giorni, N_t rappresenta il numero medio delle cellule raccolte al tempo T, mentre N_0 rappresenta il numero delle cellule seminate in ciascun pozzetto al tempo 0.

Studio morfologico

Immunofluorescenza

Le analisi di immunofluorescenza in monostrato sono state eseguite coltivando le cellule su vetrini (con diametro di 19 mm) pretrattati con una soluzione acquosa al 2% di Gelatina B estratta da pelle di bovino (Sigma Aldrich) in presenza di DMEM completo oppure di terreno differenziativo. L'analisi ha richiesto il fissaggio delle cellule sui vetrini con una soluzione di formalina al 3.7% per 15 minuti a temperatura ambiente.

I costrutti tridimensionali invece sono stati fissati in formalina per due ore e successivamente disidratati tramite la scala ascendente degli alcoli: i campioni sono stati immersi in soluzioni di alcol etilico a concentrazione crescente (da 50% a 100%) con doppi passaggi da 15 minuti ciascuno, per eliminare gradualmente il contenuto di acqua, prima di passare in xilene fino alla diafanizzazione. Dopo l'inclusione in paraffina i campioni sono stati tagliati in fette dallo spessore di 6 μm e sottoposti alla reazione di immunofluorescenza.

I campioni, dopo due lavaggi in PBS, sono stati trattati per un'ora con una soluzione di Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) al 2% in PBS per ridurre i legami aspecifici degli anticorpi primari. Successivamente i seguenti anticorpi primari diluiti in BSA al 2% sono stati incubati per una notte a 4°C:

- Chicken anti Human CNPase (Millipore);
- Chicken anti Human β III tubulina (Millipore);
- Mouse anti Human CD31 (Abcam);
- Mouse anti Human Nestina (Covance);
- Mouse anti Human Vimentina (Sigma);
- Rabbit anti Human CD105 (Santa Cruz);
- Rabbit anti Human CD73 (Abcam);
- Rabbit anti Human CD90 (Abcam);
- Rabbit anti Human GFAP (Millipore);
- Rabbit anti Human S100 (Sigma);
- Rabbit anti Human von Willebrand Factor (Dako).

Dopo un lavaggio in PBS, i campioni sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi secondari:

- Goat anti Chicken IgG (H + L) TRITC labeled (KPL);
- Goat anti Mouse IgG (H + L) FITC labeled (KPL);
- Goat anti Rabbit IgG (H + L) TRITC labeled (KPL).

In seguito a un lavaggio in PBS, i nuclei sono stati marcati con Hoechst 33342 (Sigma) 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo un breve lavaggio in PBS, è stato effettuato il montaggio su vetrini portaoggetto con ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen).

Le immagini di immunofluorescenza sono state acquisite al microscopio Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Germania) accoppiato alla telecamera Leica DC500 e al software Leica IM1000 Image Manager v1.20 (Leica, Germania). Le immagini sono state acquisite ad ingrandimenti 40 \times .

Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

I costrutti, precedentemente lavati in PBS, sono stati fissati con una soluzione di glutaraldeide al 2% in tampone sodio fosfato 0.1 M a pH 7.2 e conservati a 4°C fino al momento della disidratazione. Quest'ultima, preceduta da tre lavaggi in tampone sodio fosfato 0.1 M, è stata eseguita mediante la scala ascendente degli alcoli: i campioni sono stati immersi in soluzioni di alcol etilico a concentrazione crescente (da 20% a 96%) con doppi passaggi da 5 minuti ciascuno, per eliminare gradualmente il contenuto di acqua dai campioni. I campioni sono

stati conservati una notte in alcol 96% e dopo un passaggio in alcool assoluto, sono stati sottoposti a Critical Point Drying e metallizzati con oro. I preparati ottenuti sono stati osservati con microscopio elettronico a scansione (modello JSM Jeol 6490) in dotazione presso il Centro Interdipartimentale di Servizi dell'Università di Padova CUGAS.

Espressione genica mediante Real Time PCR

Estrazione e quantificazione di RNA

L'estrazione di RNA dei campioni è stata effettuata utilizzando una soluzione monofasica a base di fenolo e guanidina isotiocianato, il TRIzol® Reagent (Invitrogen). L'omogeneizzazione dei campioni con tale reagente determina la lisi delle membrane cellulari garantendo l'integrità dell'RNA inibendo l'attività degli enzimi RNasi.

I costrutti sono stati trasferiti in microprovette con 1 ml di TRIzol® Reagent ed incubati per 5 minuti a 30°C per consentirne la completa dissociazione. In seguito, ai campioni sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e sono stati agitati vigorosamente 30 secondi prima della incubazione a temperatura ambiente per altri 2 minuti. Dalla successiva centrifugazione a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C sono state ricavate tre fasi: una fase superiore, acquosa, limpida contenente l'RNA, un'interfase centrale, bianca contenente il DNA e una fase inferiore rosa, contenente proteine, fenolo e cloroformio.

La fase acquosa è stata trasferita in una nuova microprovetta e sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo al fine di precipitare l'RNA. Dopo aver incubato i campioni per 10 minuti a temperatura ambiente, essi sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Il pellet derivante dalla centrifugazione, costituito dall'RNA, è stato lavato con 1 ml di etanolo 75 % freddo, agitato e centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti a 4° C.

Successivamente l'RNA è stato asciugato a temperatura ambiente per 10 minuti e risospeso in acqua DNase RNase-free.

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata con lo spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific), il quale, oltre a stimare la concentrazione dei campioni, ne determina la purezza da contaminanti. Lo strumento fornisce i rapporti delle assorbanze 260/280 e 260/230, i cui valori devono essere rispettivamente compresi negli intervalli 1,8-2 e 2-2,2 al fine di reputare i campioni di RNA puri da contaminanti. Valori bassi di tali rapporti indicano la presenza di proteine, fenolo e altri contaminanti organici che assorbono attorno a 280 e 230 nm.

Sintesi del DNA complementare

Il DNA complementare (cDNA) è stato sintetizzato seguendo il protocollo Invitrogen: First-Strand cDNA synthesis using M-MLV RT. Tale protocollo prevede l'impiego dell'enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) che, utilizzando il filamento di RNA come stampo, sintetizza un filamento di DNA complementare.

Per ciascun campione sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA in un volume di reazione pari a 20 µl. In microprovette nuclease-free sono stati mescolati: 1 µl di Oligo (dT)₁₂₋₁₈ [500 µg/ml] (Invitrogen); 500 ng di RNA totale; 1 µl di dNTP Mix [10 mM] (Invitrogen) e acqua distillata nuclease-free fino al volume di 12 µl. Le miscele sono state riscaldate a 65°C per 5 minuti e successivamente poste in ghiaccio per alcuni minuti.

Dopo una breve centrifugata per raccogliere il contenuto sul fondo delle microprovette, sono stati aggiunti: 4 µl di First-Strand Buffer 5X (Invitrogen); 2 µl di DTT [0,1 M] (Invitrogen) e 1 µl di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor [40 U/µl] (Invitrogen). Le miscele di reazione, dopo essere state mescolate delicatamente, sono state incubate a 37°C per 2 minuti. In seguito, ad ogni campione spipettando delicatamente è stato aggiunto 1 µl dell'enzima M-MLV RT [200 U/µl] (Invitrogen). Dopo aver incubato i campioni a 37°C per 50 minuti, la reazione è stata inattivata riscaldando i campioni a 70°C per 15 minuti.

Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20°C fino al suo impiego come templatato per l'amplificazione in PCR.

Real Time PCR

La Real Time PCR è una versione avanzata della reazione a catena della polimerasi (PCR) che consente, attraverso l'uso di coloranti o sonde fluorescenti, di quantificare in tempo reale l'amplificazione del DNA correlando l'intensità di fluorescenza alla concentrazione dei prodotti di PCR. Ogni reazione di Real Time PCR è caratterizzata da un accumulo di segnale fluorescente che viene definito dal Ct (cycle threshold), cioè dal numero di cicli richiesti per ottenere un'intensità del segnale superiore al rumore di fondo del sistema. A quantità elevate di DNA di partenza corrisponde un veloce incremento del segnale fluorescente e quindi un basso valore di Ct.

Il segnale fluorescente è stato generato aggiungendo alla miscela di reazione il colorante fluorescente SYBR Green I. Si tratta di una cianina asimmetrica intercalante il DNA a doppio filamento. Quando le molecole di SYBR Green I sono libere in soluzione non presentano rilevante fluorescenza; al contrario quando legano il DNA a doppia elica (in corrispondenza

del solco minore) esse subiscono un cambio conformazionale ed aumentano considerevolmente la quantità di fluorescenza emessa.

Per ciascun campione sono stati amplificati 2.5 µl di cDNA in un volume di reazione pari a 25 µl. In microprovette nuclease-free da 200 µl sono stati mescolati: 12.5 µl di FastStart SYBR Green Master [2X] (Roche); 0.75 µl di Forward primer [10 µM]; 0.75 µl di Reverse primer [10 µM]; 8.5 µl di acqua Dnasi-Rnasi free (GIBCO). Dopo aver mescolato delicatamente e centrifugato brevemente ogni miscela sono stati aggiunti 2.5µl di cDNA.

Le reazioni di Real Time PCR sono state condotte in un termociclatore Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research, Australia), seguendo il programma di amplificazione specificato nella Tabella 3.1.

<i>Cicli</i>	<i>Passaggio</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
1	Denaturazione iniziale del cDNA	95 °C	10 minuti
40	Denaturazione	95 °C	10 secondi
	Appaiamento dei primers	60 °C	30 secondi
	Estensione	72 °C	30 secondi
1	Estensione finale	72 °C	10 minuti

Tabella 3.1: Programma di amplificazione della Real Time PCR.

I campioni di cDNA sono stati analizzati in triplice copia utilizzando le coppie di Primers riportate nella Tabella 3.1.

L'analisi dell'espressione genica è stata determinata normalizzando la quantità del trascritto del gene di interesse con quella di un gene di riferimento (GAPDH) nello stesso campione. La normalizzazione è stata effettuata applicando la seguente formula:

$$2^{\Delta C_t}$$

dove 2 rappresenta l'efficienza di amplificazione pari al 100%,

$$\Delta C_t = C_t \text{ gene di riferimento} - C_t \text{ gene interesse.}$$

Infine i profili genici sono stati presentati come il rapporto (R) fra il $2^{\Delta C_t}$ della condizione di riferimento (coltura cellulare in presenza di fattori differenziativi) e il $2^{\Delta C_t}$ normalizzato della condizione controllo (colture cellulari in terreno non differenziativo).

<i>Gene</i>	<i>Forward Primer (5'→3')</i>	<i>Reverse Primer (5'→3')</i>
CD31	TCCAGCCAACCTTCACCATCC	TGGGAGAGCATTTACATACGA
Collagene I α 1	TGAGCCAGCAGATCGAGA	ACCAGTCTCCATGTTGCAGA
CNPase	AGATGCGGTGGCTAAAGGTC	TCTTAGGCAGCTCTTTGGGA
GAPDH	TCAACAGCGACACCCAC	GGGTCTCTCTTCTCTTGTG
GFAP	AGATCCGCACGCAGTATGAG	AGGTTCGCAGGTCAAGGA
Nestina	TCAGAGGGAAGGAGATAGAGAGTC	AGCCAGAAACCATATGTCAAGAGA
Osteocalcina	GCAGCGAGGTAGTGAAGAGAC	AGCAGAGCGACACCCTA
Osteonectina	TGCATGTGTCTTAGTCTTAGTCACC	GCTAACTTAGTGCTTACAGGAACCA
Osteopontina	TGGAAAGCGAGGAGTTGAATGG	GCTCATTGCTCTCATCATTGGC
PPAR γ	CAGGAGATCACAGAGTATGCCAA	TCCCTTGTCATGAAGCCTTGG
RUNX2	AGCCTTACCAAACAACACAACAG	CCATATGTCCTCTCAGCTCAGC
S100	GACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAG	CCACAAGCACCATACTCCTG
VEGFA	GGACAGAAAGACAGATCACAGGTAC	GCAGGTGAGAGTAAGCGAAGG
Vimentina	CAGATGCGTGAAATGGAAGAGAAC	GGTGGCAATCTCAATGTCAAGG
vWF	ACGTATGGTCTGTGTGGGATC	GACAAGACACTGCTCCTCCA
β III Tubulina	CTCAGGGGCCTTTGGACATC	CAGGCAGTCGCAGTTTTAC

Tabella 3.2: Primer Forward e Reverse utilizzati nelle analisi di Real Time PCR.

Analisi di citogenetica

Cariotipo

Il cariotipo è un'analisi di citogenetica che consente di visualizzare i cromosomi che compongono l'intero genoma di una cellula eucariote. Permette quindi di distinguere i cromosomi in base al numero, alla forma e alle dimensioni e di apprezzarne eventuali anomalie sia numeriche (trisomie e monosomie) che strutturali (traslocazioni, delezioni ed inversioni).

Nelle cellule il DNA si presenta come un ammasso disorganizzato non analizzabile, tranne che in una particolare fase della divisione cellulare, la metafase, quando si condensa in strutture ordinate: i cromosomi. I cromosomi metafisici possono essere marcati con particolari sostanze che si legano a specifiche zone cromosomiche e che gli conferiscono il tipico aspetto a bande. I cromosomi marcati si presentano al microscopio come strutture ben definite e facilmente individuabili; ciò consente di sviluppare un kariogramma, una rappresentazione ordinata dei cromosomi appaiati a due a due in base alle dimensioni, alla posizione del centromero e al bandeggio. Inoltre, seguendo la nomenclatura internazionale, a ogni coppia si assegna un numero da 1 a 22, ed accanto ad essi si dispongono i cromosomi sessuali.

Le cellule, precedentemente seminate in chamber slides (Lab Tek), sono state trattate per 3 ore con l'alcaloide Colchicina 10 µg/ml (Sigma Aldrich) per bloccare la divisione cellulare allo stadio di metafase. Successivamente esse sono state trattate per 15 minuti con una soluzione ipotonica (soluzione all'1% sodio citrato in acqua) per rompere le membrane cellulari e disperdere i cromosomi in un'area più ampia. Successivamente l'azione dell'ipotonica è stata bloccata per 5 minuti con un fissativo costituito da etanolo e acido acetico in rapporto 3:1. In seguito il fissativo è stato applicato altre due volte per 15 minuti e i vetrini sono stati lasciati ad asciugare in ambiente umido.

I cromosomi sono stati marcati utilizzando il colorante Quinacrina ed osservati al microscopio a fluorescenza.

CGH array

Il Comparative Genomic Hybridization (CGH) array è una tecnica che consente di identificare eventuali variazioni del numero di copie di geni distribuiti lungo tutto il genoma. Consente di quantificare delezioni o amplificazioni nel genoma con una risoluzione media di 100 Kb, definendo con precisione le dimensioni e i punti di inizio e di fine delle regioni coinvolte nello sbilanciamento.

È possibile effettuare un CGH array su qualsiasi tessuto da cui è possibile estrarre DNA come ad esempio: sangue periferico, biopsia cutanea, tumori solidi, midollo, villi coriali, liquido amniotico, sangue fetale e colture cellulari. Il CHG array trova per questo applicazione in diversi campi, come: neuropsichiatria (nella diagnosi di ritardo mentale, autismo, epilessia e malformazione della corteccia cerebrale), pediatria (per confermare anomalie congenite, alterazione dello sviluppo), ostetricia (in caso sospetto di anomalia cromosomica fetale) ed oncologia (in diagnosi di tumori della linea ematopoietica e tessuti solidi).

L'analisi di CGH array è stata effettuata seguendo il protocollo *Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis* (Agilent Technologies), che si articola nelle seguenti fasi:

- Estrazione del DNA: Il DNA target è stato estratto dai campioni utilizzando un kit di estrazione di DNA genomico (Sigma).
- Digestione del DNA: 500 ng di DNA target e 500 ng di DNA controllo sono stati digeriti per 2 ore a 37°C con gli enzimi RsaI e Alu I (Promega) che sono stati successivamente inattivati 20 minuti a 65°C.
- Marcatura e purificazione del DNA: I campioni sono stati marcati per due ore utilizzando il Kit marcatura Quick Amp due colori (Agilent) mediante la tecnica

“random priming” con cianine Cy5-dUTP per il DNA target e Cy3-dUTP per il DNA controllo. Successivamente i prodotti marcati sono stati purificati con colonnine Amicon Ultra-0.5 30 K (Millipore).

- Ibridazione su vetrino: I prodotti purificati sono stati denaturati e co-ibridati su un vetrino 44K (Human Genome CGH Microarray, 4x44K, Agilent) caricato con sonde (oligomeri 60bp) con risoluzione media di circa 100 Kb. L'ibridazione è stata effettuata in rotazione alla temperatura controllata di 65°C per 40 ore.
- Lettura scanner ed analisi dati: Al termine dell'incubazione i vetrini sono stati lavati con particolari tamponi di lavaggio (Agilent) e letti allo scanner G2505B Agilent. L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante appositi software forniti da Agilent (Feature Extraction e CGH-Analytics).

Esperimenti *in vivo*

Modello *in vivo*

Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti su quattro ratti femmina immunocompromessi Wistar (Charles River) di 8 settimane. A livello delle ossa craniche sono state effettuate delle lesioni che più tardi sono state ricoperte con il campione da testare (un supporto a base di idrossiapatite precedentemente posto in coltura per una settimana con ADSC in presenza di fattori osteogenici ed endoteliali) oppure con il controllo (solamente il supporto a base di idrossiapatite).

Tutte le operazioni sono state effettuate previa anestesia generale effettuata mediante l'iniezione intraperitoneale di cloridrato di ketamina (Ketaras, Yuhan Corporation, Korea, 40mg/kg) mescolata a xilazina (Rompuns, Bayer Korea, Korea, 10 mg/kg). Dopo aver disinfettato la cute della testa con Betadine 10% (Potadine, Sam-Il Pharmacology, Korea) e aver iniettato lidocaina (2% lidocaine containing. 1:100000 epinephrine, Lidocaine HCL Injs. Yuhan Corp., Korea) nell'osso cranico, è stata effettuata un'incisione lungo la sutura sagittale, è stato alzato il periosteo ed è stata creata una lesione di 5 mm di diametro utilizzando un trapano senza perforare la dura. In seguito le lesioni sono state riempite con soltanto lo scaffold a base di idrossiapatite (controllo) oppure con lo scaffold seminato con ADSC. Dopo l'intervento gli animali sono stati collocati separatamente in gabbie termostate a 22°C con un ciclo giorno/notte di 12 ore e con cibo *ad libitum*. A 3 settimane dall'intervento i ratti sono stati sacrificati per dislocazione cervicale.

Tutti gli animali sono stati trattati seguendo le “Raccomandazioni per la gestione degli animali da laboratorio nella ricerca biomedica” redatte dal Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale dell’Università di Padova.

Colorazione tricromica di Goldner

I campioni recuperati dagli esperimenti *in vivo* sono stati fissati una notte in formalina al 3.7% a 4°C, decalcificati per 20 giorni con una soluzione a base di formalina ed acido formico, e inclusi in paraffina. L’inclusione in paraffina è stata effettuata con i seguenti passaggi:

- due passaggi in etanolo 50% da 30 minuti;
- tre passaggi in etanolo 70% da 30 minuti;
- due passaggi in etanolo 95% da 30 minuti;
- due passaggi in etanolo 100% da 30 minuti;
- xilene fino alla diafanizzazione;
- due passaggi in paraffina liquida da 1 ora in stufa a 60 °C;
- inclusione.

I campioni inclusi sono stati tagliati in fette dallo spessore di 7 µm, che sono state reidratate attraverso la scala discendente degli alcoli e sottoposte alla colorazione Tricromia di Goldner, al fine di distinguere l’osso mineralizzato dall’osteoido (non mineralizzato).

La colorazione tricromica di Goldner (conosciuto anche come Masson-Goldner) utilizza più coloranti per tingere e distinguere le diverse strutture. In particolare, sono stati impiegati: l’ematossilina ferrica per poter colorare i nuclei di marrone-nero, il Light Green per marcare di verde le fibre di collagene, la fucsina acida e il xylidine ponceau per colorare il citoplasma di rosso e l’Orange G per marcare di arancio gli eritrociti.

La colorazione è stata realizzata nel seguente modo:

- ematossilina ferrica per 10 minuti;
- lavato in acqua distillata;
- differenziato in acqua di fonte;
- fucsina acida e xylidine ponceau per 5 minuti;
- lavato in acido acetico 1%;
- differenziato in acido fosfomolibdico 1% per 5 minuti;
- lavato in acido acetico 1%;
- Light Green 2 minuti;
- lavato in acido acetico 1%.

Risultati

Coltura di cellule staminali adulte

Tre tipi diversi di cellule staminali adulte sono state isolate dai loro tessuti di origine:

- Skin-derived Precursor Cells (SKP) dalla pelle;
- Adipose derived Stem Cells (ADSC) dal tessuto adiposo;
- Dental Pulp Stem Cells (DPSC) dalla polpa dentale.

Le sospensioni cellulari ottenute mediante digestione enzimatica sono state seminate su piastre standard per colture cellulari. Dopo 3 giorni di coltura, al microscopio ottico è possibile osservare la presenza di cellule aderenti alla plastica dalla morfologia fibroblastoide (Figura 4.1).

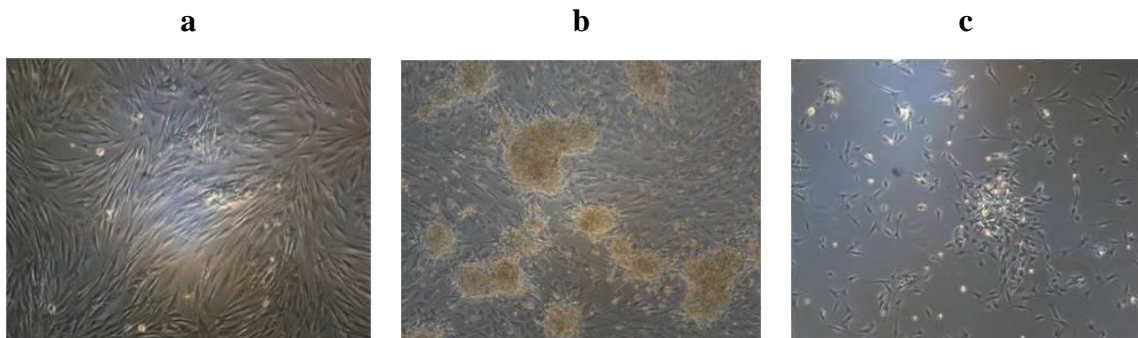


Figura 4.1: Analisi di microscopia ottica della coltura primaria di SKP (a), ADSC (b) e DPSC (c). Ingrandimenti 10X.

Prima della semina sul biomateriale, le cellule staminali adulte sono state analizzate fenotipicamente mediante immunofluorescenza (Figura 4.2), al fine di valutare la presenza sulla superficie cellulare dei seguenti marcatori:

- CD 73: nota anche come ecto-5'-nucleotidase. È una proteina di 69 kDa ancorata alla membrana plasmatica dove catalizza la conversione di nucleotidi extracellulari in nucleotidi permeabili alla membrana cellulare. È stata individuata in epatociti, in cellule del midollo osseo e in cellule epiteliali timiche, renali ed epatiche.

- CD 90: nota anche con il nome di Thy-1 (THYmocyte differentiation antigen 1) a causa della sua prima identificazione nei timociti. È stata identificata anche sulla superficie di cellule neuronali, endoteliali, mesenchimali staminali e staminali emopoietiche.
- CD 105: anche nota come Endoglina. È una glicoproteina di membrana omodimerica di 180 kDa, la cui espressione è stata individuata in cellule endoteliali e in cellule staminali embrionali, mesenchimali staminali e del midollo osseo.

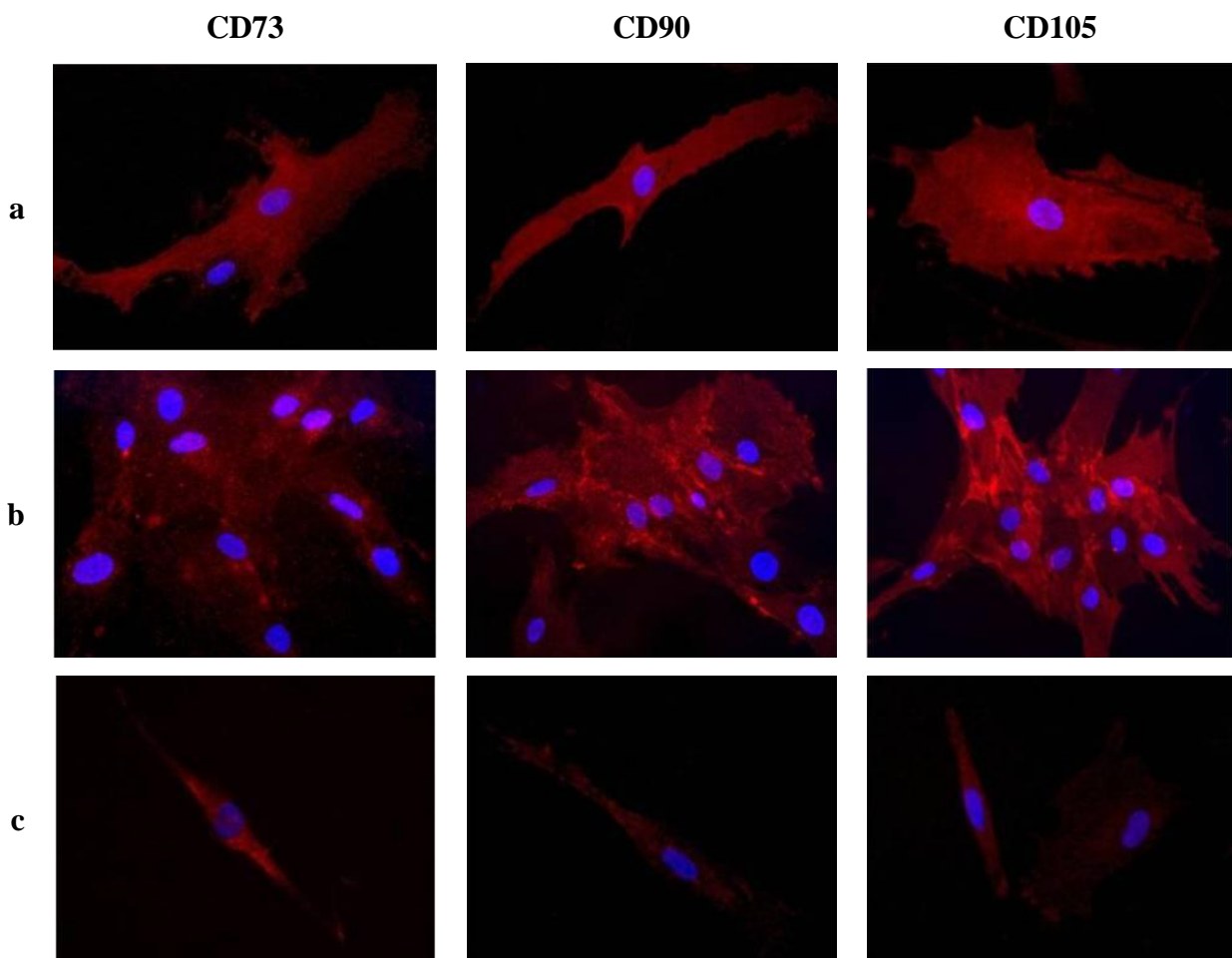


Figura 4.2: Analisi di microscopia a fluorescenza della coltura primaria di SKP (a), ADSC (b) e DPSC (c). Espressione dei marcatori CD73, CD90 e CD105. Ingrandimenti 40X.

Ricostruzione *in vitro* di “soft and hard tissue”

Le cellule staminali adulte SKP, ADSC e DPSC sono state utilizzate in combinazione con opportuni biomateriali e fattori di differenziamento al fine di ricostruire *in vitro* “soft and hard tissue”. In particolare, sono stati ricostruiti i seguenti tessuti:

- tessuto nervoso a partire da SKP e ADSC seminate su supporti a base di acido ialuronico o fibrina;
- tessuto osseo vascolarizzato a partire da ADSC seminate su scaffold a base di idrossiapatite;
- tessuto simil-dentale a partire da DPSC seminate su un supporto a base di acido ialuronico.

La Tabella 4.1 riporta uno schema del lavoro eseguito, specificando le combinazioni di cellule, biomateriale e fattori differenziativi.

Costrutto	Biomateriale	Cellule Staminali Adulte	Fattori differenziativi
Tessuto nervoso	Acido Ialuronico	SKP	Proliferativi seguiti da Neurogenici o Gliogenici
	Fibrina	ADSC	
Tessuto osseo vascolarizzato	Idrossiapatite	SKP	Osteogenici ed Endoteliali
		ADSC	
Tessuto simil-dentale	Acido Ialuronico	DPSC	Neurogenici, Gliogenici ed Endoteliali

Tabella 4.1: Schema del lavoro svolto.

Ricostruzione *in vitro* di tessuto nervoso

Differenziamento di SKP e ADSC in cellule gliali e neuronali

Prima di seminare le cellule staminali adulte sui supporti tridimensionali a base di acido ialuronico e di fibrina, è stato testato il loro differenziamento gliale e neuronale in monostrato tramite analisi di immunofluorescenza.

Il differenziamento gliale e neuronale è stato sviluppato in due fasi:

- 14 giorni in terreno proliferativo;
- 14 giorni in terreno differenziativo gliale o neuronale.

L'alta concentrazione di siero e di fattori mitogeni Fibroblast Growth Factor basic (FGF-b) ed Epidermal Growth Factor (EGF) ha stimolato le SKP e le ADSC ad attraversare continui cicli di divisione cellulare. In tali condizioni, la proliferazione cellulare ha determinato la formazione di masse sferiche fluttuanti denominate neurosfere (Figura 4.3).

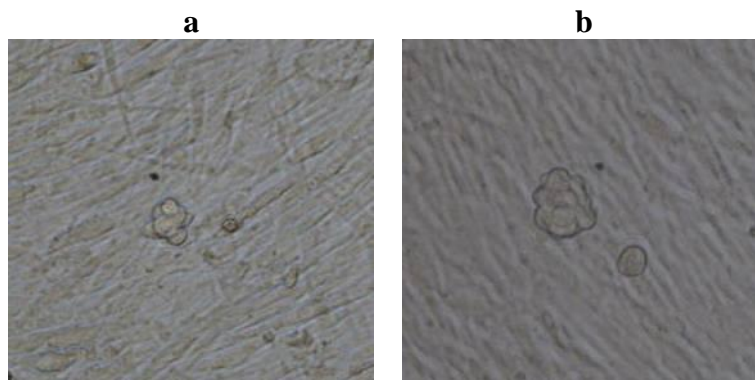


Figura 4.3: SKP (a) e ADSC (b) in terreno proliferativo generano neurosfere. Analisi di microscopia ottica; ingrandimenti 10X.

Le cellule, ricavate dalla dissociazione delle neurosfere, sono state seminate su vetrini trattati con gelatina e coltivate con i specifici terreni differenziativi.

Allo scopo di verificare il differenziamento gliale e neuronale, è stata determinata l'espressione dei seguenti marcatori mediante analisi di immunofluorescenza:

- *Vimentina*: una proteina del filamento intermedio (IF) di tipo III. È la più ubiquitaria tra le proteine del IF, le quali, insieme alla tubulina e all'actina dei microtubuli, compongono il citoscheletro. In diverse cellule di origine mesenchimale, la vimentina è espressa precocemente durante il differenziamento e in seguito sostituita, a differenziamento ultimato, da altre proteine del IF. È inoltre presente nelle cellule

- derivanti dalla cresta neurale come le cellule gliali dove è co-espressa insieme alla Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) [Ho C L, 1996].
- *Nestina*: una proteina del IF di tipo IV. È un marcatore delle cellule staminali neuronali ed è espressa dalle cellule in divisione durante i primi stadi dello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP). Durante il differenziamento, l'espressione della nestina decresce progressivamente per lasciare spazio all'espressione di proteine del IF tessuto specifiche, come la GFAP. È inoltre altamente espressa nelle cellule neuronali dove è coinvolta nella crescita radiale dell'assone [Rieske P, 2007].
 - *GFAP*: è una proteina del IF di tipo III espressa dagli astrociti del SNC, dove sembra essere coinvolta nell'allungamento meccanico e nel controllo della forma degli astrociti.
 - *CNPase* (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase): è un enzima espresso ad alti livelli sia dagli oligodendrociti del SNC che dalle cellule di Schwann del SNP. È coinvolta nella polimerizzazione della tubulina e nell'accrescimento delle estensioni oligodendrocitiche. Riduzioni della sua espressione sono correlate a una riduzione del livello di mielinizzazione nel SNC.
 - *S100*: è una proteina a basso peso molecolare caratterizzata dalla presenza di due siti di legame per il calcio con conformazione elica-ansa-elica. È espressa da cellule derivanti dalla cresta neurale come le cellule di Schwann, cellule gliali e melanociti, ma anche da cellule di origine mesenchimale come condrociti, adipociti e cellule dendritiche. È implicata in diverse funzioni cellulari, quali: la regolazione della fosforilazione di proteine e di fattori di trascrizione, nella omeostasi del calcio, nella regolazione del citoscheletro, nella crescita e nel differenziamento cellulare e nella risposta infiammatoria.
 - *β III Tubulina*: è l'isoforma di tubulina quasi esclusivamente espressa nei microtubuli delle cellule neuronali, dove è coinvolta nella neurogenesi, nella guida e nel mantenimento dell'assone.

L'espressione di Vimentina è stata evidenziata sia durante il differenziamento gliale che neuronale a confermare la staminalità delle colture di SKP e di ADSC. In particolare, durante il condizionamento in senso gliale (Figura 4.4), l'espressione di Vimentina è stata accompagnata dall'espressione di GFAP, che come precedentemente anticipato, è una caratteristica tipica delle cellule gliali.

In presenza di fattori neuronali (Figura 4.5) le colture in monostrato di SKP e di ADSC mostrano l'espressione di Nestina, che insieme all'espressione di β III Tubulina, dimostra il loro differenziamento in cellule neuronali.

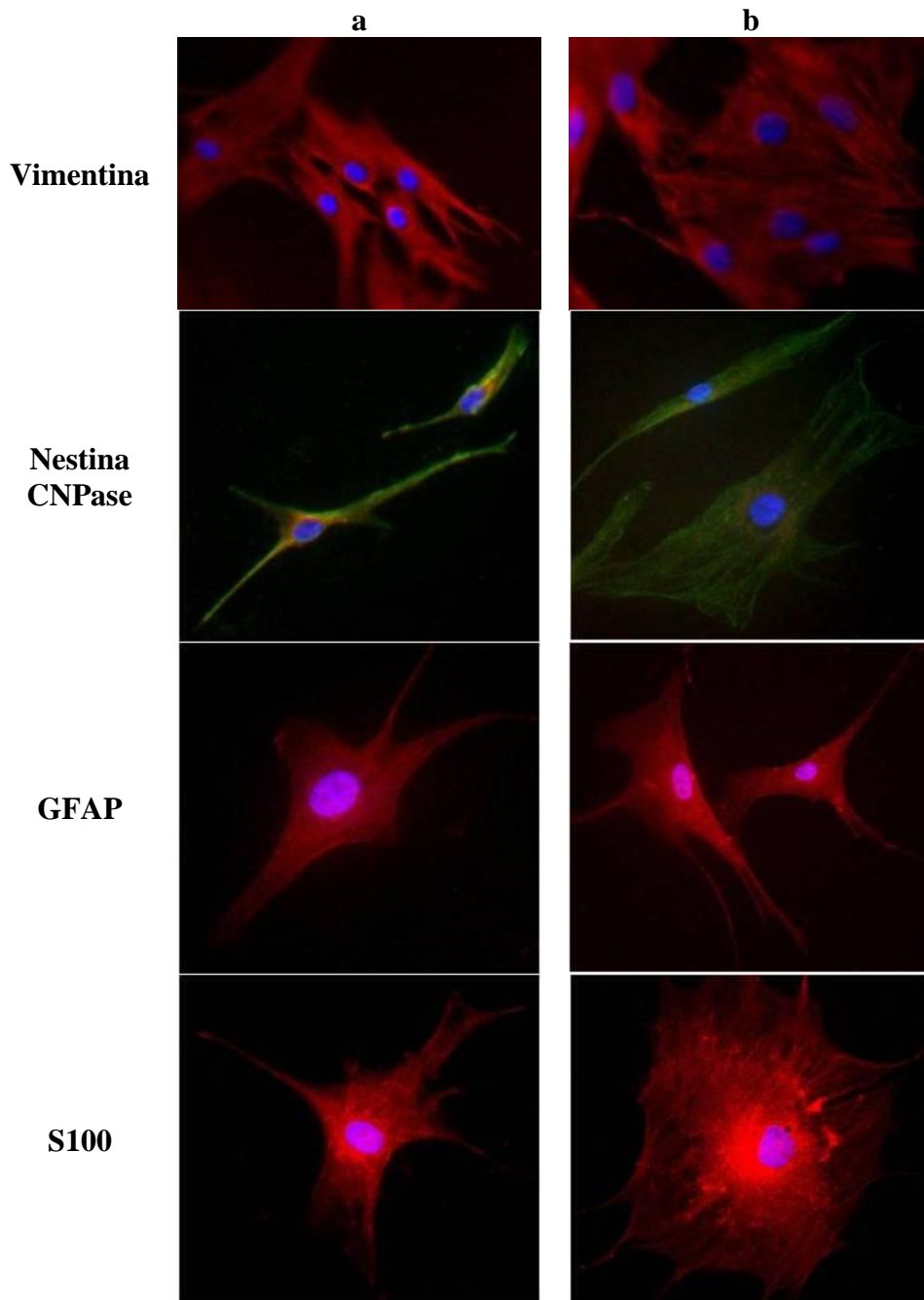


Figura 4.4: Analisi di microscopia a fluorescenza di SKP (a) e ADSC (b) in terreno differenziativo gliale. Espressione dei marcatori: Vimentina (rosso), Nestina (verde), CNPase (rosso), GFAP (rosso) e S100 (rosso). Ingrandimenti 40X.

L'espressione di Nestina è stata inoltre rilevata in condizioni gliali accompagnata dall'espressione di GFAP, una situazione paragonabile alla gliogenesi.

Il differenziamento gliale è stato infine confermato dall'espressione di CNPase, un enzima specificatamente espresso nelle cellule gliali, e dall'espressione di S100, una proteina tipica delle cellule della cresta neurale e coinvolta nel differenziamento cellulare.

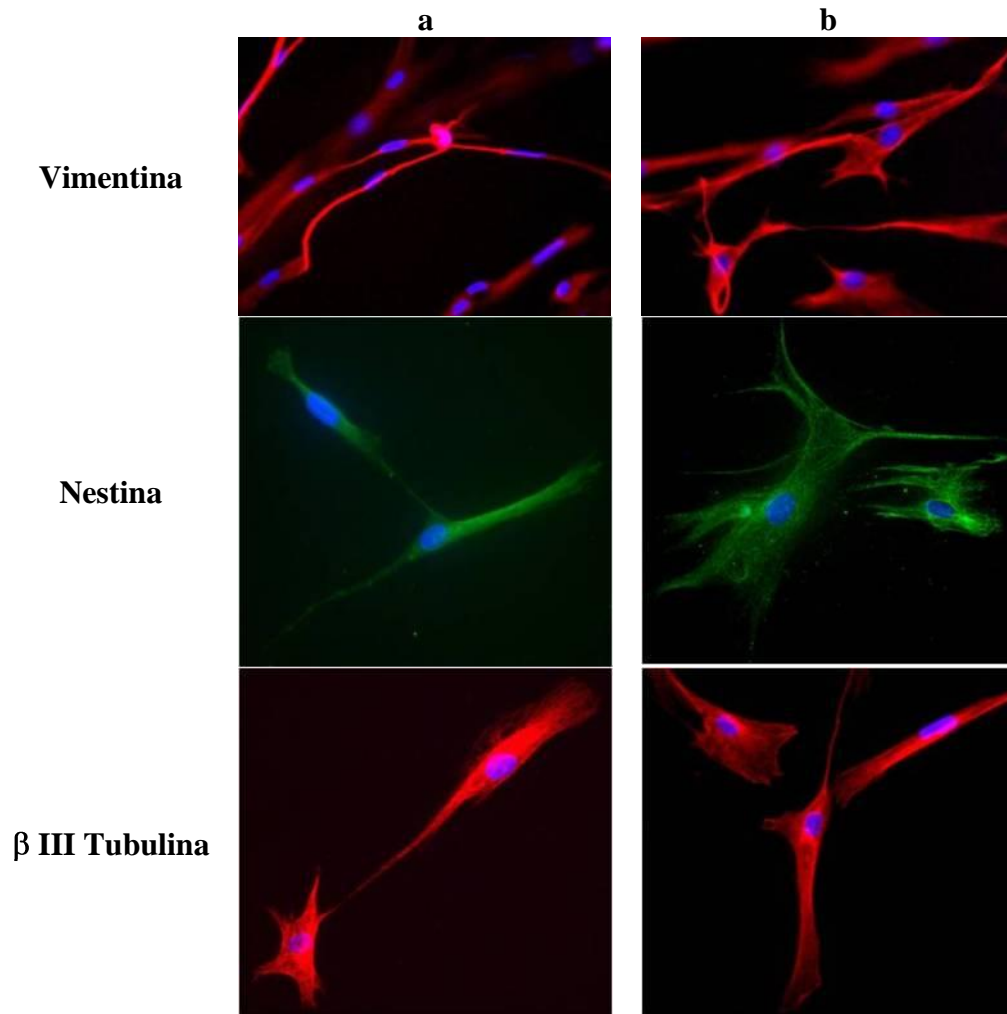


Figura 4.5: Analisi di microscopia a fluorescenza di SKP (a) e ADSC (b) in terreno differenziativo neuronale. Espressione dei marcatori: Vimentina (rosso), Nestina (verde) e β III Tubulina (rosso). Ingrandimenti 40X.

Stabilità cromosomica di SKP e ADSC

La stabilità cromosomica delle colture di SKP e ADSC è stata determinata prima e durante le fasi del differenziamento gliale e neuronale tramite l'analisi del cariotipo. La figura 4.6 riporta i cariogrammi di ciascuna condizione, in cui i cromosomi sono raffigurati nel formato standard: appaiati a due a due e ordinati in base alle dimensioni, alla posizione del centromero e al bandeggio.

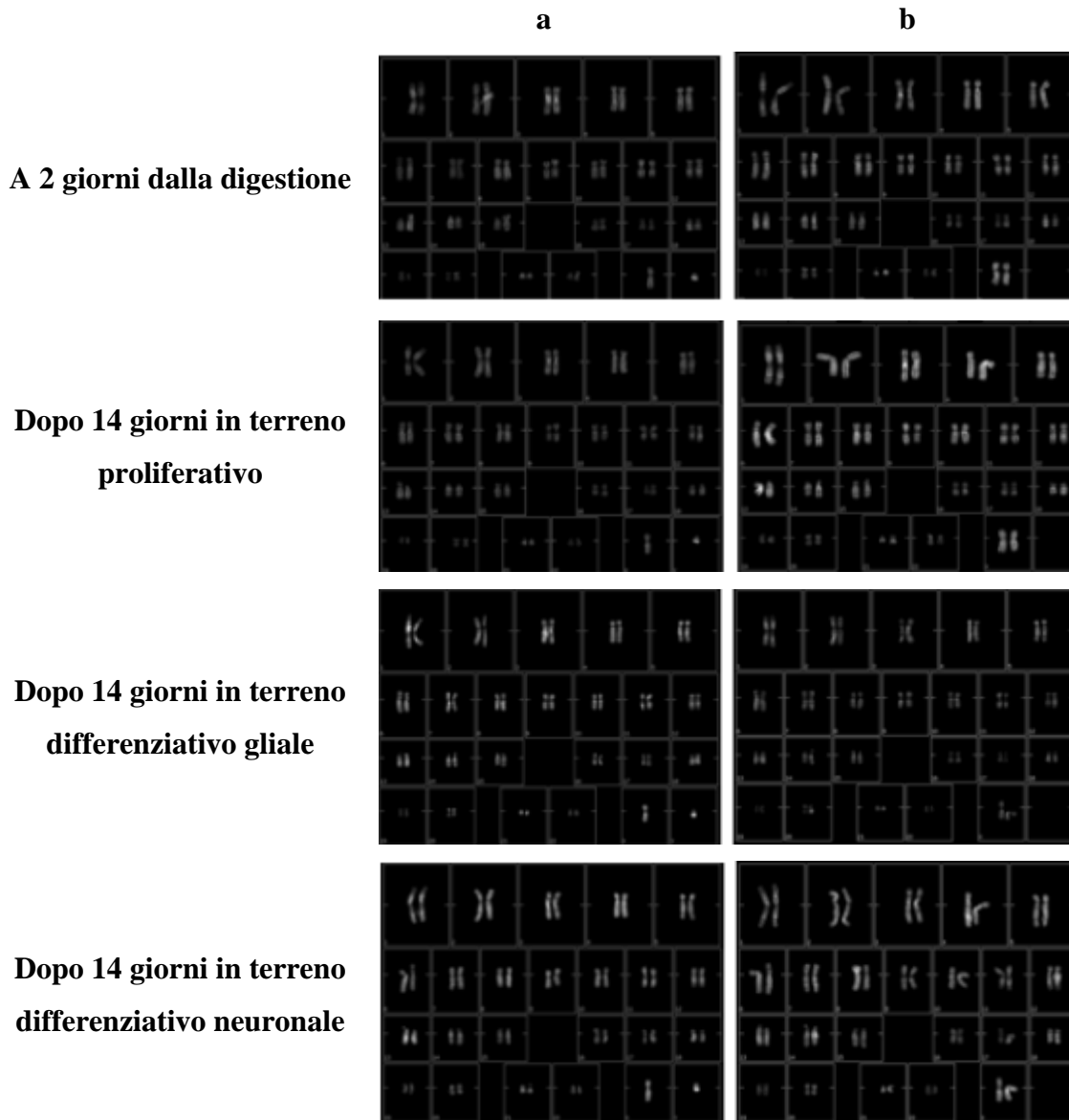


Figura 4.6: Cariotipo di SKP (a) e ADSC (b) eseguito prima e durante le fasi di differenziamento gliale e neuronale.

Il cariotipo eseguito prima del differenziamento, precisamente a due giorni dalla digestione delle biopsie, non mostra alcuna anomalia cromosomica a carico delle colture di SKP e ADSC impiegate successivamente nel processo differenziativo. La stabilità cromosomica è stata mantenuta anche dopo 14 giorni in terreno proliferativo, dimostrando che i fattori mitogeni impiegati nella fase di proliferazione non hanno alterato il normale set cromosomico. Anche in seguito al trattamento con il terreno differenziativo gliale o neuronale non sono state osservate anomalie cromosomiche, confermando che la coltura a lungo termine con fattori differenziativi non determina allo stesso modo sbilanciamenti cromosomici.

In definitiva, le SKP e ADSC coltivate in tutte le condizioni testate mostrano un cariotipo normale: non sono state osservate né variazioni nel numero (trisomie e monosomie) né alterazioni strutturali (traslocazioni, delezioni ed inversioni) dei cromosomi.

Differenziamento su supporti tridimensionali

Le SKP e le ADSC, precedentemente condizionate a neurosfere per 14 giorni in terreno proliferativo, sono state seminate su scaffolds a base di acido ialuronico e fibrina in presenza di terreno differenziativo gliale o neuronale per ulteriori 14 giorni.

Sui costrutti sono stati effettuati test di proliferazione cellulare, analisi morfologiche ed analisi di espressione genica.

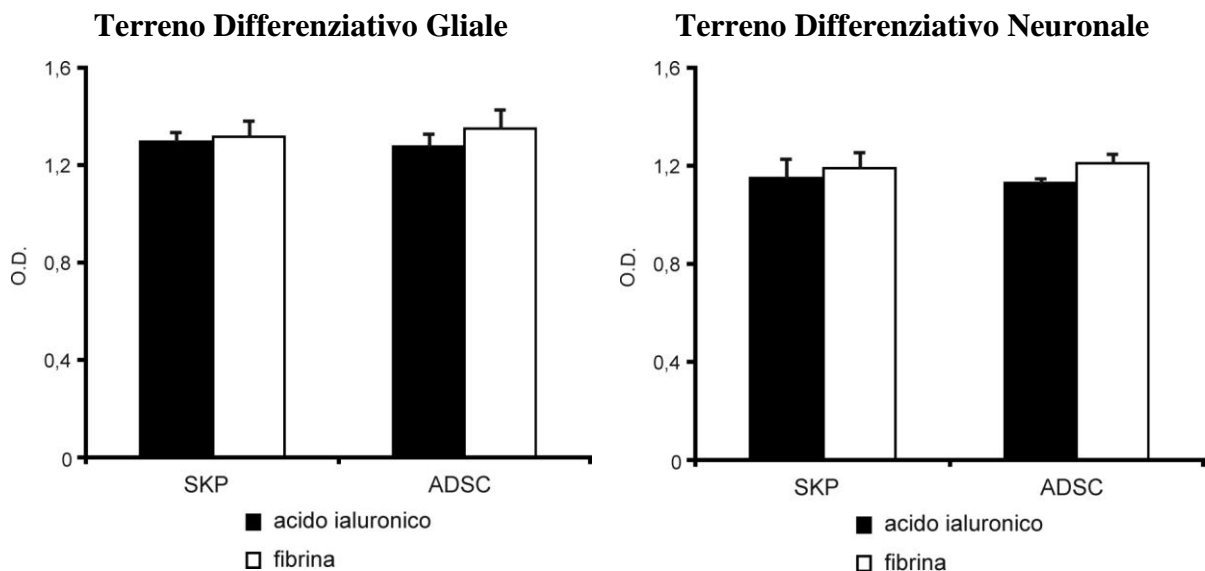


Figura 4.7: Saggio MTT di SKP e ADSC seminate su biomateriale a base di acido ialuronico (barre nere) e a base di fibrina (barre bianche) coltivate 14 giorni in presenza di terreno differenziativo gliale e neuronale.

La capacità proliferativa delle cellule differenziate è stata determinata tramite saggio MTT (Figura 4.7). La proliferazione delle cellule, precedentemente selezionate nella fase di proliferazione, non mostra significative differenze su entrambi gli scaffolds in presenza sia del terreno differenziativo gliale che del terreno differenziativo neuronale. Ciò dimostra che durante la fase di proliferazione e di formazione delle neurosfere sono state selezionate solo le cellule in grado di sopravvivere alla successiva fase differenziativa necessaria all'acquisizione del fenotipo definitivo.

A causa dello spessore dei biomateriali non è stato possibile eseguire analisi di immunofluorescenza sui supporti seminati con SKP e ADSC differenziate in cellule gliali e neuronali. Quindi l'analisi morfologica è stata condotta mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) (Figura 4.8). In presenza del terreno differenziativo gliale sia le SKP che le ADSC appaiono piatte con alcuni prolungamenti, quando seminate su entrambi i supporti. Invece, in presenza del terreno differenziamento neuronale, le cellule appaiono con una morfologia simil-neuronale con un corpo centrale da cui originano prolungamenti più sottili come sono i dendriti e gli assoni.

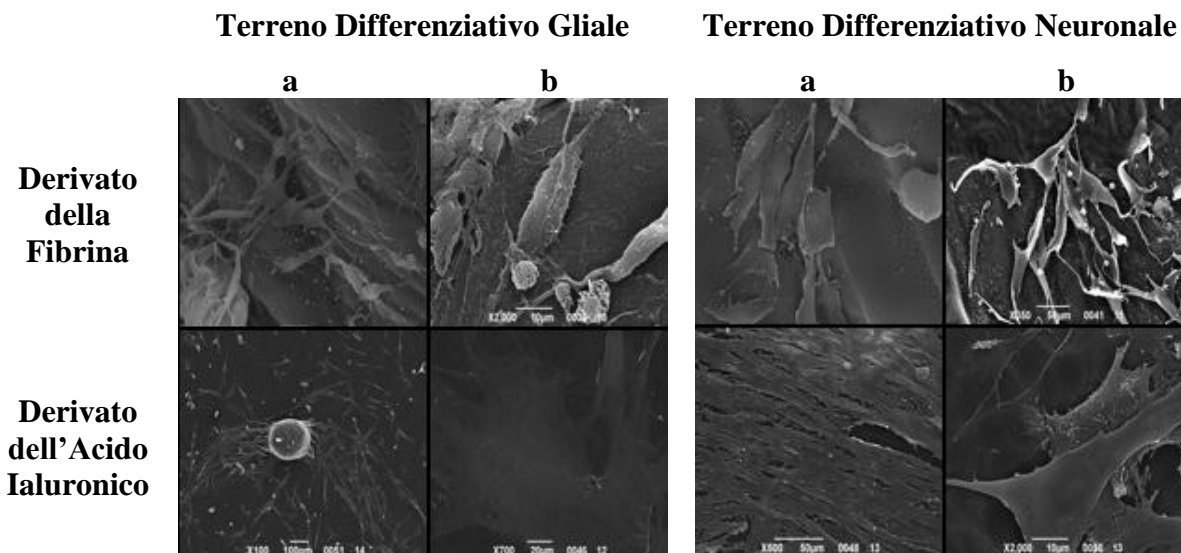


Figura 4.8: Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM) di SKP (a) e ADSC (b) seminate su biomateriale a base di acido ialuronico e fibrina dopo 14 giorni in terreno differenziativo gliale e neuronale.

Infine, il differenziamento gliale e neuronale delle SKP e ADSC sui supporti tridimensionali è stato analizzato mediante esperimenti di espressione genica con la tecnica Real Time PCR.

È stata determinata l'espressione dei marcatori Vimentina, Nestina, S100, CNPase e GFAP per valutare il differenziamento gliale (Figura 4.9 A) e l'espressione di Vimentina, Nestina e β III Tubulina nel caso del differenziamento neuronale (Figura 4.9 B). L'analisi ha richiesto l'impiego di una condizione controllo, a tale scopo sono state utilizzate SKP e ADSC coltivate in terreno non differenziativo. La figura 4.9 mostra i profili di espressione genica di SKP e ADSC trattate con i specifici terreni differenziativi in rapporto (R) ai profili di espressione delle stesse cellule in terreno non differenziativo.

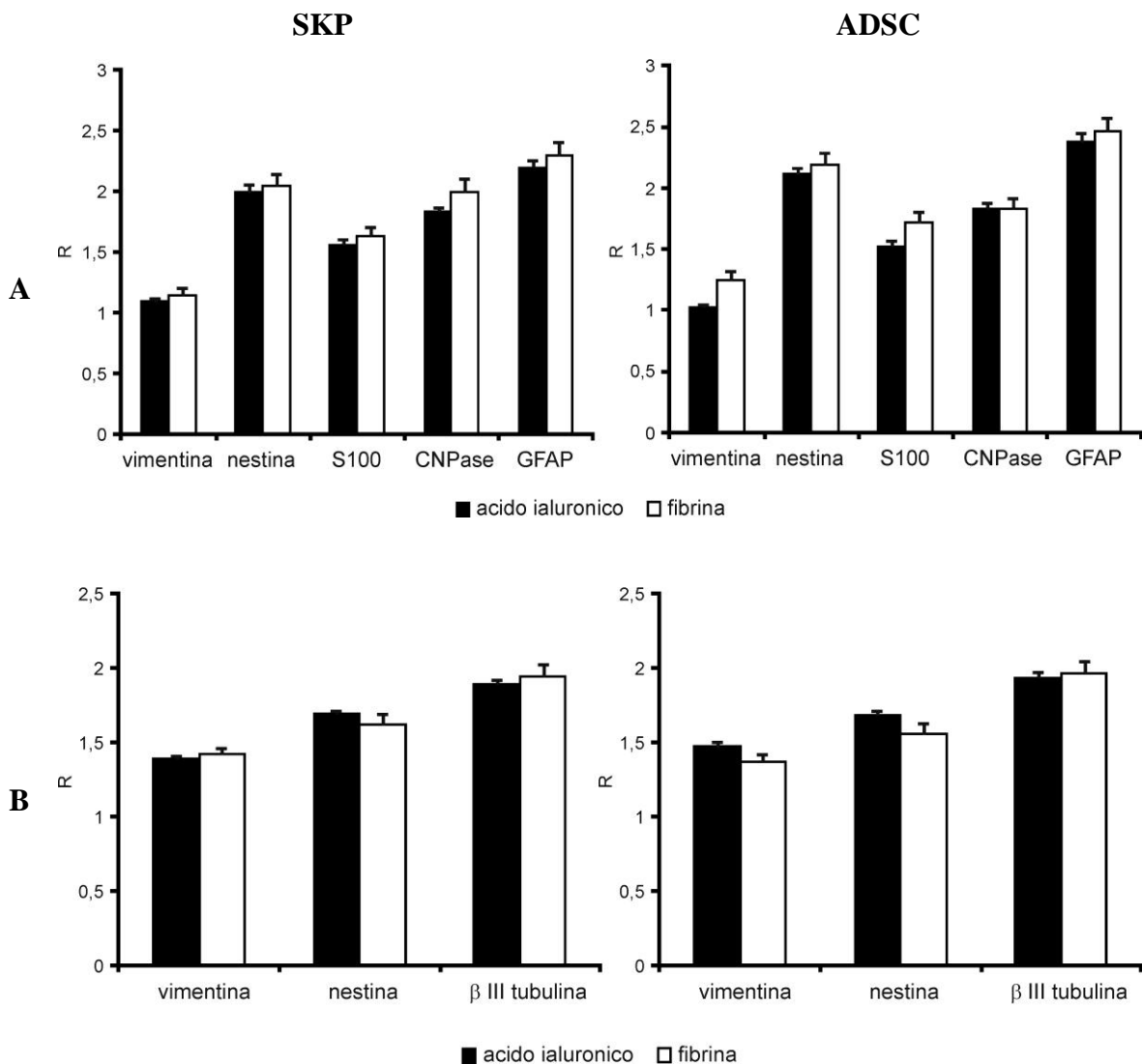


Figura 4.9: Analisi di espressione genica mediante Real Time PCR. Colture di SKP e ADSC su supporti a base di acido ialuronico (barre nere) e a base di fibrina (barre bianche) in terreno differenziativo gliale (A) e terreno differenziativo neuronale (B).

I risultati ottenuti dimostrano che sia le SKP sia le ADSC assumono il corretto profilo di espressione su entrambi gli scaffolds. Inoltre, l'espressione dei marcatori gliali e neuronali non mostra una differenza significativa tra le cellule seminate sul supporto a base di acido ialuronico e quelle seminate sulla base di fibrina.

Ricostruzione *in vitro* di tessuto osseo vascolarizzato

Differenziamento di ADSC su supporto a base di idrossiapatite

Attraverso digestione enzimatica, le cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo (ADSC) sono state isolate e successivamente amplificate in terreno DMEM completo per due settimane. In seguito le ADSC sono state seminate alla densità di 10^6 cellule/cm² su matrici a base di idrossiapatite, precedentemente trattate con fibronectina per favorire l'adesione cellulare. Le matrici seminate con le ADSC sono state poste in coltura in presenza di terreno differenziativo costituito da fattori osteogenici ed endoteliali. Il differenziamento è stato protratto per 21 giorni e ad intervalli di 7 giorni sono state effettuate analisi morfologiche, test di proliferazione, analisi di espressione genica e di citogenetica molecolare.

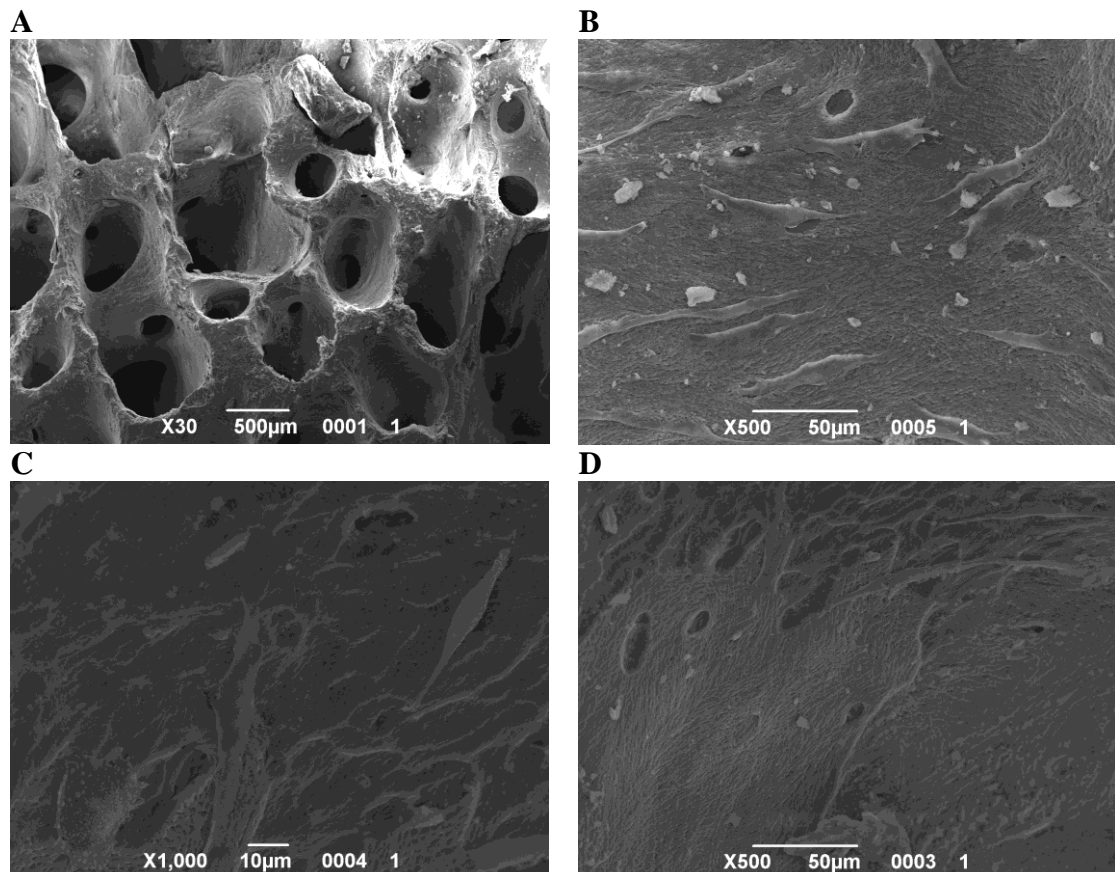


Figura 4.10: Analisi di microscopia elettronica (SEM) del costruito a base di idrossiapatite (A) e seminato con ADSC dopo 7 (B), 14 (C) e 21 (D) giorni di coltura in terreno differenziativo osteo-endoteliale.

L'analisi morfologica dei costrutti è stata condotta tramite SEM dopo 7, 14 e 21 giorni di coltura in terreno osteo-endoteliale (Figura 4.10). Le immagini acquisite al SEM mostrano come le ADSC progressivamente abbiano colonizzato il biomateriale, proliferando anche all'interno della struttura porosa, fino a costituire, dopo 21 giorni di coltura, uno strato continuo di cellule (Figura 4.10 D).

La proliferazione delle ADSC seminate sugli scaffolds a base di idrossiapatite è stata inoltre valutata mediante saggio MTT (Figura 4.11 A) e quantificazione delle cellule aderenti alle matrici (Figura 4.11 B) a 7, 14 e 21 giorni di coltura in terreno differenziativo osteo-endoteliale. La quantificazione delle cellule aderenti è stata determinata indirettamente attraverso una curva di taratura, precedentemente costruita, che correla la quantità di DNA estratta dalle ADSC al numero di cellule sottoposte all'estrazione. I dati raccolti mostrano un incremento nel tempo della proliferazione e del numero delle ADSC seminate sugli scaffolds.

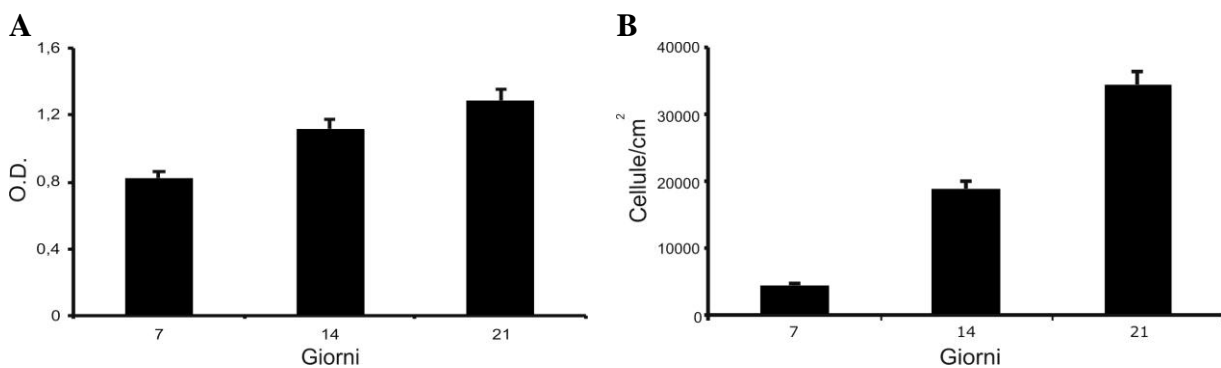


Figura 4.11: Saggio MTT (A) e quantificazione delle cellule aderenti (B) ai supporti a base di idrossiapatite dopo 7, 14 e 21 giorni di coltura in terreno differenziativo osteo-endoteliale.

Il differenziamento delle ADSC seminate sulle matrici a base di idrossiapatite è stato valutato mediante analisi dell'espressione genica con Real Time PCR (Figura 4.12).

A tale scopo sono state testate tre differenti condizioni differenziate:

- Colture tridimensionali di ADSC in presenza di fattori osteogenici;
- Colture tridimensionali di ADSC in presenza di fattori endoteliali;
- Colture tridimensionali di ADSC in presenza di entrambi i fattori.

Il differenziamento osteogenico è stato determinato valutando l'espressione di alcuni marcatori della matrice ossea come Osteopontina, Osteonectina, Osteocalcina e Collagene di tipo I [Ma J, 2011]. Invece il differenziamento endoteliale è stato valutato determinando l'espressione del marcatore CD 31 (noto anche come Platelet Endothelial Cell Adhesion

Molecole - PECAM-1), del von Willebrand Factor (vW) [Marino G, 2011] e del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Inoltre è stata determinata l'espressione dei fattori trascrizionali: Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), essenziale per il differenziamento osteogenico, e Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma (PPAR γ), necessario alla regolazione del differenziamento adipocitario [Kawai M., 2009].

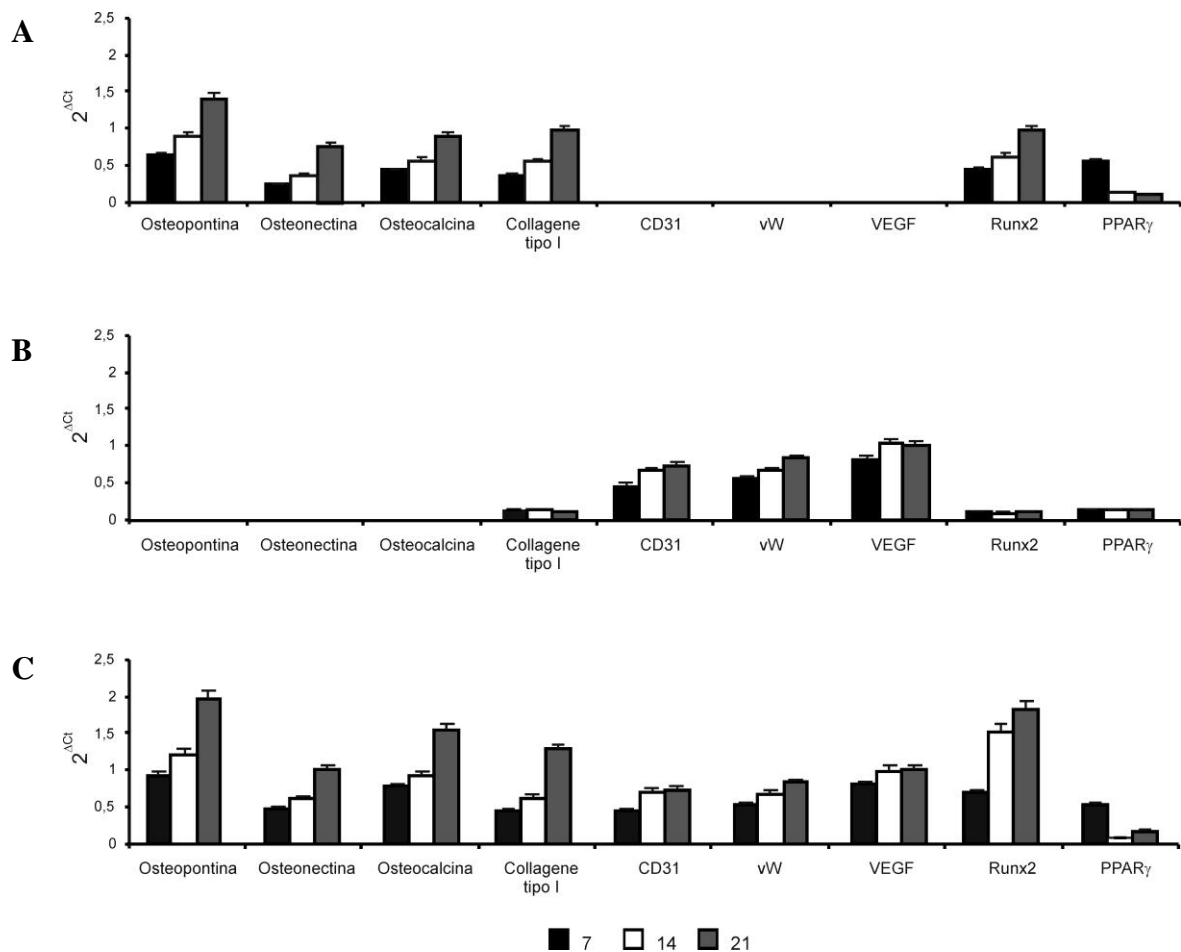


Figura 4.12: Analisi di espressione genica mediante Real Time PCR di ADSC in presenza di fattori osteogenici (A), di fattori endoteliali (B), e di fattori osteogenici ed endoteliali (C) dopo un trattamento di 7 (barre nere), 14 (barre bianche) e 21 (barre grigie) giorni.

In presenza dei soli fattori osteogenici (Figura 4.12 A) è stato evidenziato un aumento nel tempo dell'espressione dei marcatori Osteopontina, Osteonectina, Osteocalcina e Collagene di tipo I. Nel tempo poi, è stato evidenziato un aumento dell'espressione del fattore trascrizionale osteogenico RUNX2 e una contemporanea riduzione dell'espressione del fattore trascrizionale PPAR γ , specifico per il differenziamento adipocitario. In questa condizione

differenziativa non è stata osservata l'espressione dei marcatori endoteliali CD 31, vW e VEGF.

L'associazione dei fattori endoteliali ai fattori osteogenici (Figura 4.12 C), invece, ha dimostrato nel tempo un aumento maggiore dell'espressione dei marcatori osteogenici. Lo stesso aumento è stato osservato anche per RUNX2 associato a una più marcata riduzione dell'espressione di PPAR γ . Inoltre la presenza di fattori endoteliali ha determinato l'espressione dei marcatori CD 31, vW e VEGF. Per quest'ultimi è stato registrato un aumento di espressione nel tempo come nella condizione di differenziamento con solo fattori endoteliali (Figura 4.12 B).

Impianto del costrutto in vivo

Al fine di testare le capacità osteo-rigenerative delle ADSC sono stati condotti esperimenti *in vivo* su ratti Wistar immunocompromessi. Gli esperimenti di impianto sugli animali sono stati preceduti dall'allestimento *in vitro* dei costrutti: sulle matrici a base di idrossiapatite sono state seminate le ADSC alla densità di 10^6 cellule/cm² e successivamente sono state incubate per 7 giorni con terreno osteo-endoteliale. Questi costrutti sono stati poi impiantati in corrispondenza di lesioni effettuate a carico delle ossa piatte del cranio di ratti immunocompromessi. Gli esperimenti sono stati condotti mettendo a confronto i costrutti precedentemente preparati *in vitro* (Figura 4.13 B) con una situazione controllo, cioè le matrici a base di idrossiapatite senza cellule (Figura 4.13 A).

La colorazione tricromica di Goldner effettuata sui due distinti impianti mostra come entrambi gli scaffolds vengano infiltrati da cellule con deposizione di matrice extracellulare, in particolare di Collagene di tipo I. Ciò che differenzia i due impianti è la presenza di vasi in corrispondenza del supporto a base di idrossiapatite seminato con ADSC.

Per confermare l'analisi istologica sono stati condotti esperimenti di espressione genica sugli impianti mediante Real Time PCR (Figura 4.13 C). I dati raccolti mostrano che la presenza di ADSC nel costrutto garantisce la presenza di una popolazione di cellule dal fenotipo osteogenico caratterizzata dall'espressione dei marcatori Osteopontina, Osteonectina, Osteocalcina, Collagene di tipo I e RUNX2 e di una popolazione di cellule endoteliali che esprimono i marcatori CD 31, vW e VEGF.

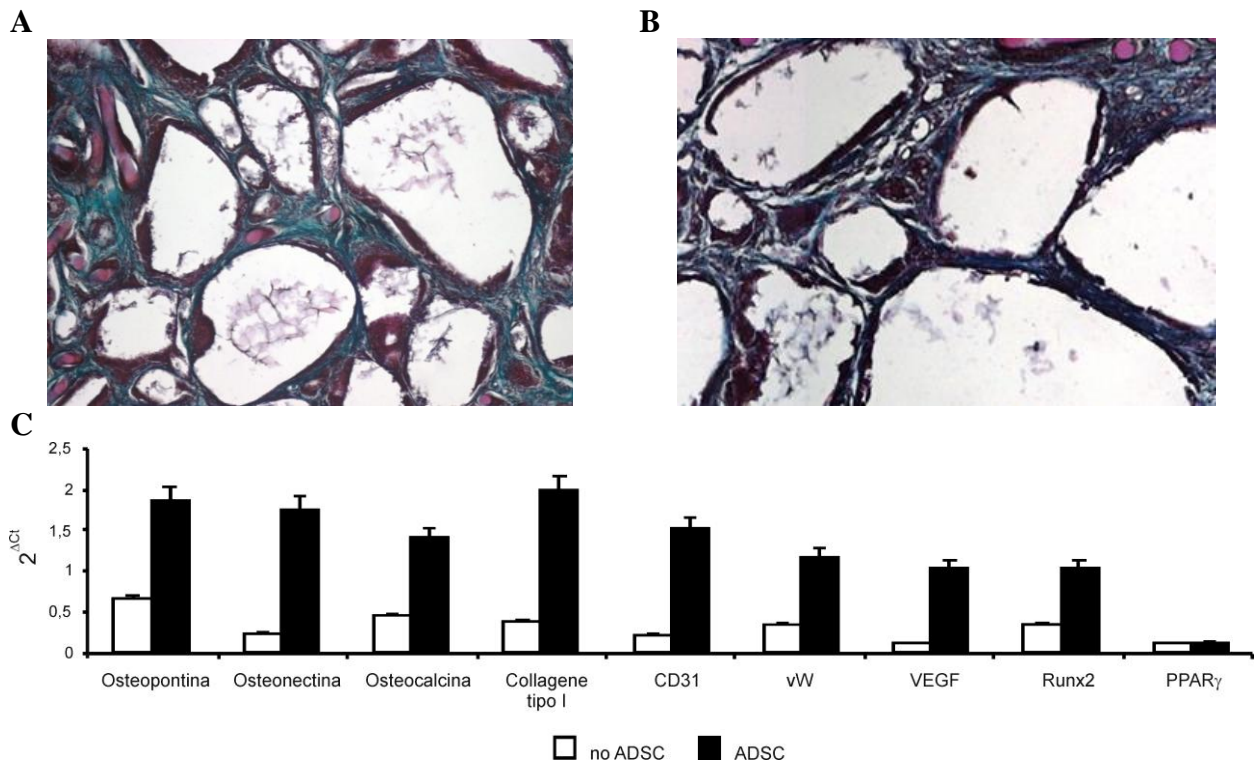


Figura 4.13: Esperimenti *in vivo*. Impianto della matrice a base di idrossiapatite senza cellule (A) e della matrice a base di idrossiapatite con ADSC (B) nelle ossa piatte del cranio di ratto. Colorazione tricromica di Goldner; ingrandimenti 20 \times . In (C) analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR della matrice a base di idrossiapatite senza cellule (barre bianche) e della matrice a base di idrossiapatite con ADSC (barre nere).

Analisi genetica del costrutto

Al fine di garantire la stabilità genetica del costrutto a base di idrossiapatite e di ADSC differenziate, sono state effettuate analisi di Comparative Genomic Hybridization (CGH) array per identificare delezioni e amplificazioni genomiche.

Il DNA estratto dalle ADSC seminate su supporti a base di idrossiapatite e trattate con fattori differenziativi osteogenici ed endoteliali per 7, 14 e 21 giorni è stato analizzato mediante CGH array (Figura 4.14). L'analisi ha mostrato l'assenza di sbilanciamenti genomici, intesi come amplificazioni o delezioni di regioni del genoma, confermando che la coltura a lungo termine in presenza dei fattori differenziativi non è in grado di indurre alterazioni strutturali del DNA. La Figura 4.14 riporta due regioni come esempio dell'intero genoma dei campioni analizzati. In particolare in Figura 14.4 A viene mostrata la regione del DNA relativa al gene MYC (myelocytomatosis viral oncogene homolog), mentre in Figura 14.4 B quella relativa al gene RB1 (retinoblastoma 1) dei costrutti a 7, 14 e 21 giorni. Entrambe non mostrano

alterazioni, che sono invece ben evidenti nelle stesse regioni genomiche del controllo positivo, rappresentato dal DNA estratto da cellule della cheratosi attinica (Figura 14.4 B e D)

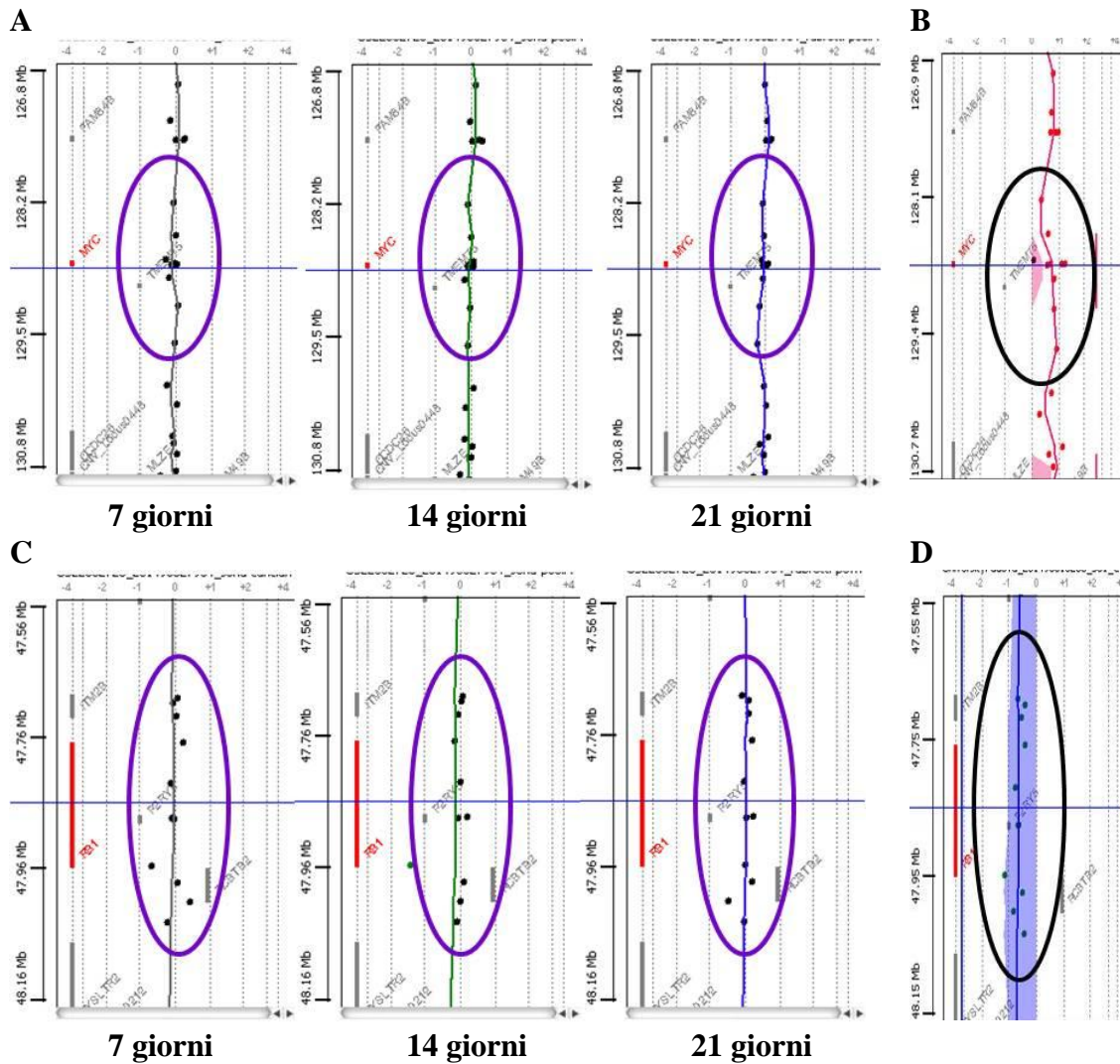


Figura 4.14: Analisi CGH array. Due regioni geniche dello scaffold a base di idrossiapatite seminato con ADSC in terreno differenziativo osteo-endoteliale a 7, 14 e 21 giorni (A, C) a confronto con le stesse regioni della cheratosi attinica (B D). In (B) un'amplificazione e in (D) una delezione.

Ricostruzione *in vitro* di tessuto simil-dentale

Capacità proliferativa delle DPSC

Prima di impiegare le cellule staminali della polpa dentale (DPSC) nella ricostruzione *in vitro* di tessuto simil-dentale sono stati effettuati test preliminari per identificare quale fosse la fonte più adatta per ottenere quantità considerevoli di cellule staminali nel minor tempo possibile.

Tramite digestione enzimatica, sono state isolate le DPSC da terzi molari provenienti da donatori di differenti età. Sulle cellule amplificate in monostrato in presenza di terreno non differenziativo è stato calcolato il Population Doubling Time (PDT) ai passaggi p2, p5 e p8.

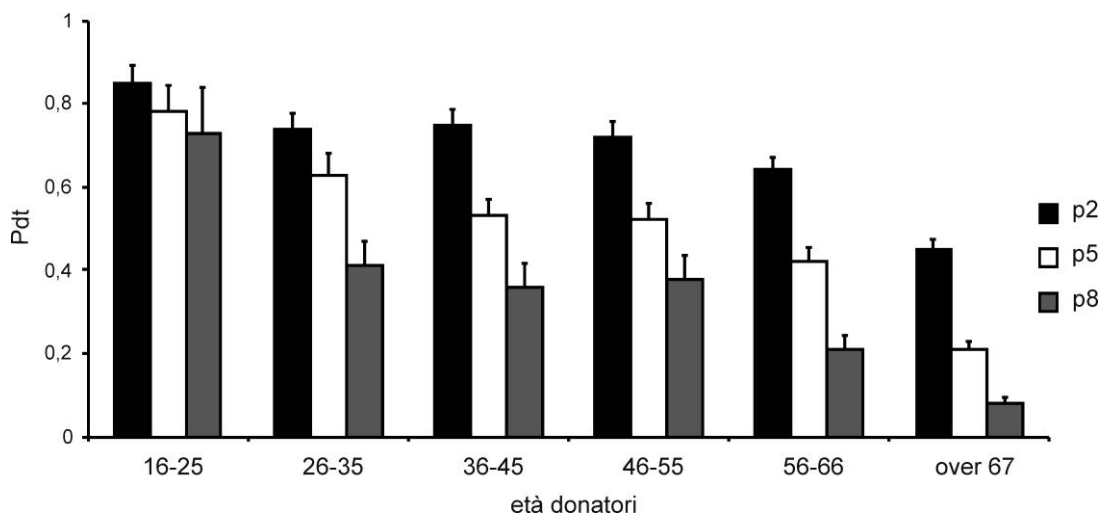


Figura 4.15: Population Doubling Time (PDT) delle DPSC isolate da donatori di diversa età ai passaggi p2 (barre nere), p5 (barre bianche) e p8 (barre grigie).

Attraverso la valutazione del PDT è stato possibile verificare come le capacità proliferative delle DPSC possano variare in base al passaggio di coltura e all'età del donatore. I dati raccolti (Figura 4.15) mostrano valori di PDT elevati ai primi passaggi di coltura indipendentemente dall'età del donatore. Mentre in generale sono stati registrati riduzioni dei valori di PDT all'aumentare dei passaggi *in vitro*. Solo nel caso di donatori con età inferiore ai 25 anni i valori di PDT si sono mantenuti pressoché immutati per ciascun passaggio di coltura testato.

I successivi esperimenti di ingegneria tissutale sono stati quindi eseguiti utilizzando cellule DPSC derivanti da soggetti facenti parte di quest'ultima categoria.

Capacità differenziative delle DPSC

Il costrutto simil-dentale ha l'intenzione di mimare la polpa dentale, un tessuto connettivo lasso di origine mesenchimale altamente innervato da fibre nervose e irrorato da una fitta rete di capillari. Quindi le DPSC impiegate nella realizzazione del costrutto devono essere in grado di differenziare in cellule gliali, neuronali ed endoteliali. Al fine di valutare le abilità differenziative delle DPSC sono stati effettuati test preliminari in monostrato, in cui il differenziamento gliale (Figura 4.16), il differenziamento neuronale (Figura 4.17) e il differenziamento endoteliale (Figura 4.18) è stato studiato mediante tecniche di immunofluorescenza e l'analisi dell'espressione genica.

Il differenziamento gliale ha dimostrato l'espressione dei marcatori Nestina, S100, CNPase e GFAP; il differenziamento neuronale ha riportato invece l'espressione di Nestina e β III Tubulina; infine è stata determinata l'espressione di CD31 e di vW nel caso del differenziamento endoteliale.

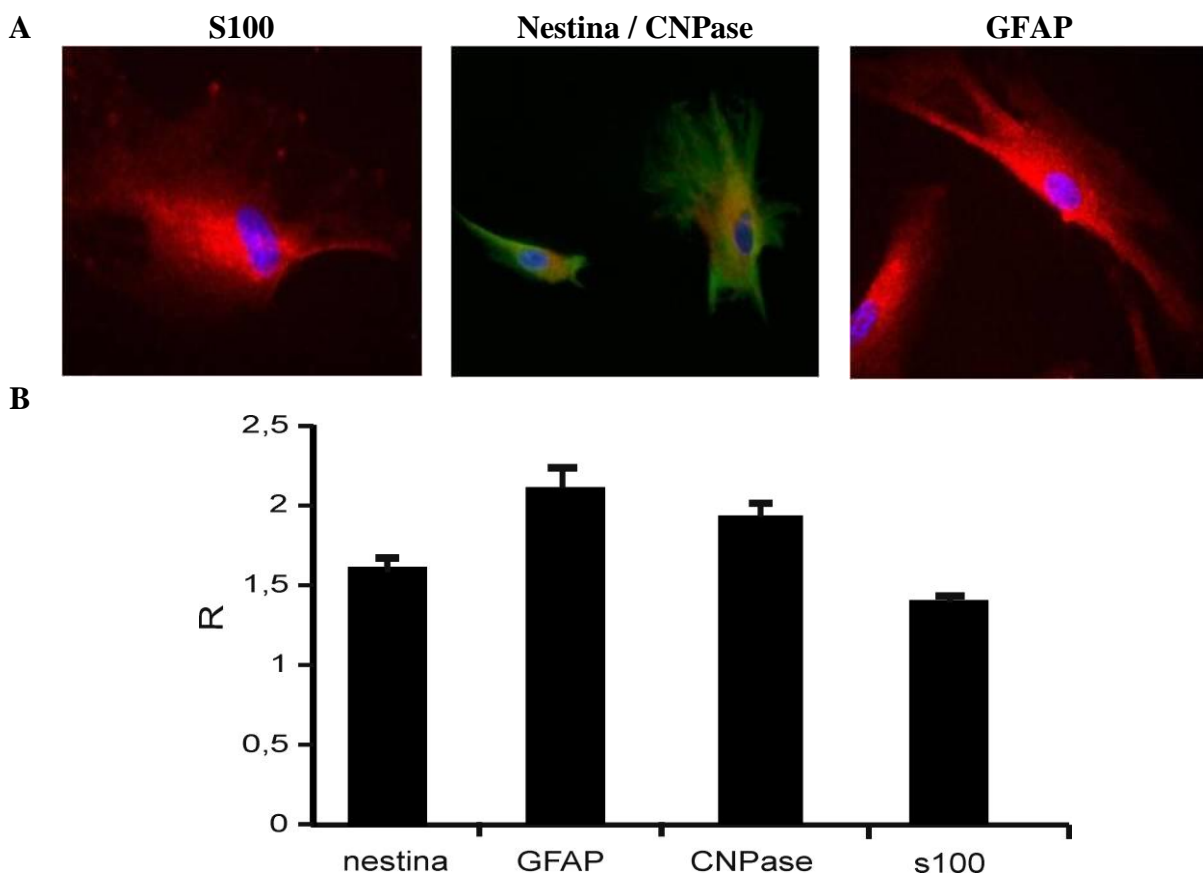


Figura 4.16: Differenziamento Gliale delle DPSC. (A) Analisi di immunofluorescenza (ingrandimenti 40X); espressione dei marcatori: S100 (rosso), Nestina (verde) e CNPase (rosso) e GFAP (rosso). (B) Analisi di espressione genica mediante Real Time PCR.

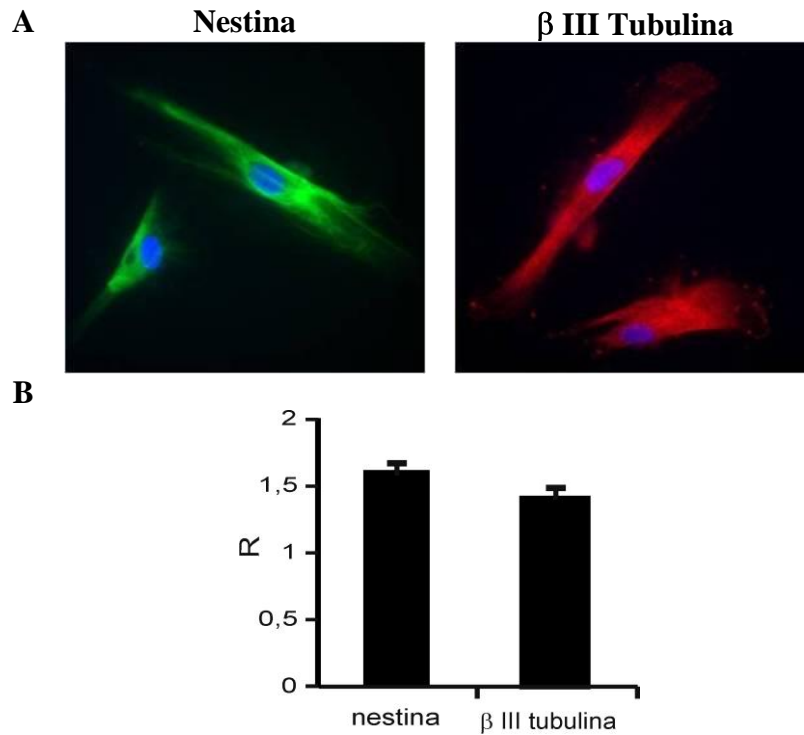


Figura 4.17: Differenziamento Neuronale delle DPSC. (A) Analisi di immunofluorescenza (ingrandimenti 40X); espressione dei marcatori: Nestina (verde) e β III Tubulina (rosso). (B) Analisi di espressione genica mediante Real Time PCR.

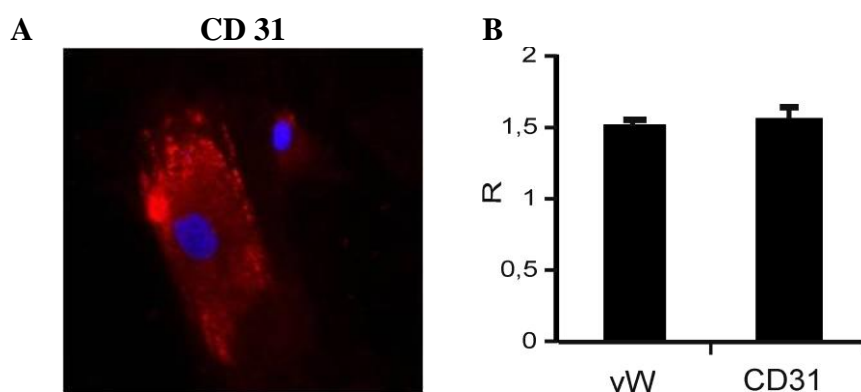


Figura 4.18: Differenziamento Endoteliale delle DPSC. (A) Analisi di immunofluorescenza (ingrandimenti 40X); espressione del marcatori: CD 31 (rosso). (B) Analisi di espressione genica mediante Real Time PCR.

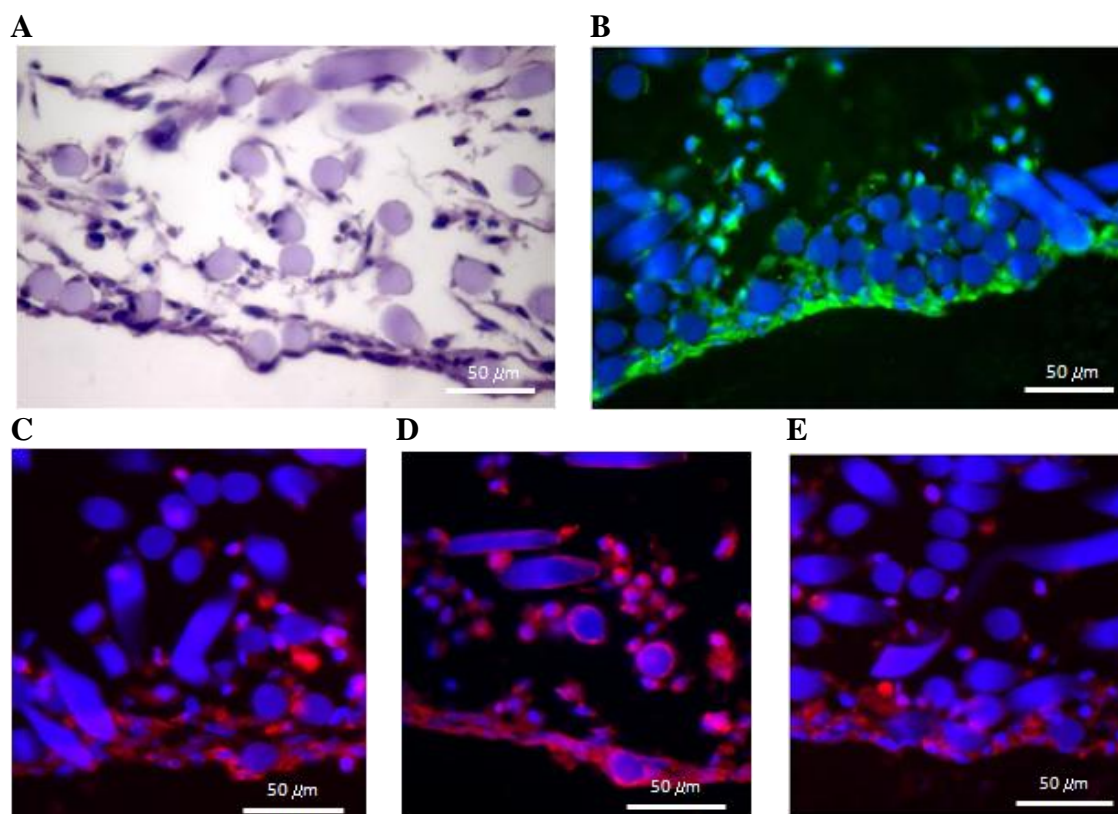
Costituzione del costrutto simil-dentale

Figura 4.19: Analisi di del costrutto simil-dentale dopo 14 giorni in terreno differenziativo. Colorazione Ematossilina/Eosina (A), analisi di immunofluorescenza dei marcatori: collagene I (B), vW (C), β III Tubulina (D) e GFAP (E).

Le DPSC di donatori con età inferiore ai 25 anni sono state amplificate in terreno non differenziativo in modo da ottenere cellule a sufficienza da seminare sui supporti tridimensionali. Per la ricostruzione *in vitro* di tessuto simil-dentale è stato impiegato un biomateriale composto dall'estere benzilico dell'acido ialuronico sottoforma di non woven. Il biomateriale, tagliato in pezzi da 1 cm^2 , è stato imbibito con una miscela di fattori neuronali e gliali. Sul supporto, così trattato, sono state seminate le DPSC alla densità di 1.5×10^6 cellule/ cm^2 in presenza di terreno differenziativo endoteliale.

Dopo 14 giorni di trattamento differenziativo sono state condotte analisi morfologiche e di immunofluorescenza. La colorazione Ematossilina/Eosina (Figura 4.19 A) condotta sui costrutti mostra come le DPSC siano cresciute sia sulla superficie che all'interno del supporto tridimensionale riempiendo gli spazi interni tra le fibre del non woven.

L'analisi di immunofluorescenza ha dimostrato la deposizione di matrice extracellulare e in particolare di Collagene di tipo I (Figura 4.19 B). Inoltre, è stata osservata l'espressione del marcatore gliale GFAP (Figura 4.19 E), del marcatore neuronale β III Tubulina (Figura 4.19 D) e di quello endoteliale vW (Figura 4.19 C).



Discussione

L'impiego di cellule staminali nel campo dell'ingegneria dei tessuti è ancora nella fase iniziale, poiché non è ancora stato posto rimedio ad alcuni problemi. In particolare, nonostante le Cellule Staminali Embrionali possiedano un potenziale differenziativo illimitato, il loro impiego trova alcune limitazioni. Il loro trapianto infatti è ostacolato, oltre che da questioni etiche, anche da fenomeni di rigetto e dalla possibilità di generare teratomi [Yu J., 2008]. Questi sono alcuni dei motivi che hanno portato all'utilizzo, nel campo dell'ingegneria dei tessuti, delle Cellule Staminali Mesenchimali Adulte (MSC). Le MSC sono una popolazione di cellule stromali presenti nel midollo osseo e nella maggior parte dei tessuti connettivi postnatali, in grado di differenziare in cellule di derivazione mesenchimale, ma anche in linee cellulari non mesenchimali. Poiché in coltura le MSC godono di un'ampia capacità proliferativa pur mantenendo il loro potenziale differenziativo multilineare, esse sono delle candidate interessanti per gli approcci di rigenerazione tissutale [Augello A., 2010]. Inoltre, le MSC non sono potenzialmente oncogeniche come le staminali embrionali e non sono immunogeniche. Infatti sono descritte come cellule MHC II negative prive di molecole co-stimolatorie quali, CD40, CD80 e CD86; ciò le rende adatte al trapianto allogenico senza immunosoppressione [Griffin M. D., 2010].

Ricostruzione *in vitro* di tessuto nervoso

Diverse patologie e disturbi neurologici sono causati dalla perdita di neuroni e cellule gliali. Per tali difetti non esistono ancora terapie efficaci, ma stanno emergendo terapie innovative basate sul trapianto di cellule. Studi effettuati su modelli animali hanno dimostrato che terapie a base di MSC possono fornire benefici funzionali in caso di danni neurologici come ictus, lesioni del midollo spinale e sclerosi multipla. Il trapianto di MSC fornisce alcuni vantaggi rispetto all'utilizzo dei progenitori neuronali endogeni. Quest'ultimi, oltre ad essere caratterizzati da una limitata capacità proliferativa, non sono in grado di risolvere la causa scatenante della degenerazione, ma anzi i neuroni da essi generati sono inclini alla stessa degenerazione. Invece, attraverso il trapianto di cellule esogene si spera di poter correggere la causa della degenerazione e di proteggere geneticamente dal processo patologico i nuovi neuroni [Zavan B, 2010].

Con questa finalità sono stati eseguiti esperimenti di ricostruzione *in vitro* di tessuto nervoso utilizzando SKP (Skin-derived Precursor Cells) e ADSC (Adipose derived Stem Cells) seminate e differenziate in cellule neuronali e gliali su supporti tridimensionali a base di acido ialuronico o fibrina.

Le capacità differenziative delle SKP e delle ADSC sono già note. È stato dimostrato che entrambe possono differenziare sia in cellule della linea mesodermica che in cellule neuronali. Le SKP possono differenziare in cellule di Schwann che, una volta impiantate *in vivo*, possono associarsi agli assoni ed assumere un fenotipo mielinizzante in risposta a segnali rilasciati dagli stessi assoni [McKenzie I A, 2006]. Inoltre è stato documentato che anche le ADSC possono differenziare assumendo la morfologia e il profilo di espressione di cellule neuronali [Franco Lambert A. P., 2009].

Sulla base di questi presupposti, è stato definito un protocollo per l'amplificazione *in vitro* di una popolazione di cellule neuronali e gliali derivanti da SKP e ADSC seminate su supporti tridimensionali al fine di simulare la distribuzione delle cellule in condizione fisiologiche.

Le SKP e le ADSC isolate dai rispettivi tessuti di origine sono state poste in terreno proliferativo per 14 giorni, al fine di generare neurosfere. L'elevata percentuale di siero e la presenza di fattori mitogeni, FGF-b ed EGF, nel terreno proliferativo hanno condotto le cellule staminali a dividersi in continui cicli replicativi, generando ammassi di cellule progenitrici neuronali (Figura 4.3).

Prima di passare alla realizzazione dei costrutti tridimensionali, il protocollo per il differenziamento gliale e neuronale è stato testato su colture cellulari bidimensionali: mediante analisi di immunofluorescenza è stata appurata la sua efficacia differenziativa; mentre mediante cariotipo è stato vagliato il profilo cromosomico delle cellule sottoposte al differenziamento per garantire la sicurezza genetica del protocollo. Per poter utilizzare le cellule staminali nella terapia cellulare, oltre a seguire le Good Manufacturing Practice (Norme di Buona Fabbricazione), un insieme di regole per assicurare la qualità del prodotto finale e la sicurezza per il paziente, occorre dimostrare la loro stabilità genetica. L'impiego clinico di cellule manipolate in laboratorio richiede la conferma della loro "sicurezza genetica", cioè occorre provare che le cellule non abbiano un assetto genico alterato e che non siano tumorigeniche.

L'analisi di immunofluorescenza ha confermato l'efficacia del protocollo: dopo 14 giorni in terreno differenziativo gliale (Figura 4.4) e neuronale (Figura 4.5) le cellule assumono una morfologia adeguata al differenziamento ed esprimono specifici marcatori, quali GFAP e CNPase per il differenziamento gliale e β III Tubulina nel caso del differenziamento

neuronale. L'analisi del kariogramma delle colture cellulari durante la fase di proliferazione e di differenziamento gliale o neuronale non mostra alcuna alterazione cromosomica, come le stesse cellule a due giorni dall'isolamento dai tessuti di origine (Figura 4.6). L'assenza di qualsiasi alterazione strutturale come traslocazioni, delezioni ed inversioni, e la mancanza di variazioni nel numero di cromosomi hanno confermato la sicurezza del protocollo di differenziamento.

Dopo aver verificato il protocollo di differenziamento in monostrato, sono stati realizzati i costrutti tridimensionali combinando le cellule derivanti dalle neurosfere ai supporti a base di acido ialuronico e fibrina. In seguito al differenziamento gliale e neuronale di 14 giorni, al fine di determinare come le caratteristiche chimiche fisiche dei biomateriali impiegati come supporti tridimensionali possano influenzare il destino delle staminali, sono stati condotti test proliferativi, analisi morfologiche e dell'espressione genica.

Sia il supporto a base di acido ialuronico che quello a base di fibrina supportano la crescita e il differenziamento cellulare, come osservato dai saggi MTT (Figura 4.7), dimostrando che entrambi i supporti sono ben tollerati da entrambe le linee cellulari. Lo studio morfologico mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) (Figura 4.8) ha confermato la presenza di cellule con fenotipo gliale e neuronale su entrambi gli scaffolds.

Infine il differenziamento è stato confermato mediante lo studio del profilo di espressione genica attraverso la tecnica Real Time PCR (Figura 4.9). I costrutti sottoposti al differenziamento gliale e neuronale sono stati analizzati rispetto a una condizione controllo: coltura in terreno non differenziativo. I dati raccolti hanno mostrato un aumento di espressione dei marcatori gliali S100, CNPase e GFAP e del marcatore neuronale β III Tubulina quando i costrutti sono stati sottoposti a differenziamento gliale e neuronale rispettivamente. L'espressione dei marcatori sopra riportati però non mostra una differenza significativa tra i costrutti a base di acido ialuronico e quelli a base di fibrina.

In conclusione, le cellule staminali derivanti da pelle e da tessuto adiposo possono differenziare in cellule gliali e neuronali sia in monostrato che nelle tre dimensioni. Il protocollo testato, oltre ad essere efficace non determina alterazioni nell'assetto cromosomico delle cellule differenziate. I biomateriali a base di acido ialuronico e fibrina sono supporti adatti per il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in cellule gliali e neuronali.

Ricostruzione *in vitro* di tessuto osseo vascolarizzato

Nonostante il tessuto osseo abbia un'innata capacità rigenerativa, generalmente la sua spontanea guarigione in seguito a resezione di grandi porzioni, a causa di gravi traumi, fratture e tumori non avviene così facilmente. In questi casi, per favorire la guarigione completa dell'osso, la pratica clinica prevede l'innesto di tessuto osseo autologo oppure allogenico. Sebbene l'autotrapianto e l'allograpianto diano risultati promettenti, essi sono limitati da diversi problemi tra cui la ridotta disponibilità e la morbosità del sito donatore, il lungo periodo di recupero e la possibile trasmissione di malattie [De Long W. G. Jr., 2007]. Negli ultimi anni, l'impiego di sostituti ossei bioingegnerizzati con cellule staminali mesenchimali (MSC) ha offerto un approccio alternativo promettente per il trattamento di difetti ossei di grandi dimensioni senza molti degli effetti collaterali associati alle terapie convenzionali. Tuttavia, l'impiego dei sostituti ossei cellularizzati trova alcune limitazioni a causa della loro limitata osteointegrazione dovuta a una scarsa vascolarizzazione dell'innesto stesso. Nei tessuti naturali, le cellule sono distribuite a non più di 200 nm di distanza dai capillari: una distanza sufficiente per la diffusione di ossigeno, sostanze nutritive e rifiuti. Allo stesso modo, anche le cellule dei tessuti ingegnerizzati in laboratorio, una volta impiantate, dovrebbero trovarsi alla stessa distanza dal più vicino capillare per garantire la loro sopravvivenza [Lovett M., 2009]. In genere i sostituti ossei, quando vengono trapiantati nel tessuto ospite, vengono vascolarizzati come conseguenza alla risposta infiammatoria necessaria per la guarigione della ferita. Inoltre, anche lo stato di ipossia, in cui si trovano le cellule del sostituto, può favorire la vascolarizzazione dell'innesto attraverso il rilascio di fattori di crescita angiogenici. Tuttavia, questa vascolarizzazione spontanea è molto limitata e troppo lenta per poter raggiungere le cellule nella parte interna dell'impianto. Quindi la vascolarizzazione del sostituto osseo rimane un grosso ostacolo da superare per ottenere risultati clinici soddisfacenti.

Alla luce di queste considerazioni, è stato sviluppato un modello *in vitro* di tessuto osseo vascolarizzato a partire da MSC del tessuto adiposo (ADSC). Il tessuto adiposo è un'interessante fonte di MSC in quanto è un tessuto abbondante e facilmente accessibile e da esso, *in vitro*, è possibile ottenere un gran numero di cellule in pochi passaggi di coltura evitando il rischio di senescenza e l'insorgere di anomalie cromosomiche. La multipotenza delle ADSC, dovuta alla loro origine mesenchimale, è stata ampiamente dimostrata insieme al loro differenziamento osteogenico [Zuk P. A., 2002]. Inoltre le ADSC sono caratterizzate da una particolare plasticità verso il fenotipo endoteliale, una caratteristica legata all'origine e alla fisiologia del tessuto adiposo. Infatti, lo sviluppo del tessuto adiposo è strettamente

correlato allo sviluppo della rete capillare necessaria al suo mantenimento: l'angiogenesi e l'adipogenesi sono coordinati nel tempo e nello spazio [Casteilla L., 2011].

Alla luce di tali considerazioni, sono state sfruttate le proprietà delle ADSC per ricostruire *in vitro* un tessuto osseo con elementi vascolari allo scopo di favorire la sopravvivenza cellulare dopo l'impianto del costruito.

Su matrici a base di idrossiapatite, le ADSC sono state seminate e coltivate in presenza di fattori osteogenici ed endoteliali per 21 giorni. Ad intervalli di 7 giorni sono state effettuate analisi morfologiche, test di proliferazione, analisi di espressione genica e di citogenetica molecolare.

L'analisi morfologica mediante SEM (Figura 4.10) ha dimostrato la graduale proliferazione delle ADSC anche all'interno delle cavità del biomateriale. Dopo 21 giorni di coltura in terreno differenziativo osteo-endoteliale, le cellule hanno costituito un sottile strato continuo sulla superficie del biomateriale. La proliferazione delle cellule sullo scaffold è stata confermata anche dal saggio di vitalità MTT (Figura 4.11 A) e dalla quantificazione delle cellule adese alle matrici (Figura 4.11 B).

Il differenziamento osteogenico ed endoteliale delle ADSC è stato determinato attraverso l'analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR. Tre differenti modalità di differenziamento sono state testate: (a) coltura tridimensionali di ADSC in presenza di fattori osteogenici; (b) coltura tridimensionali di ADSC in presenza di fattori endoteliali; (c) coltura tridimensionali di ADSC in presenza di entrambi i fattori (Figura 4.12).

Già dopo una settimana di coltura sul supporto tridimensionale, il differenziamento osteogenico ha determinato l'espressione dei componenti della matrice ossea: Osteopontina, Osteonectina e Osteocalcina, fondamentali per l'interazione tra la matrice extracellulare e le cellule, e per la mineralizzazione della matrice stessa. La corretta composizione della matrice extracellulare è stata confermata anche dall'espressione del Collagene di tipo I, essenziale per la formazione e la maturazione dei cristalli di idrossiapatite (Figura 4.12 A).

Il differenziamento osteogenico è stato studiato anche mediante la valutazione dell'espressione dei fattori trascrizionali RUNX2 e PPAR γ . Il differenziamento delle MSC è regolato dall'espressione e/o attivazione di questi fattori trascrizionali: RUNX2 determina il differenziamento in osteoblasti, mentre PPAR γ quello in adipociti. Oltre a ciò, PPAR γ svolge un importante ruolo nel metabolismo delle ossa [Viccica G., 2010]. Esso favorisce l'adipogenesi a discapito dell'osteoblastogenesi, in particolare inibendo la funzione di RUNX2 e riducendo il numero degli osteoblasti nel midollo osseo. Al contrario, l'aumento dell'espressione di RUNX2 inibisce l'adipogenesi favorendo l'osteogenesi [Kawai M., 2009].

Le colture tridimensionali delle ADSC in presenza dei fattori osteogenici mostrano un graduale aumento nel tempo dell'espressione di RUNX2 e allo stesso tempo una marcata riduzione dell'espressione di PPAR γ , confermando il differenziamento osteogenico a discapito di quello adipogenico. Mentre il co-differenziamento osteogenico ed endoteliale delle colture tridimensionali delle ADSC ha determinato un maggiore aumento nel tempo dell'espressione di tutti marcatori osteogenici sopra citati, associato ad un aumento, protratto nel tempo, dell'espressione del marcatore superficiale endoteliale CD31 e dei fattori endoteliali solubili vW e VEGF (Figura 4.12 C). Quindi, il co-differenziamento tridimensionale ha determinato la ricostruzione *in vitro* di un sostituto osseo cellularizzato costituito sia da una componente ossea che da una componente endoteliale, necessaria al mantenimento e allo sviluppo del sostituto osseo.

La formazione di una vera e propria rete capillare all'interno del costruito è stata osservata in seguito al trapianto *in vivo* dei costrutti co-differenziati. In ratti immunocompromessi, in corrispondenza a lesioni effettuate sulle ossa piatte del cranio, sono stati impiantati sia il supporto senza cellule che il supporto con le cellule differenziate in senso osteogenico ed endoteliale. Anche in questo caso, le analisi morfologiche ed molecolari effettuate sugli innesti a tre settimane dall'impianto (Figura 4.13) mostrano la presenza di cellule endoteliali e della linea osteogenica negli innesti a base di cellule staminali.

Da qualche anno, il trapianto nell'uomo di tessuti bioingegnerizzati in laboratorio richiede la convalida della loro sicurezza, cioè l'assenza di alterazioni geniche. Questa sicurezza potrebbe essere accertata dalla convalida della stabilità cromosomica mediante l'analisi del cariotipo. Essa rappresenta uno dei più comuni test diagnostici per la determinazione di eventuali anomalie cromosomiche nel campo della oncologia, ginecologia e pediatria. Questa metodica si basa sullo sviluppo di una coltura cellulare in monostrato e la successiva analisi al microscopio delle cellule in metafase dopo il trattamento con un bloccante del fuso mitotico. L'analisi del cariotipo non è quindi applicabile a colture tridimensionali. Per questa ragione la stabilità genica dei costrutti osteo-endoteliali è stata analizzata mediante un approccio innovativo: il Comparative Genomic Hybridization (CGH) array. Questa tecnica di citogenetica molecolare si basa sull'estrazione del DNA delle cellule e la successiva identificazione di eventuali variazioni del numero di copie dei geni distribuiti lungo tutto il genoma. Esso permette di quantificare delezioni o amplificazioni nel genoma con una risoluzione maggiore rispetto al cariotipo, definendo con precisione le dimensioni e i punti di inizio e di fine delle regioni coinvolte nello sbilanciamento.

Tramite il CGH array è stata confermata la stabilità genica dei costrutti tridimensionali (Figura 4.14), confermando che la coltura a lungo termine in presenza dei fattori differenziativi non è in grado di determinare alterazioni strutturali del DNA.

In conclusione, è stato ricostruito *in vitro* un tessuto osseo vascolarizzato combinando le ADSC ad uno scaffold a base di idrossiapatite. I test hanno dimostrato il contemporaneo differenziamento delle ADSC in cellule endoteliali ed osteogeniche all'interno dello stesso supporto tridimensionale, favorendo l'angiogenesi nel costrutto una volta impiantato *in vivo*. Infatti, lo sviluppo di nuovi vasi all'interno dell'innesto è un processo auspicabile per garantire la sopravvivenza a lungo termine delle cellule impiantate e l'osteointegrazione del sostituto bioingegnerizzato. Inoltre, attraverso l'analisi di CGH array, è stata convalidata la sicurezza genica del costrutto per un suo potenziale impianto nell'uomo.

Ricostruzione *in vitro* di tessuto simil-dentale

Nonostante il dente sia caratterizzato da una struttura complessa, che gli conferisce durezza e resistenza nel tempo, esso è vulnerabile a traumi e infezioni batteriche. Quando il dente danneggiato è ancora in condizioni riparabili, la rigenerazione di alcune parti della struttura può prevenire o ritardare la perdita dell'intero dente. Ciò è importante perché la perdita dei denti non determina solo conseguenze estetiche, ma colpisce anche le funzioni basali della bocca e la qualità della vita [Huang G. T., 2009]. La rigenerazione del dente, in seguito a traumi o degenerazioni strutturali, dipende dal compartimento colpito poiché il dente è costituito sia da tessuti ricchi di cellule come il legamento parodontale, il cemento e la polpa, sia da tessuti acellulari come lo smalto e la dentina. Di tutte le componenti strutturali del dente, solo lo smalto non è in grado di rigenerare la sua struttura originaria, mentre gli altri tessuti, in misura diversa, possiedono capacità rigenerative e dipendenti da molteplici fattori [Inanç B, 2011].

In seguito a un danno alla struttura del dente, la polpa svolge un importante ruolo nella rigenerazione, partecipando a un processo chiamato dentinogenesi riparativa. Quando la polpa dentale è esposta, a causa della perdita della dentina sovrastante, la sua copertura con un materiale simile al cemento dentale permette alla polpa di generare nuova dentina: le cellule della polpa sana migrano nel sito del danno dove proliferano per la presenza di fattori di crescita rilasciati nella matrice della dentina circostante e formano osteodentina sullo strato necrotico. Successivamente, le cellule nell'osteodentina differenziano in odontoblasti che sintetizzano la dentina riparativa. Questo tessuto mineralizzato svolge due funzioni importanti: preserva l'integrità della polpa e funge da barriera protettiva [Nakashima M., 2005]. In caso di grandi traumi o di carie avanzate la rigenerazione di una grande porzione di dentina è difficile, per cui in genere si interviene con una terapia canalare, in cui la polpa è interamente rimossa e la camera pulpare è riempita con guttaperca. Poiché una polpa dentale vitale è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi del dente e per la longevità del dente stesso, la terapia ideale è rappresentata da un approccio rigenerativo in cui i tessuti malati e la polpa necrotica vengono rimossi e sostituiti con nuovo tessuto pulpare al fine di rivitalizzare il dente. In particolare, la terapia rigenerativa della polpa ha lo scopo di ricostituire tessuto pulpare sano da porre nella zona al confine con la dentina per poter regolare il processo di dentinogenesi riparativa. In base alle condizioni cliniche si possono effettuare due tipi di rigenerazione della polpa dentale: la rigenerazione parziale della polpa *in situ* oppure la sostituzione totale con una polpa sintetizzata *de novo* [Sun H. H., 2011]

La rigenerazione e l'ingegnerizzazione del tessuto della polpa dentale è ancora un obiettivo difficile da raggiungere. Il tessuto di una polpa ingegnerizzata dovrebbe essere completamente funzionalizzato: dovrebbe essere vascolarizzato e innervato, avere la densità cellulare e la matrice extracellulare strutturalmente simile alla polpa naturale, essere in grado di generare nuovi odontoblasti e nuova dentina.

Il primo passo verso la rigenerazione della polpa dentale è l'isolamento e l'amplificazione di cellule in grado di differenziare e produrre le strutture sopra citate. A tal fine è stato proposto l'impiego di cellule staminali della polpa (DPSC) non solo perché costituiscono fisiologicamente la polpa dentale, ma anche per la loro origine mesenchimale e la capacità di differenziare in odontoblasti [Gronthos S., 2000] e neuroni [d'Aquino R., 2009].

Tramite digestione enzimatica, sono state isolate le DPSC da terzi molari provenienti da donatori di differenti età per determinare da quale fascia di età fosse possibile ricavare quantità considerevoli di cellule staminali nel minor tempo possibile. A tale scopo, a diversi passaggi di coltura, sono stati calcolati i Population Doubling Time (PDT) di cellule ricavate da donatori di diversa età in presenza di terreno non differenziativo (Figura 4.15). I dati ottenuti indicano che ai primi passaggi di coltura, a prescindere dall'età del donatore, le DPSC proliferano velocemente, mentre è stata registrata una riduzione dei valori di PDT all'aumentare dei passaggi di amplificazione. Solo le DPSC isolate da donatori di età attorno ai 25 anni non rispettano questo andamento. Esse, indipendentemente dal passaggio di coltura, mantengono una velocità di proliferazione costante. Per questa caratteristica, le DPSC derivanti da soggetti facenti parte a quest'ultima categoria sono state utilizzate per la ricostruzione *in vitro* di tessuto simil-dentale.

Prima della realizzazione del costrutto sono stati condotti test di immunofluorescenza e di espressione genica preliminari in monostrato per valutare le capacità differenziative delle DPSC: esse sono state sottoposte a differenziamento gliale (Figura 4.16), neuronale (Figura 4.17) ed endoteliale (Figura 4.18) dimostrando l'espressione dei marcatori Nestina, S100, CNPase e GFAP nel caso del differenziamento gliale; l'espressione di Nestina e β III tubulina nel caso di quello neuronale e infine di CD31 e di vW per quello endoteliale.

Appurate le abilità differenziative delle DPSC sono stati realizzati costrutti tridimensionali utilizzando un biomateriale derivante dalla completa esterificazione dell'acido ialuronico in forma di non woven per mimare la struttura, ricca di fibre, della matrice extracellulare della polpa dentale. Su queste matrici, precedentemente imbibite con una miscela di fattori gliali e neuronali sono state seminate le DPSC in presenza di terreno differenziativo endoteliale. Dopo 14 giorni di differenziamento i costrutti, analizzati mediante colorazione Ematossilina-

Eosina ed immunofluorescenza (Figura 4.19), mostrano infiltrazione delle cellule nel supporto tridimensionale e la deposizione di matrice extracellulare, in particolare di Collagene di tipo I e l'espressione di GFAP, β III Tubulina e vW, marcatori del differenziamento gliale, neuronale ed endoteliale rispettivamente.

L'insieme di questi risultati ha permesso innanzitutto di individuare la fonte da cui ricavare le DPSC in quantità maggiore e nel minor tempo. La semina di queste cellule su un supporto tridimensionale a base di acido ialuronico sottoforma di tessuto non tessuto, simile alla matrice extracellulare pulpare, potrebbe fornire un modello per la rigenerazione della polpa dentale. Inoltre, il differenziamento su queste matrici delle DPSC in senso gliale, neuronale ed endoteliale rende promettente l'impiego di questo sostituto nella rigenerazione della componente nervosa e vascolare della polpa dentale. Ciononostante, i dati raccolti non sono sufficienti a valutare l'efficacia del modello; ulteriori analisi dovrebbero essere condotte per definire l'utilità di questo costrutto nella rigenerazione della polpa dentale.

Bibliografia

Abedin M, Tintut Y, Demer L L. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res.* **2004**, 95, 671-676.

Alsalamah S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **2004**, 50, 1522-1532.

Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther.* **2010**, 21, 1226-1238.

Balasundaram G, Webster T J. An overview of nano-polymers for orthopedic applications. *Macromol Biosci.* **2007**, 7, 635-642.

Bluteau G, Luder H U, De Bari C, Mitsiadis T A. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* **2008**, 16, 1-9.

Bressan E, Favero V, Gardin C, Ferroni L, Iacobellis L, Favero L, Vindigni V, Berengo M, Sivoilella S, Zavan B. Biopolymers for Hard and Soft Engineered Tissues: Application in Odontoiatric and Plastic Surgery Field. *Polymers* **2011**, 3, 509-526.

Capitani S, comoglio P, Molinaro M, nussdorfer G. Capitolo 8: Osso. Trattato di Istologia. *McGraw-Hill.* **1996**, 209-251.

Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells.* **2011**, 3, 25-33.

Chen L B, Jiang X B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol.* **2004**, 10, 3016-3020.

d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* **2009**, 318B, 408-415.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* **2007**, 6, 1162-1171.

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch J R, Raymackers J M, Luyten F P. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol.* **2003**, 160, 909-918.

De Felici M, Boitani C, Bouchè M, Canipari R, Dolfi A, Filippini A, Musarò A, Papaccio G, Salustri A. Embriologia Umana: Morfogenesi, Processi Molecolari, Aspetti Clinici. *Piccin.* **2009**.

De Long W G Jr, Einhorn T A, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am.* **2007**, 89, 649-658.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Meth.* **1986**, 89, 271-277.

Dennis J E, Carbillet J P, Caplan A I, Charbord P. The STRO1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs.* **2002**, 170, 73-82.

Dhandayuthapani B, Krishnan U M, Sethuraman S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **2010**, 94, 264-272.

Ferguson D B. Biologia del cavo orale - Istologia Biochimica Fisiologia. *Ambrosiana.* **2002**.

Fernandes K J, McKenzie I A, Mill P, Smith K M, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi N R, Toma J G, Kaplan D R, Labosky P A, Rafuse V, Hui C C, Miller F D. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* **2004**, 6, 1082-1093.

Finkemeier C G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2002**, 84, 454-464.

Fonzi L. Anatomia funzionale e clinica dello splancnocranio. *Edi-Ermes*. **2000**.

Foster K, Greenhalgh D, Gamelli R L, Mozingo D, Gibran N, Neumeister M, Abrams S Z, Hantak E, Grubbs L, Ploder B, Schofield N, Riina L H. Efficacy and safety of a fibrin sealant for adherence of autologous skin grafts to burn wounds: results of a phase 3 clinical study. *J Burn Care Res*. **2008**, 29, 293-303.

Franco Lambert A P, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, Pêgas Henriques J A Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation*. **2009**, 77, 221-228.

Friedenstein A J, Chailakhjan R K, Lalykina K S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. **1970**, 3, 393-403.

Gardin C, Ferroni L, Favero L, Stellini E, Stomaci D, Sivoletta St, Bressan E, Zavan B. Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. *Int. J. Mol. Sci*. **2012**, 13, 737-757.

Goracci G, Mori G, Baldi M. Terminal end of the human odontoblast process: a study using SEM and confocal microscopy. *Clin Oral Investig*. **1999**, 3, 126-132.

Griffin M D, Ritter T, Mahon B P. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther*. **2010**, 21, 1641-1655.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey P G, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2000**, 97, 13625-13630.

Haynesworth S E, Baber M A, Caplan A I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. **1992**, 13, 69-80.

Helary C, Abed A, Mosser G, Louedec L, Meddahi-Pellé A, Giraud-Guille M M. Synthesis and in vivo integration of improved concentrated collagen hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med*. **2011**, 5, 248-252.

Ho C L, Liem R K. Intermediate filaments in the nervous system: implications in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. **1996**, 15, 483-497.

Huang G T, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* **2009**, 88, 792-806.

Huang G T. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med.* **2009**, 5, 697-707.

Inanç B, Elçin Y M. Stem cells in tooth tissue regeneration - challenges and limitations. *Stem Cell Rev.* **2011**, 7, 683-692.

Jones E A, Kinsey S E, English A, Jones R A, Straszynski L, Meredith D M, Markham A F, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* **2002**, 46, 3349-3360.

Kahn S A, Beers R J, Lentz C W. Use of acellular dermal replacement in reconstruction of nonhealing lower extremity wounds. *J Burn Care Res.* **2011**, 32, 124-128.

Kawai M, Devlin M J, Rosen CJ. Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Rheumatol.* **2009**, 5, 365-372.

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

Kuznetsov S A, Mankani M H, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey P G. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* **2001**, 153, 1133-1140.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* **2005**, 8, 1394-1402.

Lee K D, Kuo T K, Whang-Peng J, Chung Y F, Lin C T, Chou S H, Chen J R, Chen Y P, Lee O K. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* **2004**, 40, 1275-1284.

Levesque J B, Takamatsu Y, Hilsson S K, Haylock D N, Simmons R J. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow

following hematopoietic cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor. *Blood*. **2001**, 98, 1289–1290.

Long X, Olszewski M, Huang W, Kletzel M. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. **2005**, 14, 65-69.

Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan D L. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. **2009**, 15, 353-370.

Ma J, He X, Jabbari E. Osteogenic differentiation of marrow stromal cells on random and ligned electrospun poly(L-lactide) nanofibers. *Ann Biomed Eng*. **2011**, 39, 14-25.

Marino G, Rosso F, Ferdinando P, Grimaldi A, De Biasio G, Cafiero G, Barbarisi M, Barbarisi A. Growth and endothelial differentiation of adipose stem cells on polycaprolactone. *J Biomed Mater Res A*. **2011**, [Epub ahead of print].

Martini F H, Timmons M J, McKinley. Anatomia umana. *EdiSES*. **2002**

McKenzie I A, Biernaskie J, Toma J G, Midha R, Miller F D. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci*. **2006**, 26, 6651-6660.

Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Sawada H, Yamamoto I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg*. **2004**, 101, 806-812.

Min S K, Lee S C, Hong S D, Chung C P, Park W H, Min B M. The effect of a laminin-5-derived peptide coated onto chitin microfibers on re-epithelialization in early-stage wound healing. *Biomaterials*. **2010**, 31, 4725-4730.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher L W, Robey P G, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003**, 100, 5807-5812.

Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann K H. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. **2005**, 24, 155-165.

Muench M O, Suskind D L, Bárcena A. Isolation, growth and identification of colony-forming cells with erythroid, myeloid, dendritic cell and NK-cell potential from human fetal liver. *Biol Proced Online*. **2002**, 4, 10-23.

Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2005**, 16,369-376.

Nico B, Romagnoli P. Il tessuto nervoso. Il manuale di istologia. *Idelson-Gnocchi*. **2007**, 667-746.

Ogawa M, LaRue A C, Drake C J. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. *Blood*. **2006**, 108, 2893-2896.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson S M, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine D M, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. **2001**, 410, 701-705.

Paletta J R, Bockelmann S, Walz A, Theisen C, Wendorff J H, Greiner A, Fuchs-Winkelmann S, Schofer M D. RGD-functionalisation of PLLA nanofibers by surface coupling using plasma treatment: influence on stem cell differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. **2010**, 21, 1363-1369.

Pittenger M, Vanguri P, Simonetti D, Young R. Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*. **2002**, 2, 309-320.

Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*. **2005**, 36, S8-S12.

Rastrelli A, Beccaro M, Bigiano F, Calderoni G, Pastorello A. Hyaluronic acid esters, a new class of semisynthetic biopolymer: chemical and physico-chemical properties. *Clin Implant Material, Advances in Biomaterials* **1990**, 9, 199-205.

Rieske P, Azizi SA, Augelli B, Gaughan J, Krynska B. A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. *Eur J Neurosci*. **2007**, 25,31-37.

Romanov Y A, Svintsitskaya V A, Smirnov V N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. **2003**, 21, 105-110.

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

Seo B M, Miura M, Gronthos S, Bartold P M, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey P G, Wang C Y, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. **2004**, 364, 149-155.

Solchaga L A, Dennis J E, Goldberg V M, Caplan A I. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res*. **1999**, 17, 205-213.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B M, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang C Y, Shi S, Wang S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE*. **2006**, 1, e79.

Sun H H, Jin T, Yu Q, Chen F M. Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. **2011**, 5,e1-e16.

Thompson D F, Letassy N A, Thompson G D. Fibrin glue: a review of its preparation, efficacy, and adverse effects as a topical hemostat. *Drug Intell Clin Pharm*. **1988**, 22, 946-952.

Toma J G, Akhavan M, Fernandes K J., Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan D R, Miller F D. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. **2001**, 3, 778–784.

Toma J G, McKenzie I A, Bagli D, Miller F D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. **2005**, 23, 727-737.

Tran N, Webster T J. Nanotechnology for bone materials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. **2009**, 1, 336-351.

Tuli R, Seghatoleslami M R, Tuli S, Wang M L, Hozack W J, Manner P A, Danielson K G, Tuan R S. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol.* **2003**, 23, 37-49.

Viccia G, Francucci C M, Marcocci C. The role of PPAR γ for the osteoblastic differentiation. *J Endocrinol Invest.* **2010**, 33, 9-12.

Webster T J, Schadler L S, Siegel R W, Bizios R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue Eng.* **2001**, 7, 291-301.

Yen A, Sharpe P. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* **2008**, 331, 359–372.

Young H E, Steele T A, Bray R A, Hudson J, Floyd J A, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas P A, Black A C Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec.* **2001**, 264, 51-62.

Yu J, Thomson J A. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev.* **2008**, 22, 1987-1997.

Zallone A. Il tessuto osseo. Il manuale di istologia. *Idelson-Gnocchi.* **2007**, 591-618.

Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G, Cortivo R. Neural potential of adipose stem cells. *Discov Med.* **2010**, 10, 37-43.

Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D A, Huang J I, Mizuno H, Alfonso Z C, Fraser J K, Benhaim P, Hedrick M H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* **2002**, 13, 4279-4295.

Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, Huang J I, Futrell W J, Katz A J, Benhaim P, Lorenz H P, Hedrick M H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **2001**, 7, 211-226.