

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE**

Ciclo: XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 06/E3

Settore Scientifico disciplinare: Med 29

TITOLO TESI

**Allestimento di modello sperimentale su animali
di tessuto osseo ingegnerizzato**

Presentata da: dott. ssa Sara Ragazzini

Coordinatore Dottorato

Prof. Andrea Stella

Relatore

Prof. Claudio Marchetti

Relatore

Dott. Leonardo Ciocca

Esame finale anno 2015

INDICE

1.	
INTRODUZIONE	3
<i>1.1 - Cellule staminali</i>	<i>5</i>
<i>1.2 – Cellule staminali embrionali</i>	<i>9</i>
<i>1.3 - Cellule staminali adulte</i>	<i>9</i>
<i>1.3.1 - Caratterizzazione e differenziamento</i>	<i>14</i>
<i>1.3.2 - Cellule staminali mesenchimali (MSC)</i>	<i>15</i>
<i>1.4 – Scaffold</i>	<i>19</i>
<i>1.4.1 – Idrossiapatite</i>	<i>21</i>
2.	
OBIETTIVI	24
3. MATERIALI E METODI	25
<i>3.1 - Allestimento di colture primarie</i>	<i>25</i>
<i>3.2 – Costruzione dello scaffold</i>	<i>27</i>
<i>3.3 – Procedura chirurgica</i>	<i>30</i>
<i>3.4 – Analisi Istologica</i>	<i>33</i>
4. RISULTATI	35
<i>4.1 – Comportamento del materiale</i>	<i>35</i>
<i>4.1.1 - Interazione cellula materiale</i>	<i>36</i>
<i>4.1.2 - Degradazione materiale</i>	<i>37</i>
<i>4.1.3 – Porosità</i>	<i>39</i>
<i>4.2 – Crescita ossea</i>	<i>40</i>
5. DISCUSSIONE	44
6. CONCLUSIONI	48
7. BIBLIOGRAFIA	49

1. INTRODUZIONE

Nell'uomo, come in tutte le forme di vita multicellulari, la rigenerazione dei tessuti è un processo fisiologico di rinnovamento cellulare necessario per la sopravvivenza dell'organismo. Per i tessuti come sangue e pelle si tratta di un ricambio quotidiano con cellule giovani che sostituiscono quelle vecchie. In altri tessuti, come ossa e cuore, questo ricambio è assai più ridotto e lento. Alla base di questi processi rigenerativi vi sono popolazioni di cellule di riserva localizzate nei diversi tessuti, tanto più abbondanti quanto maggiore è la capacità e la necessità rigenerativa di quel tessuto. Si tratta delle cellule staminali, cellule immature in grado di automantenersi, cioè di moltiplicarsi all'infinito generando cellule identiche a se stesse. Pur replicandosi, le cellule staminali mantengono anche la capacità di specializzarsi nelle diverse tipologie cellulari mature dei tessuti e degli organi in cui si trovano. Ed è proprio grazie a questa attività che le cellule staminali del nostro corpo si replicano e si specializzano ogni giorno per sostituire le cellule usurate e permettere all'organismo di sopravvivere. Ed è proprio grazie a questa potenzialità che la scienza confida nel loro utilizzo come possibile cura di numerose malattie genetiche e nella comprensione della patogenesi di esse.

Strategie per la riparazione di difetti ossei di grandi dimensioni sono sempre più orientate verso sostituti ossei e osso ingegnerizzato con il fine di minimizzare la morbilità e il disagio per il paziente, ottimizzare i risultati e accelerare i tempi di guarigione. Attualmente, vi è grande interesse nella così detta ingegneria dei tessuti, un approccio multidisciplinare alla rigenerazione dei tessuti che integra principi di ingegneria con le scienze biologiche, bypassando gli inconvenienti di autotrapianti e migliorare le caratteristiche degli innesti eterologhi e le loro proprietà [1-3]. Diverse strategie sono adottate nella progettazione di scaffold grado di rigenerare osso che presentino buone caratteristiche meccaniche e proprietà funzionali quali la biocompatibilità, l'osteoconduzione, la bioattività, l'osteoinduzione, e biodegradazione [4]. Una delle sfide più importanti in ingegneria tissutale è quella di ottenere un ambiente idoneo e favorente l'attaccamento, la proliferazione e la differenziazione cellulare. A questo scopo, sono usati materiali porosi con una struttura tridimensionale (3D). La tridimensionalità offre uno spazio funzionale per la nuova

formazione ossea, il supporto necessario per le cellule a proliferare e mantenere le loro funzioni differenziative, imita molti ruoli della matrice extracellulare, e la sua architettura definisce la forma finale del nuovo osso [5-6]. Sperimentalmente tali 3D scaffold sono stati descritti nella sostituzione dell'articolazione temporo-mandibolare (ATM) del condilo nei primati [7-8], suini [9], e pecore [10]. Negli ultimi dieci anni, sono stati utilizzati sostituti ossei in combinazione con cellule osteogeniche per la prefabbricazione di innesti di osso bioartificiale in diversi studi su animali [11-19].

L'utilizzo di cellule staminali mesenchimali multipotenti (MSC) ha nuovi approcci terapeutici per la sostituzione ossea [20]. Lo scaffold può essere impiantato nel paziente con funzione di tessuto di sostituzione dopo essere stato colonizzato in vitro da MSC (ingegneria dei tessuti) o può essere seminato con MSC durante chirurgia (medicina rigenerativa). Le pecore hanno un rimodellamento osseo che segue un modello simile a quello degli esseri umani [21], con forze masticatorie simili. L'ATM subisce modifiche di adattamento durante i cicli masticatori che possono essere causati anche da piccoli spostamenti della testa del condilo, mentre importanti alterazioni degenerative possono svilupparsi in soggetti adulti a causa della loro scarsa attitudine subcondrale nel rimodellamento osseo. Per la loro sostituzione si è pensato a modelli che riproducano la forma esistente del condilo utilizzando a tal fine modelli CAD-CAM che mediante l'acquisizione dei dati della tomografia computerizzata (CT) possono riprodurre uno scaffold che mimi nella forma e nella geometria il condilo esistente [22-24]. A causa della loro prolungata masticazione quotidiana, i tubercoli articolari e le eminenze nelle pecore sono sottili, simili all'ATM umana, e quindi, da un punto di vista biomeccanico, le pecore sono i modelli sperimentali che si sono preferiti.

Abbiamo valutato un nuovo approccio con una progettazione CAD-CAM personalizzata per la realizzazione di uno scaffold in idrossiapatite pura e porosa (HA) per sostituire il condilo dell'ATM in 6 pecore. In primo luogo, abbiamo analizzato l'interazione tra lo scaffold e i tessuti circostanti (ossa e tessuti molli) per capire meglio le proprietà biologiche dello scaffold (osteointegrazione e degradazione del materiale). In secondo luogo, abbiamo esaminato il comportamento dello scaffold da un punto di vista qualitativo per quanto concerna la neo formazione

ossea sia all'interno dell'innesto che sulla superficie articolare. La nostra valutazione principale si è concentrata sulla formazione di nuovo osso all'interno dello scaffold attraverso la misurazione della porosità dell'HA, la riduzione dell'area totale dei pori nelle sezioni del condilo, e la zona piena di nuovo osso, con o senza MSC. Abbiamo valutato inoltre il comportamento dello scaffold e delle cellule al interfaccia con la cartilagine articolare e la capacità di riassorbimento dell'innesto.

1.1 - Cellule staminali

Il concetto di cellule staminali nacque alla fine del XIX secolo come postulato teorico per descrivere la capacità auto-rigenerativa di alcuni tessuti: tessuti costituiti per la maggior parte da cellule con una durata di vita limitata necessitano di una quantità di cellule deputate a sostenere il rinnovamento dei tipi cellulari funzionali per l'intera vita dell'organismo.

Le origini degli studi sulle cellule staminali risalgono già all'inizio del XX secolo quando l'istologo russo Alexander Maximov in un congresso di ematologia a Berlino introduce per la prima volta il termine stammzelle (da stamm, stipite, e zelle, cellula) per riferirsi a singole cellule capostipiti di una discendenza cellulare. Dovremmo però aspettare gli anni cinquanta e sessanta perché la ricerca vera e propria prenda ufficialmente il via con le prime pubblicazioni su queste cellule. E' il 1960, quando Ernest A. McCulloch e James E. Till [25-26] presso l'università di Toronto mettono in luce la proprietà autorigenerativa di almeno due cellule nel midollo osseo di topi. La prima popolazione scoperta rappresenta le cellule staminali emopoietiche, che danno origine a tutte le cellule del sangue. Successivamente, a distanza di anni fu scoperta una seconda popolazione, chiamata cellule staminali Mesenchimali (MSC) [27] e definisce quella popolazione di cellule derivate dallo stroma capaci di autorigenerare, aderire alla plastica e capaci di differenziare in osteoblasti, adipociti e condroblasti in vitro.[28-29]

Sempre in questi anni si annotano in America i primissimi tentativi di trapianto di midollo osseo ad opera dell'ematologo Donald Thomas (premio nobel per la Fisiologia e Medicina nel 1990),e qualche anno più tardi dall'oncologo Mathè [30] e dal medico Robert A. Good su pazienti affetti da gravi patologie neoplastiche o con sistema immunitario deficiatario.

In seguito, negli anni ottanta vengono ampliate le conoscenze sulle cellule staminali somatiche individuando nel cordone ombelicale una fonte inestimabile di cellule adulte, immature, multipotenti e molto facili da isolare. E' sempre di questo periodo la scoperta che scardina uno dei punti cardine della medicina. Nel 1981, Martin Evans riesce a dimostrare che le cellule nervose di ratto erano in grado di rigenerare [31]. La scoperta lasciò perplessi molti ricercatori che non credevano alla capacità rigenerativa delle cellule nervose adulte. Solo alla fine degli anni novanta, grazie anche agli studi di Samuele Weiss e Brent Reynolds sulla presenza di una riserva staminale neurale nel cervello adulto, la comunità scientifica accettò i postulati di Evans premiando lo scienziato con il premio Nobel alla Medicina nel 2007 .

Tuttavia, è solo nel 1998 che la scienza genetica compie il suo vero grande passo verso il futuro della ricerca nella ingegneria tissutale isolando dalla blastocisti umana (uno dei primi stadi di sviluppo embrionale) la Cellula Staminali Embrionale [32]. Si accendono così i riflettori su quello che sarà uno dei cavalli di battaglia della ricerca dei ultimi decenni. Negli ultimi anni numerosi gruppi di ricerca hanno deciso di dedicarsi allo studio delle cellule staminali, permettendo di identificarne molte altre varianti e di condurre studi preclinici su modelli animali per la terapia cellulare in tessuti danneggiati o malati.

Per definire una cellula come staminale sono utilizzati quattro criteri:

- 1_ la cellula deve poter andare incontro a molteplici e sequenziali divisioni cellulari di auto-mantenimento, un prerequisito per sostenere una popolazione cellulare.
- 2_ le cellule figlie derivate da una singola cellula staminale devono poter differenziare in almeno un diverso tipo cellulare rispetto a quello della staminale.
- 3_ capacità delle cellule di ripopolare il tessuto di origine se trapiantate in un sito ricevente danneggiato.

4_ le cellule staminali devono essere in grado di contribuire con una progenie differenziata in vivo anche in assenza di danni tissutali, questo criterio risulta al momento meno condiviso e più controverso.

In particolare due caratteristiche rendono la cellula staminale interessante agli occhi dei ricercatori:

l'auto-rinnovamento (o self-renewal) e **la plasticità**.

Per **auto-rinnovamento** si intende la capacità di compiere un numero illimitato di cicli replicativi mantenendo il medesimo stadio differenziativo. Ciascuna cellula staminale realizza l'auto-rinnovamento o tramite la divisione asimmetrica obbligata, dove la staminale dà origine ad un'altra staminale e ad una cellula destinata a differenziarsi oppure mediante differenziamento stocastico, dove una popolazione di cellule staminali si conserva poiché esiste un numero pressoché uguale di staminali che generano due staminali destinate a replicarsi e staminali che generano due cellule destinate a differenziarsi.

La **plasticità**, inteso come potenziale differenziativo, è la capacità di una cellula staminale di poter dare origine ad un intero organismo umano o alle sue diverse componenti cellulari di tessuto tramite il differenziamento. Ad oggi, in cima ad una ipotetica piramide gerarchica di potenzialità differenziativa si possono distinguere quattro tipi di cellule staminali : [33]

- La cellula staminale totipotente dalla quale può svilupparsi in un intero organismo, quali le cellule dei tessuti embrionali dell'individuo inclusi gli annessi extra-embryonali. Solo la cellula dei primissimi stadi dello sviluppo embrionale, risponde a questa caratteristica: lo zigote.

- Le cellule staminali pluripotenti . A questo gruppo appartengono due tipologie cellulari: le prime, presenti transitoriamente nella blastocisti, prendono il nome di cellule embrionali staminali (ES); le seconde, denominate "cellule iPS" (cellule dalla pluripotenza indotta) [34] sono invece il risultato di una recente scoperta che prevede una manipolazione in laboratorio, sono ottenute riprogrammando cellule mature adulte a cellule simil-ES. Diversamente dallo zigote, le cellule

pluripotenti non possono differenziare in un organismo completo. Tuttavia mantengono un elevato potenziale differenziativo in quanto sono in grado di produrre i derivati dei tre foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma ed endoderma) e quindi di generare staminali tessuto-specifiche oltre alle tipologie di cellule funzionalmente mature che da esse derivano. Si tratta delle oltre 250 grosse tipologie di cellule presenti nel feto e nell'organismo adulto. Le cellule pluripotenti non possono generare cellule dei tessuti extra-embryonali (trofoectoderma e placenta).

- Le cellule staminali multipotenti. Sono le cellule staminali adulte e tessuto-specifiche (dette anche somatiche), presenti nei diversi tessuti del feto e dell'organismo adulto e in grado di differenziare solamente nei tipi cellulari del tessuto di cui fanno parte. Per esempio la cellula staminale ematopoietica differenzia generando gli 8 principali tipi cellulari maturi che compongono il sangue. È importante sottolineare che le cellule staminali adulte (del sangue, della pelle, del muscolo, del sistema nervoso, del rene, ecc), sebbene raggruppate in un'unica tipologia, comprendono categorie e definiscono ambiti di ricerca ben distinti in quanto a caratteristiche delle cellule, possibilità del loro isolamento ed espansione, potenzialità differenziativa e potenziali impieghi terapeutici. Nelle diverse tipologie di cellule staminali presenti nelle varie fasi dello sviluppo si assiste ad un graduale restringimento delle potenzialità differenziative delle cellule.

- Le cellule staminali unipotenti o bipotenti possono generare solamente un tipo di cellula specializzata. Tra queste troviamo i precursori.

Possiamo identificare due macro gruppi: le cellule staminali embrionali e le cellule staminali adulte.

1.2 – Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (ES) si presentano nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale umano caratterizzato dalla comparsa di un centinaio di cellule speciali, presenti esclusivamente nelle blastocisti, evoluzione dello zigote. Queste cellule cominciano a proliferare, creando tre linee di cellule capaci di dividersi in modo illimitato pur conservando un elevato potenziale differenziativo. Da queste linee cellulari si formano tre foglietti germinativi rispettivamente l'Endoderma, il Mesoderma e l'Ectoderma da cui si generano tutti i tessuti e gli organi dell'organismo umano. Ciò significa che le cellule ES che derivano dagli embrioni allo stadio di blastocisti e in particolare dalla cosiddetta inner cell mass, la massa cellulare interna, sono in grado di produrre tutti i derivati cellulari specializzati dei tre foglietti germinativi e quindi di generare tutte le successive cellule specifiche per i diversi tessuti dell'organismo, meglio conosciute come cellule staminali adulte.

Ad oggi, sono state isolate negli anni tre tipi di cellule staminali embrionali : embryonic germ cells (EG) di derivazione dalla blastocisti; le embryonic stemcells (ES) isolate del feto umano; le embryonal carcinoma cells (EC), le primissime cellule staminali pluripotenti identificate nel teratocarcinoma, uno strano tumore gonadico costituito da tessuti derivanti dai tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma) [35]. Le cellule EC prelevate da tumori testicolari dell'adulto e coltivate in terreno danno luogo a una linea di cellule EC che come tali rimangono indifferenziate con un'elevata capacità proliferativa [36-37-38].

1.2 - Cellule staminali adulte

Nonostante l'esistenza di cellule staminali sia stata postulata prima nei tessuti adulti e poi in quelli embrionali, per parecchi anni l'interesse che questi ultimi hanno suscitato è stato superiore di quelli adulti per la loro maggiore plasticità e capacità di autorinnovamento. Da una parte difficoltà

sperimentali e dall'altra problemi etici hanno in seguito spostato questo interesse anche sulle staminali adulte.

Questo tipo cellulare è l'unico ad essere fino ad ora usato a scopo terapeutico.

Ontologicamente, *le cellule staminali adulte* originano dalle cellule staminali embrionali che si trovano nella massa interna delle blastocisti. La caratteristica principale di queste cellule è di essere indifferenziate, non specializzate, cioè non hanno ancora acquisito una funzione ben definita e specifica. Queste cellule sono dette più propriamente somatiche (dal Greco σῶμα; sōma = corpo) poichè possono essere isolate non solo dall'individuo adulto il cui numero di cellule declina progressivamente fino a raggiungere valori minimi in tarda età, ma anche dai vari tessuti umani durante tutto il periodo dello sviluppo fetale, con una attenzione particolare per le cellule staminali somatiche prelevate da cordone ombelicale.

La loro funzione predominante è di contribuire al mantenimento dell'omeostasi tissutale, generando una progenie di cellule differenziate che sostituisce le cellule mature andate perse a causa di rinnovamento fisiologico o di lesioni. Il grado con cui le cellule staminali svolgono questa funzione può variare significativamente da tessuto a tessuto. Molti tessuti adulti, come l'epidermide, l'epitelio dell'intestino tenue e il sistema ematopoietico, sono sottoposti a un continuo rinnovamento cellulare. Di conseguenza questi organi possiedono la capacità di rigenerare il tessuto lesionato, ammesso che il danno non sia particolarmente severo. Altri tessuti come quello muscolare cardiaco e in particolare quello nervoso sono sempre stati per lungo tempo considerati incapaci di rigenerazione cellulare e, di conseguenza, privi di cellule staminali. Tuttavia, alcuni studi hanno rivelato una, seppur minima, attività rigenerativa anche in questi tessuti [39]. Il numero di cellule staminali all'interno di un determinato tessuto è regolato non a livello di singola cellula ma di popolazione cellulare. Le cellule staminali compiono divisioni simmetriche in cui le due cellule figlie sono identiche (divisione espansiva) o, in alternativa, diverse dalla cellula madre staminale (divisione differenziativa). L'automantenimento è perciò garantito dall'equilibrio numerico tra i due tipi di divisione simmetrica all'interno della popolazione. Tale sistema ha il vantaggio di poter

aumentare o diminuire il numero di cellule staminali entro un tessuto quando se ne presenti la necessità. Un secondo modello, detto deterministico, prevede che una singola cellula staminale, ad ogni divisione mitotica, dia origine a due cellule figlie di cui almeno una è identica alla cellula madre mentre l'altra è una cellula progenitrice che si differenzia in un determinato "tipo" cellulare. Una divisione di questo tipo è detta asimmetrica in quanto le due cellule figlie seguono vie di sviluppo diverse. Questo modello garantisce sia la conservazione di un numero stabile di cellule staminali e la concomitante produzione di un elevato numero di cellule differenziate, ma il numero di cellule staminali non potrà mai aumentare a prescindere dal numero di cicli effettuati da ciascuna cellula staminale.

La maggior parte delle cellule staminali utilizza entrambi questi metodi di divisione e l'equilibrio tra i due modelli è controllato dallo stadio dello sviluppo dell'organismo e da fattori ambientali [40].

Tra il comportamento staminale somatico e le cellule mature di un tessuto esiste un comportamento intermedio, quello dei progenitori di transito. In tali cellule la capacità di proliferare si mantiene per un numero limitato di cicli e si esaurisce quando esse si differenziano in un numero elevato di cellule mature. La divisione in questi tre comportamenti (staminale, di transito e differenziato) consente la produzione di un consistente numero di cellule tessutali mature a fronte di un numero di divisioni delle cellule staminali estremamente ridotto. In questo modo, il patrimonio genetico delle cellule staminali risulta protetto dal rischio di mutazioni che potrebbero accumularsi durante la replicazione del DNA [41].

Quindi da una popolazione immatura e ad elevato potenziale differenziativo (staminali somatiche) si arriva alla formazione di cellule mature e quiescenti o scarsamente proliferanti dopo essere passati attraverso le cellule di transito con caratteristiche intermedie.

Questo processo trova una corrispondenza nei domini anatomici di molti tessuti adulti sede di rigenerazione cellulare. Al loro interno troviamo le varie popolazioni cellulari e avvengono

sequenzialmente i processi di proliferazione e differenziamento. Le cellule staminali somatiche si trovano localizzate in nicchie ristrette e piuttosto profonde dei tessuti. Al loro interno (la parte centrale del midollo osseo nel sistema emopoietico, la base della cripta intestinale, lo strato germinativo dell'epidermide, la zona periventricolare dei ventricoli del cervello) risiede la popolazione di cellule staminali e avvengono i fenomeni alla base dell'automantenimento. Verso gli strati cellulari più distali si evidenzia la zona di transizione, ricca di cellule progenitrici intermedie e sede del fenomeno di amplificazione cellulare e, infine, verso gli strati più distanti dalla nicchia si ritrovano le cellule differenziate a stadi progressivi di maturazione [42-43].

Storicamente si sosteneva che le cellule staminali adulte fossero "entità" tessuto specifiche il cui potenziale differenziativo era limitato alla generazione di tipi cellulari maturi del tessuto/organo di residenza. Tuttavia negli ultimi anni sono comparse molte pubblicazioni che affrontano quella che si sta rivelando come una delle più sorprendenti caratteristiche funzionali delle cellule staminali, vale a dire la loro capacità di transdifferenziamento. Grazie a questa loro caratteristica peculiare, le cellule staminali dell'adulto sono in grado di dare origine a cellule differenziate di tessuti e organi diversi da quelli in cui risiedono [44].

Rispetto a quelle embrionali, però, le cellule staminali adulte hanno degli svantaggi: sono numericamente scarse, hanno una ridotta capacità di autorinnovamento e dopo alcune divisioni cellulari tendono a perdere le caratteristiche di pluripotenzialità.

Le cellule staminali adulte si dividono in cellule staminali derivanti da tessuti di origine mesodermica, ectodermica ed endodermica. Alla prima categoria appartengono le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che hanno la capacità di ricostruire l'intero sistema ematopoietico in quanto da esse derivano tutti gli elementi corpuscolari del sangue: eritrociti, piastrine, granulociti, monociti e linfociti (B; T; NK). Le HSC sono state riconosciute come cellule staminali più di 50 anni fa [45] e sono utilizzate ormai da anni nel trattamento di numerosi disordini ematologici. Possono venire isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal sangue del cordone ombelicale.

Di origine mesodermica sono anche le cellule staminali del muscolo scheletrico, dette cellule satellite. Scoperte da Katz e Mauro nel 1961, sono cellule miogeniche, multinucleate e quiescenti localizzate sulla superficie delle fibre muscolari differenziate in modo terminale, tra il sarcolemma e la membrana basale. Tali cellule normalmente non si dividono ma fungono da popolazione cellulare di riserva che in seguito a danno muscolare, è in grado di proliferare e ricapitolare il programma di differenziazione muscolare fino a differenziarsi in miofibre [46].

Cellule epiteliali di origine ectodermica ed endodermica sono state identificate nel sistema nervoso, nell'epidermide, nei follicoli dei capelli, nella cornea, nell'epitelio respiratorio e in quello del canale digerente, nel pancreas e nel fegato. Queste cellule rivestono sia superfici interne che esterne e svolgono varie funzioni come la secrezione, l'assorbimento e il mantenimento dell'integrità delle superfici. L'epidermide ad esempio, contiene, a livello della regione basale, cellule staminali (Epithelial Stem Cells, EpSC) che differenziano in cheratinociti mentre si muovono verso gli strati più esterni della pelle [47]; anche le cellule presenti nell'epitelio dell'intestino si rinnovano continuamente grazie alla proliferazione ed al differenziamento di cellule staminali (Intestinal Stem Cells, ISC) individuate nelle cripte di Lieberkuhn.

Anche a livello del tessuto nervoso ritenuto fino a poco tempo fa incapace di rigenerarsi, sono state identificate cellule staminali (Neural Stem Cells, NSC). Le NSC nei mammiferi sono state isolate dalla zona subventricolare dell'encefalo e nel giro dentato dell'ippocampo [48]. Esse sono positive per la nestina ed in vitro, oltre che formare neurosfere, sono in grado di differenziarsi sia in neuroni che in cellule della glia (astrociti e oligodendrociti).

Nel fegato le cellule staminali residenti sono le cellule ovali (o Liver Progenitor Cells, LPC) che si trovano localizzate nell'epitelio dei canali di Hering. Tali cellule sono bipotenti in quanto possono differenziarsi in epatociti e colangiociti, cellule epiteliali del dotto biliare.

Riassumendo, le cellule staminali adulte oltre a contribuire allo sviluppo post-natale dell'individuo, svolgono il ruolo fondamentale di mantenere il normale turnover cellulare riparando i danni dei tessuti in cui si trovano immerse. La letteratura indica che le cellule staminali adulte sono state derivate da diversi organismi e tessuti: midollo osseo, sangue periferico, epitelio della pelle e dell'apparato digerente, vasi sanguigni, muscolo scheletrico, cornea, retina, cuore, fegato e pancreas. Ed è proprio grazie a queste capacità che le cellule staminali sono rese così appetibili e potenzialmente applicabili a terapie curative in:

- Patologie dell'epidermide (epidermiolisi bullosa ma anche gravi ustioni);
- Sostituzione delle cellule dopaminergiche nell'encefalo di pazienti malati di parkinson;
- Trapianto di cellule beta, capaci di produrre insulina nel pancreas di pazienti di tipo uno;
- Riproduzione del tessuto muscolare scheletrico in pazienti con distrofia muscolare di Duchenne;
- Riparazione del muscolo cardiaco dopo l'infarto;
- Patologie epatiche

1.3.1 - Caratterizzazione e differenziamento

I criteri di staminalità sono stati ampiamente validati con le cellule HSC.

Una singola HSC può andare incontro a divisioni di auto-mantenimento generando un clone che può dare origine a tutti gli elementi del sangue, può ricostituire il sistema emopoietico in un trapianto in riceventi letalmente irradiati, può attecchire e differenziare anche se il ricevente non è stato irradiato. Nel modello murino le HSC sono state purificate sin quasi all'omogeneità basandosi sulle caratteristiche della superficie cellulare: le HSC esprimono CD45, Thy1, c-Kit e Sca-1 mentre non esprimono gli antigeni di lineage [49]. Nel topo, le HSC non esprimono nemmeno livelli significativi dell'antigene CD34/13. Le HSC possono essere purificate, grazie alla separazione cellulare attivata da fluorescenza (FACS) [50], basandosi sulla loro abilità di eliminare il colorante

Hoechst per mezzo del trasportatore ABC/breast cancer receptor protein (BCRP-1) [51]. Potendo dunque essere separate in questa maniera (popolazione Hoechstlow) esse sono generalmente chiamate “Side population” (Sp). Nell’uomo la purificazione delle HSC può essere ottenuta utilizzando un simile criterio. Anche le HSC umane non esprimono antigeni di lineage, non esprimono CD 38, esprimono CD45, c-Kit e Thy1[52,53,54]. La maggior parte delle HSC umane sono presenti nella frazione CD34+ del midollo osseo (BM), del sangue periferico (PB) e cordonale (UCB).

1.3.2 - Cellule staminali mesenchimali (MSC)

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) sono una popolazione di cellule staminali adulte non ematopoietiche, self-renewal, con caratteristiche di multipotenzialità, presenti in maggior percentuale nello stroma del midollo osseo e differenziabili in vari tipi di cellule di origine mesodermica quali condrociti, osteoblasti, adipociti e mioblasti [55].

Le MSC sono state isolate per la prima volta dal midollo osseo di ratti e porcellini d’india da Freidenstein et al. . Lo scienziato riscontrò tra le cellule del midollo osseo una rara popolazione cellulare con morfologia fibroblastoide in grado di aderire a superfici plastiche crescendo sotto forma di colonie. Vennero così erroneamente identificate con il nome di fibroblasti stromali di derivazione mesenchimale [56-57]. Una decina di anni dopo queste cellule furono isolate anche dal midollo osseo umano permettendo agli scienziati di comprenderne meglio la loro azione e funzione.[58] Per tali ragioni ad oggi il termine accreditato è quello di cellule staminali mesenchimali (CSM) , coniato per la prima volta da Caplan. [59]

Nei mammiferi adulti il midollo osseo si figura come tessuto molle localizzato nei canali midollari delle ossa piatte (il bacino, lo sterno, il cranio, le coste, vertebre, scapole) e delle cavità delle ossa spugnose, le epifisi delle ossa lunghe (femore e omero). Esistono due tipi di midollo osseo: il midollo osseo rosso costituito principalmente da tessuto mieloide e il midollo osseo giallo costituito soprattutto da tessuto adiposo.

Nella porzione rossa del midollo osseo coesistono due classi di cellule staminali adulte: la prima rappresentata dalle cellule staminali emopoietiche (CSE), capaci di generare tutta la componente corpuscolata del sangue, mentre la seconda classe costituita dalle cosiddette cellule staminali mesenchimali (MSC). Quest'ultima specie di cellule multipotente, seppur presente in esigua quantità nel midollo (0,001%-0,01%) ha la capacità di proliferare dando origine a cellule progenitrici di osteociti (osso), condrociti (cartilagine), adipociti (grasso), e altri tessuti connettivi e fibrosi.[60]

Le CSE in via di sviluppo sono trattenute all'interno del midollo osseo fino al termine della loro maturazione e poi vengono liberate nel torrente circolatorio. Nel midollo osseo le CSE e la loro progenie sono circondate da cellule stromali comprendenti osteoblasti, fibroblasti, cellule reticolari avventiziali, cellule endoteliali e cellule staminali mesenchimali, che contribuiscono alla formazione della nicchia emopoietica. [61]

In modelli murini sono stati descritti due tipi di nicchia coinvolti nella regolazione dell'emopoiesi, la nicchia endosteale e quella vascolare. La nicchia endosteale è costituita da osteoblasti e da cellule mesenchimali che rivestono la superficie endosteale dell'osso trabecolare e fornisce un microambiente protettivo che garantisce il mantenimento e l'autorinnovamento delle CSE isolandole da stimoli differenziativi e pro-apoptotici che ridurrebbero la riserva di cellule staminali. In particolare il ruolo delle MSC sembra essere proprio quello di mantenere le CSE in uno stato quiescente.

La nicchia vascolare è composta dalle cellule endoteliali sinusoidali e dalle cellule stromali subendoteliali e controlla la differenziazione delle CSE e la liberazione delle cellule emopoietiche mature nel sistema vascolare. L'equilibrio tra mantenimento della quiescenza (fase G0 del ciclo cellulare) nella nicchia endosteale e differenziazione e reclutamento nella nicchia vascolare è il risultato finale di complesse interazioni molecolari tra le CSE e le cellule stromali delle nicchie.[62]

I primi studi in vitro che hanno permesso di comprendere come il microambiente midollare possa regolare l'emopoiesi sono stati pubblicati da Dexter e coll. negli anni '80. E' stato dimostrato come, in coltura, uno strato aderente di cellule stromali sia in grado di mantenere vitale per molte settimane la componente emopoietica e di supportare l'emopoiesi [63].

Ulteriore attività svolta dalle cellule MSC midollari è quella di esercitare una potente attività immunosoppressiva attraverso una complessa rete di interazioni con cellule dell'immunità sia innata (cellule dendritiche, natural killer e granulociti neutrofili), sia adattativa (linfociti T e B). [64-65]

Le cellule stromali mesenchimali autologhe (CSM) sono inoltre note per produrre citochine angiogeniche, tra cui il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) capace di accelerare i processi di rivascularizzazione del tessuto in cui sono localizzate. Riassumendo, le funzioni delle cellule stromali dette mesenchimali (provengono dal foglietto Mesodermico embrionale) sono:

- Formare il supporto funzionale e strutturale al midollo osseo;
- Rilasciare specifici fattori di crescita che inducono le cellule staminali emopoietiche a proliferare e differenziare nei loro prodotti ;
- Immunomodulante ;
- Generare cellule capaci di isto-differenziare in Osteoblasti, Condrioblasti e Adipociti;
- Rilasciare Fattori di Crescita (GF) tra cui quelli angiogenetici;

Inaspettatamente, negli ultimi anni numerosi studi in vitro hanno dimostrato che le MSC possono transdifferenziare in cellule appartenenti ad altre linee germinative, ad esempio neuroni cellule

endoteliali e cardiomiociti, ma ci si è chiesti se questa loro straordinaria proprietà fosse piuttosto dovuta ad un artefatto delle condizioni di coltura. [66,67,68,69,70]

La relativa facilità di isolamento e l'elevata potenzialità di espansione in vitro permessa dalla capacità delle MCS di aderire alle superfici plastiche associate al loro potenziale differenziativo ha permesso di considerare queste cellule come promettenti candidati da applicare nella terapia cellulare della medicina riparativa e rigenerativa di tessuti quali osso [70], cartilagini, tendini e magari in un futuro neppure troppo lontano anche di tessuti nervosi [71] cardiaci [72] ed endoteliali.

La caratterizzazione fenotipica delle CSM al momento è controversa, in quanto non esistono markers specifici (positivi o negativi) che le identificano, ma sono state definite dai diversi autori delle combinazioni di marcatori.

Alcuni ricercatori ritengono che, generalmente, le CSM umane usate nei diversi trials clinici siano cellule fibroblastoidi derivanti dal midollo osseo, con un fenotipo CD73+, CD90+, CD105+, CD166+, CD44+, CD117 e CD45, anche se nessuno di questi markers è specifico per il riconoscimento delle CSM; quindi ancora oggi è difficile determinare con certezza il ruolo di queste cellule staminali multipotenti in vivo, ruolo che non si può prevedere dalla coltura in vitro. Per questo motivo, il Comitato delle Cellule Staminali Mesenchimali e Tissutali della Società Internazionale delle Terapie Cellulari ha proposto degli standard per definire le cellule mesenchimali umane, sia per studi a scopo di ricerca, sia per studi clinici. In questo modo hanno dato alla comunità scientifica dei criteri basati su dati disponibili, che definiscono l'identità delle cellule staminali mesenchimali. Sono stati proposti tre criteri minimi:

1. le cellule devono aderire alla plastica quando vengono coltivate in fiasche in condizioni standard: infatti l'aderenza alla plastica è una delle prime caratteristiche scoperte e ben descritte delle mesenchimali;
2. devono esprimere e non esprimere determinati markers: l'espressione di antigeni di superficie permette la rapida identificazione di una popolazione cellulare. Le cellule staminali

mesenchimali devono esprimere CD105 (endoglina SH2), CD73 (5' nucleotidasi) e CD90 (Thy-1), mentre devono essere assenti markers emopoietici come CD45 (leucociti), CD34 (cellule endoteliali e precursori emopoietici), CD14 e CD11b (monociti e macrofagi), CD79 α e CD19 (cellule B, che possono aderire in coltura e rimanere vitali) e HLA-DR;

3. devono essere capaci di differenziarsi in tre linee cellulari: osteoblasti, adipociti e condroblasti; la differenziazione in osteoblasti viene dimostrata con la colorazione di Von Kossa o con il Rosso Alizarin; quella in adipociti con Oil Red O.; quella in condroblasti con il Blue Alcian o con la colorazione immunostochimica per il collagene di tipo II.

1.4 – Scaffold

Una delle aree di ricerca più interessanti e in via di sviluppo in chirurgia maxillo-facciale comporta applicazioni dei materiali alla chirurgia ricostruttiva.

Una delle sfide più comunemente incontrate dai chirurghi ricostruttivi è il trattamento di grandi difetti ossei derivanti da lesioni traumatiche, resezione del tumore, malattie degenerative e malformazioni congenite.

Lo sviluppo di nuovi materiali capaci strutturalmente, meccanicamente e biologicamente di interfacciarsi con i tessuti naturali è di estrema rilevanza per il successo delle strategie rigenerative.

Ciò che si cerca è un materiale sintetico in grado di accelerare il processo di guarigione ossea, l'integrazione con il tessuto circostante, e successivamente consentire o incoraggiare rimodellamento tissutale tale che il materiale sia sostituito da osso nativo.

L'osso è un tessuto altamente organizzato che combina una scala di livelli, dal nano alla macro struttura, producendo una rete strutturale complessa e modulare sé stesso in base agli stimoli esterni.

Un' architettura tridimensionale è critica per formazione di nuovo osso sia in embriogenesi che per scopi rigenerativi. L'uso di uno scaffold tridimensionale fornisce un supporto controllato e

necessario alle cellule per mantenere la loro funzione differenziativa e definire la forma finale del nuovo osso .

Il concetto di ingegneria dei tessuti utilizzando impalcature tridimensionali presenta alcuni vantaggi rispetto a iniezione diretta di cellule ai tessuti: impalcature tridimensionali possono sostituire la zona mancante o danneggiata e fornire sostegno temporaneo per sé o a cellule impiantate.

L'obiettivo è quello di sviluppare uno scaffold per l'ingegneria dei tessuti con caratteristiche specifiche e ideali quali la porosità, con pori dilatati interconnessi (per facilitare il trasporto di massa), l'idrofila (per migliorare l'adesione delle cellule), strutturalmente stabile (per resistere alle forze di taglio durante la coltivazione bioreattore), degradabili (per fornire biocompatibilità finale dell'innesto di tessuto), ed elastico (per consentire la trasmissione di forze contrattili). La struttura dello scaffold determina il trasporto di nutrienti, metaboliti e molecole regolatrici da e verso le cellule, mentre le caratteristiche biochimiche hanno un ruolo importante legate alla differenziazione cellulare. Le proprietà meccaniche dello scaffold dovrebbero idealmente corrispondere a quelle del tessuto nativo, per fornire integrità meccanica del tessuto in formazione e per supportare un meccanotrasduzione in vivo come tra le cellule e il loro ambiente.

In generale un supporto deve possedere le seguenti proprietà per poter essere utilizzabile in applicazioni di ingegneria tessutale:

- 1) biocompatibilità, cioè la capacità di un materiale di non determinare, da parte di un sistema vivente, sfavorevoli reazioni alla sua presenza in una specifica applicazione; è un requisito fondamentale citato anche dalle norme europee;
- 2) biodegradabilità, cioè il materiale deve venire demolito o trasformato in seguito all'azione dell'ambiente in cui è inserito;
- 3) opportuna macrostruttura: si ricorda infatti che lo scaffold dovrebbe promuovere l'adesione cellulare, la conseguente neomorfogenesi e permettere la completa integrazione con l'ambiente circostante. Questo è strettamente legato alla struttura del supporto;

- 4) opportuna porosità, per consentire la migrazione cellulare e l'invasione tessutale, così come la diffusione delle sostanze nutritive e quelle di scarto;
- 5) adeguata dimensione dei pori, che dipende dalla tipologia di tessuto da rigenerare; si parla di 20-125 μm per i tessuti molli, 150-400 μm per tessuti duri, di 45-150 μm per la rigenerazione del tessuto epatico;
- 6) opportuna area e composizione chimica di superficie, in quanto è qui che avvengono le interazioni cellula-matrice che portano all'adesione;
- 7) compatibilità meccanica: gli scaffold devono infatti poter sopportare le stimolazioni meccaniche tipiche del sito di innesto, in modo da adempiere alla loro funzione di 'guida' per la ricrescita di tessuto.

1.4.1 – Idrossiapatite

Il ruolo scientifico rivestito dall'idrossiapatite, che fa parte del gruppo dei solidi "Apatiti" ed è caratterizzata dalla formula chimica $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)^6\text{Z}_2$ è particolarmente importante, sia per rilevanti applicazioni tecnologiche, sia perché utilizzato per svariati tipi di analisi come la separazione cromatografica delle proteine.

L'idrossiapatite è il componente minerale inorganico principale del tessuto osseo e dentale ed è presente nell'organismo con una percentuale che varia tra il 65% e l'80%.

Questo tipo di composto si può trovare in natura sotto forma di minerale; di colore giallo pallido e caratterizzato da cristalli a forma di prisma esagonale, può essere sintetizzato durante il processo di produzione e può essere prodotto e riassorbito dai tessuti inorganici.

L'idrossiapatite si suddivide in due diverse strutture: quella esagonale, quando pura e libera da vacanza, e quella monoclinica pseudoesagonale.

Il difetto di vacanza riguarda la difettologia dei cristalli; esso è dovuto all'assenza nel reticolo cristallino di uno o più atomi, determinata durante la solidificazione della struttura a causa di disturbi locali o creata da deformazioni plastiche o da raffreddamento rapido. La struttura di entrambe le celle è costituita da tetraedri di PO_4^{3-} (gruppo fosfato), in cui gli atomi a disposizione si dispongono in maniera differente. Infatti, due atomi si collocano sulla parte orizzontale, mentre gli altri due si collocano sugli assi paralleli all'asse c della cella.

I tetraedri di PO_4^{3-} si suddividono in due piani differenti: ad $\frac{1}{4}$ ed a $\frac{3}{4}$ dell'altezza del cristallo. Questa particolare predisposizione del cristallo permette che si creino due tipi differenti di canali perpendicolari al piano basale:

o il primo canale è occupato dagli ioni Ca(I) , situati a 0 o $\frac{1}{2}$ dell'altezza del cristallo;

o il secondo canale presenta pareti costituite da atomi di ossigeno e altri ioni calcio Ca(II) . Questi si trovano a $\frac{1}{4}$ e a $\frac{3}{4}$ dell'altezza del cristallo e sono disposti in due triangoli equilateri ruotati di 60° nel piano perpendicolare all'asse c.

Le differenze tra struttura esagonale e struttura monolitica si possono individuare all'interno di questi canali, nei quali la principale diversità nota sulla collocazione degli ioni OH^- .

Gli ioni OH^- nella struttura esagonale hanno una disposizione disordinata e il sito riservato a loro è statisticamente occupato al 50% attorno al piano speculare.

Per quanto riguarda la struttura monolitica, gli ioni ossidrili hanno invece una disposizione ordinata.

Applicando delle sostituzioni alla struttura della molecola si nota spesso che i sostituenti si posizionano nei canali, sopra o molto vicini agli assi simmetrici, causando in questo modo delle deformazioni nella struttura cristallina e influenzando il comportamento dell'idrossiapatite durante la sua cristallizzazione.

L'idrossiapatite biomimetica porosa ha composizione chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)^6(\text{OH})^2$ ed è il materiale più utilizzato nel settore dei biomateriali. Essa riveste una notevole importanza, in quanto è utilizzata come osso artificiale; infatti, presenta caratteristiche chimico-strutturali molto simili a quelle della

componente ossea. Questo biomateriale di origine naturale, ma comunemente sintetizzabile per via chimica, ha elevate proprietà meccaniche.

La biocompatibilità è eccellente, in quanto è in grado di formare legami con tessuti duri.

Nella tabella soprastante sono rappresentate le proprietà meccaniche dell'idrossiapatite. Il Modulo di elasticità longitudinale o comunemente detto Modulo di Young rappresenta uno dei tre differenti moduli di elasticità. Questo modulo è una grandezza che caratterizza un materiale esprimendo il rapporto tensione e deformazione in caso di un comportamento di materiale di tipo "elastico". La legge di Hooke definisce il Modulo di Young attraverso la formula $E = \sigma / \varepsilon$ ove:

- σ = sforzo. Dimensionalmente è $\sigma = F/A$ cioè forza su superficie;

- ε = deformazione. Dimensionalmente è $\varepsilon = \Delta l / l$ cioè variazione di lunghezza su lunghezza iniziale.

La compressione meccanica ($\sigma_n < 0$) è uno sforzo elementare di tipo sigma che viene sottoposto a un corpo. Anche la flessione è uno sforzo elementare. Si può affermare che un corpo è soggetto a sforzo di flessione quando è sottoposto a vincoli a cui reagisce opponendosi a un sistema di forze.

L'idrossiapatite è un importante componente minerale dei tessuti calcificati (ossa e denti). L'HA sintetica è stata ampiamente utilizzata come materiale implantare come sostituto osseo per le sue eccellenti proprietà osteoinduttive [74]. Lo sviluppo di proprietà superficiali avanzate (quali aumento di superficie, la carica e la capacità di alterare l'assorbimento di specie chimiche) potrebbero essere utilizzati per promuovere la risposta e la proliferazione cellulare, per indurre neo-osteogenesi ed osteoinduzione risultando inoltre facilmente combinabile con altri materiali.

Gli esempi più comuni sono idrossiapatite associata a polimeri sintetici (PLLA, PGLA, ecc) o addirittura nanohydroxyapatite combinato con polimeri naturali (chitosano, collagene).

Poli (acido lattico) (PLA), poli (acido glicolico), poli (ϵ - caprolattone), e loro copolimeri hanno attirato grande attenzione per la loro biodegradabilità nel corpo umano. Tuttavia, la resistenza meccanica, tenacità e modulo elastico di questi polimeri sono stati inferiori a quelli di ossa corticali naturali.

2. OBIETTIVI

Una delle sfide più importanti in ingegneria tissutale è quello di ottenere un ambiente per l'attecchimento, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

A questo scopo sono impiegati materiali con una struttura porosa tridimensionale che possa offrire lo spazio ideale per la nuova formazione ossea, il supporto necessario per le cellule a proliferare e mantenere le loro funzioni differenziale, riesca a imitare molti ruoli della matrice extracellulare e possibilmente la sua architettura definisca la forma finale del nuovo tessuto osseo.

La finalità ideale di una progettazione bio-ingegneristica risulta essere pertanto quella di creare un substrato tale per cui le cellule possano lavorare in network. Per tale scopo abbiamo valutato un nuovo approccio CAD-CAM per la progettazione personalizzata di uno scaffold di idrossiapatite pura e porosa (HA) per sostituire il condilo dell'ATM. Per meglio valutare l'impatto delle MSC è stato scelto un modello bilaterale split-mouth [Fig.1]

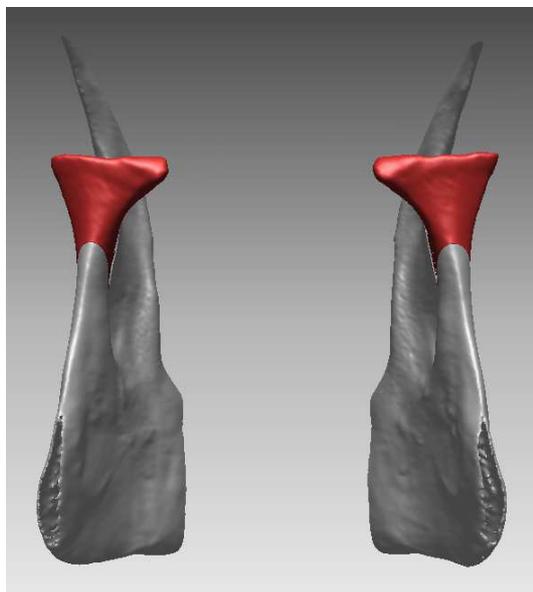


Fig.1

In primo luogo, abbiamo analizzato l'interazione tra l'impalcatura e i tessuti circostanti (ossa e tessuti molli) per capire meglio le proprietà biologiche dello scaffold (osteointegrazione e degradazione del materiale).

In secondo luogo, abbiamo esaminato il comportamento dello scaffold qualitativamente e quantitativamente sia all'interno che sulla superficie articolare. La nostra valutazione principale si è incentrata sulla formazione di nuovo osso all'interno del scaffold attraverso la misurazione della porosità, riduzione dell'area totale dei pori e la quantità di nuovo osso rigenerato, con o senza l'utilizzo di MSC.

Abbiamo valutato inoltre il comportamento delle cellule all'interfaccia con la cartilagine articolare e la capacità di riassorbimento dello scaffold.

3. MATERIALI E METODI

3.1 - Allestimento di colture primarie

Lo studio è stato approvato dal ministro italiano del Lavoro, Salute e Politiche Sociali Comitato Etico 11 marzo 2009 (decreto n. 51/2009-B).

Gli animali sono stati alloggiati in gabbie individuali, con reticolati a temperatura e umidità controllata: 22 ± 1 ° C e 50 ± 5 di umidità relativa, con ventilazione pari a 10 ricambi d'aria in un'ora. Gli animali sono stati alimentati con una dieta standard di manutenzione (Mucedola, Settimo Milanese, Milano, Italia), trifoglio e acqua ad libitum. Due mesi dopo l'intervento, gli animali sono stati alloggiati esternamente fino al sacrificio. Sono state utilizzate 6 pecore incrocio (Bergamasca-Massese), di 4 ± 1 anni e 60 ± 10 kg di peso corporeo.

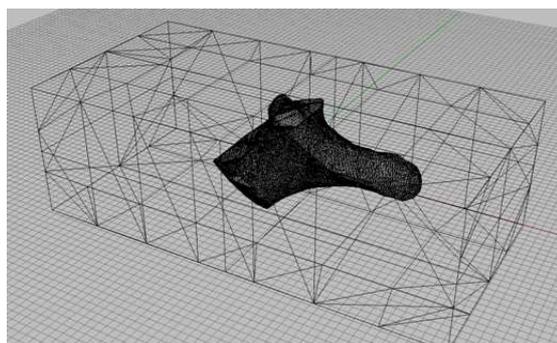
In regime di anestesia generale, un campione 10 mL di midollo osseo è stato aspirato in una siringa di plastica da 20 ml (contenenti 1 ml di soluzione salina con 1000 unità di eparina) dalla cresta iliaca posteriore, circa 3 settimane prima dell'impianto dello scaffold. Il midollo è stato raccolto inserendo l'ago nell'ala iliaca da più di un singolo sito. Entro 60 minuti le cellule nucleate erano isolate con un gradiente di densità e risospese in alfa-modified essential media (Sigma Chemical Co.) contenente 20% di siero fetale di vitello (Euroclone), 100 unità / ml di penicillina (Euroclone), 100mg / ml di streptomina, e 2 mm di glutamina (Euroclone). Tutte le cellule nucleate sono

state piastrate in una fiasca di coltura da 10 cm² e incubate ad atmosfera umidificata a 37°C col 5% di CO₂. Le cellule non aderenti sono state scartate dopo 1 settimana e le cellule aderenti sono state coltivate per un'ulteriore espansione. Quando le piastre coltivate sono diventate confluenti, le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione e riseminate su nuove piastre a una densità pari a 1/3 per continuare il passaggio. I media di coltura sono stati cambiati ogni 3-4 giorni. La vitalità cellulare è stata valutata per ciascun esperimento fatto mediante l'esclusione di trypan blu ed è sempre risultata > 98%. Il giorno della procedura chirurgica 4x10⁷ cellule sono state raccolte e poste sullo scaffold. Le cellule utilizzate erano al secondo passaggio in tutti gli animali trattati.

E' stato anche aggiunto, a nutrimento delle cellule, anche del plasma ricco di piastrine (PRP). Le piastrine sono state ottenute dal sangue venoso delle pecore. Il sangue è stato prelevato dalla vena giugulare in una sacca contenente CPD (acido citrico monoidrato 327mg, 2.63 g sodio citrato diidrato, 2,55 g di glucosio monoidrato, e 251mg di sodio fosfato monobasico diidrato per 100mL di CPD) come anticoagulante (sangue 1 ml CPD / 7 ml). Il sangue è stato poi centrifugato due volte: la prima volta a 1200 rpm per 40minuti a 20°C per rimuovere i globuli rossi e il secondo a 4000rpm per 10 minuti a 20°C per ottenere plasma ricco di piastrine (PRP), risultante in un numero di piastrine di 1 × 10⁶ / mL. In seguito 330 microlitri di gluconato di calcio (100mg / mL) sono stati aggiunti a 10 ml di plasma e così si è avuto il rilascio della trombina autologa. La miscelazione di 4mL di trombina con 16ml di PRP ha quindi causato il rilasciare del contenuto granulare delle piastrine, ed è stato così ottenuto il gel piastrinico. La concentrazione delle piastrine finali è stato valutato essere circa da 8 a 10 volte il conteggio iniziale del campione. Il giorno dell'intervento chirurgico, le cellule sono state staccate dal piatto di coltura e unite con il vettore per un composto di 1: 1 gel piastrinico e collagene tail-derivato da ratto sterile (Roche GmbH, Mannheim, Germany), per ottenere una concentrazione di 4 × 10⁶ cellule per 1 ml da utilizzare sullo scaffold. Il PRP, contenente le cellule, aveva una consistenza tipo gel e veniva posto intorno all'impianto al termine della procedura chirurgica prima della chiusura dei tessuti molli.

3.2 – Costruzione dello scaffold

Lo scaffold di idrossiapatite (HA) è stato costruito partendo da una polvere commerciale (Finceramica, Faenza, Italia) . La dimensione dei pori e la distribuzione sono stati ottimizzati mediante l'istituzione di un processo schiumogeno basato su sospensione acquosa di polvede di HA (30% del volume di carico solido) .



Un processo di fresatura (Fig.2) della durata di circa 20 ore è stato usato per ottenere le caratteristiche desiderate di struttura del materiale. La sospensione è stata versata in stampi di forma a parallelepipedo e successivamente essiccati in stufa con circolazione d'aria per 48 ore a 40 °C. I campioni sono stati poi sinterizzati a 1250 °C per 3 h.



Fig.2 -Processo di fresatura

I campioni sinterizzati hanno quindi subito una fase di caratterizzazione mediante diffrazione a raggi X (radiazione Cu K α ; RigakuMiniflex, Tokyo, Giappone), microscopia a scansione elettronica (SEM Stereoscan 360; Leica, Cambridge, UK), e Hg porosimetria (Porosimetro 2000 e Macropori

Unità 120; Carlo Erba, Milano, Italia) per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e morfologiche peculiari.



Fig.3 Blocco finale

Il materiale di partenza è stata un'idrossiapatite stechiometricamente pura, con una porosità globosa multidimensionale pari al 65% -70% del volume. Pori di dimensioni maggiori pari a 150-1000-micron sono collegati tra loro da pori di 70-120 micron; anche micro_pori (non inferiori a 10 micron) erano presenti. E' stata valutata la resistenza e le caratteristiche meccaniche del materiale prima dell'impianto. Lo scaffold è stato preliminarmente testato in compressione (Instron modello 1195, High Wycombe, Bucks, Regno Unito) per confrontare le prestazioni meccaniche con materiali di HA sviluppati e testati in vivo che presentano una porosità simile. Il materiale con controllo tridimensionale della porosità utilizzato in questo studio (HA-F70) mostrava quasi due volte la resistenza alla compressione di altri campioni già testati in vivo (HA-S45), ed erano caratterizzati inoltre da una porosità totale nettamente inferiore.

Partendo da una serie di tagli ottenuti mediante Tomografia Computerizzata (CT) e impostando un adeguato valore di soglia con Amira 3.1.1 (Mercury Computer Sistemi, Chelmsford, MA, USA) , è stato ricostruito il modello digitale 3D della mandibola delle pecore. Entrambi i condili sono stati poi virtualmente resecati dal modello per creare artificialmente un difetto osso nel ramo mandibolare che seguisse la linea di taglio pianificata con il chirurgo. Il ramo mandibolare sano e quello resecato erano stampati quindi in 3D in acrilonitrile-butadiene-stireneplastico (ABS), un

materiale plastico, utilizzando un Support Technology Stratasys Dimension (SST) stampante 3D (Stratasys Inc., Eden Prairie, MN, STATI UNITI D'AMERICA).

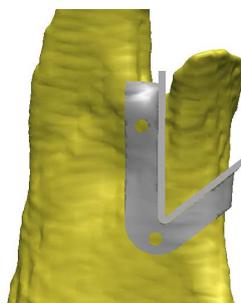
Sono state progettate le guide chirurgiche e le piastre di fissaggio su misura con Rhino 4.0 (Robert McNeel & Associates, Seattle, WA, Guide USA) .Le guide chirurgiche sono state progettate per consentire al chirurgo di riprodurre l'asportazione chirurgica prevista. Sono stati inoltre progettati elementi di riferimento all'innesto, costruito su misura, per facilitare il corretto posizionamento e due fori di diametro 2 millimetri sono stati preformate per permettere l'ancoraggio all'osso nativo con viti in titanio (Gebrüder Martin GmbH & Co. Ltd., Tuttlingen, Germany) .Le piastre di fissaggio sono state progettate per fissare saldamente gli scaffold HA alla ossa e garantire la stabilità primaria durante la masticazione. A garantire la corretta posizione dello scaffold rispetto al condilo resecato, due fori di riferimento sulla piastra erano esattamente collocati secondo i fori di fissaggio della relativa guida chirurgica. Una serie di fori del diametro di 2 millimetri sono stati eseguiti sul letto ricevente così da favorire il sanguinamento importante per alimentare il materiale innestato.

Le guide chirurgiche e le piastre di fissaggio sono state realizzate mediante l'utilizzo della macchina EOSINT M270 (EOS GmbH Electro Optical Systems, Munchen, Germania). Le guide chirurgiche sono state fabbricate in EOS cobalto-cromo MP1 e il fissaggio piastre in EOS Titanio Ti64, una lega con proprietà meccaniche eccellenti e resistenza alla corrosione combinato con un basso peso specifico e la biocompatibilità. Una macchina automatizzata per fresaggio sottrattivo 3-axis (Cortini HS 644 P, Fidia SpA, Padova, Italia) è stata utilizzata per preparare lo scaffold volumetricamente progettato esternamente per sostituire il condilo asportato. Il processo di lavorazione 3D automatizzato è stato avviato da un blocco di forma parallelepipedica di HA porosa di formato richiesto ($60 \times 30 \times 20$ mm). Uno strumento di lavorazione con fresa sferica di diametro 3 millimetri con una profondità di taglio di 0,5 millimetri per la fase di sgrossatura e 0,2 millimetri per la fase di finitura. Prima di collegare l'HA scaffold alla piastra di fissaggio con viti di fissaggio in titanio, i fori sono stati perforati con una fresa diamantata a 24.000 rpm con irrigazione e un

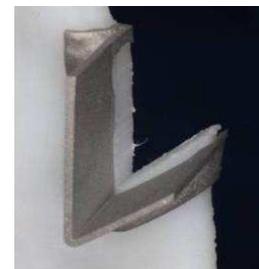
movimento assiale per evitare microfratture. Infine, i campioni composti da piastra di titanio-bone di fissaggio e lo scaffold di HA sono stati sterilizzati ai raggi gamma (25 kGy) per 72 ore.



Acquisizione mediante CT



Progettazione virtuale del taglio



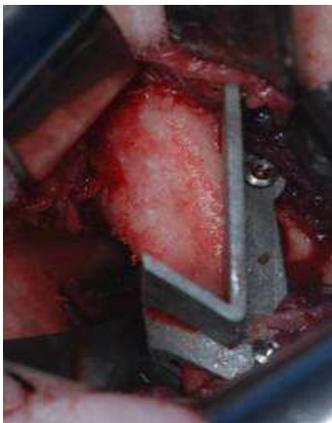
Guida di taglio chirurgica

3.3 – Procedura chirurgica

L'intervento chirurgico è stato eseguito in anestesia generale. Ketamina (5 mg / kg IM) e midazolam (0,4 mg / kg IM) sono stati somministrati per la sedazione. Dopo 20 minuti tramite la vena cefalica cateterizzata è stato somministrato fentanil (4 mg / kg IV) per fornire analgesia, e un cerotto di fentanil (100 mg / h) è stato applicato prima della procedura chirurgica per fornire analgesia durante il periodo post-chirurgico. L'induzione è stata raggiunta con il propofol (3mg / kg IV) e ketamina (1 mg / kg IV). Dopo intubazione, l'anestesia è stata mantenuta con isoflurano (1,5% in una miscela di ossigeno FO₂ = 0,6 e un'infusione a tasso continua (CRI) di ketamina (1-2 mg / kg / h) e fentanyl (15 mcg / kg / h). Dopo il recupero, flunixin meglumina (1mg / kg IM) (Meflosyl Intervet Schering-Plough) è stata somministrata all'animale ogni 12 ore. Come misura di profilassi operatoria è stata usata procaina benzil penicillina (8000 UI / kg) e streptomicina (10 mg / kg IM UI SID) (Combiotic; Fatro, Ozzano, Bologna, Italia), iniettati il giorno della intervento e il giorno seguente. Durante la procedura chirurgica è stata effettuata un'incisione longitudinale di 5mm direttamente sul margine caudale della mandibola utilizzando l'ATM come punto di riferimento. Il bordo posteriore della mandibola è stato identificato e il muscolo temporale è stato staccato dall'osso.

Il muscolo buccinatore e i rami dello zigomatico del nervo facciale sono stati trazionati per lasciare sufficiente accesso al intero ramo della mandibola superiore. Poi la prima guida chirurgica è stata applicata mediante due viti di fissaggio in titanio. Il collo del condilo è stato diviso con una sega oscillante seguendo la linea di guida chirurgica sotto l'inserimento del pterigoideo esterno muscolare. L'ATM è stata aperta tagliando la capsula e lasciando il menisco in sede. Dopo la resezione, il frammento prossimale è stato slogato e asportato. La guida chirurgica veniva quindi rimossa l'osso del patibolo preparato per ospitare l'innesto.

Lo scaffold di HA era preparato in precedenza e fissato alla placca. Gli stessi fori praticati per fissare la guida chirurgica sono stati utilizzati per posizionare e fissare la piastra insieme allo scaffold. Il fissaggio è stato raggiunto mediante viti bicorticali (da 9 e 11 millimetri) e durante l'inserimento il muscolo pterigoideo laterale è stato preservato. L'utilizzo delle MSC è stato randomizzato e ogni animale riceveva su un lato lo scaffold caricato con cellule e sull'altro lo scaffold senza cellule.



Fissaggio dima di taglio



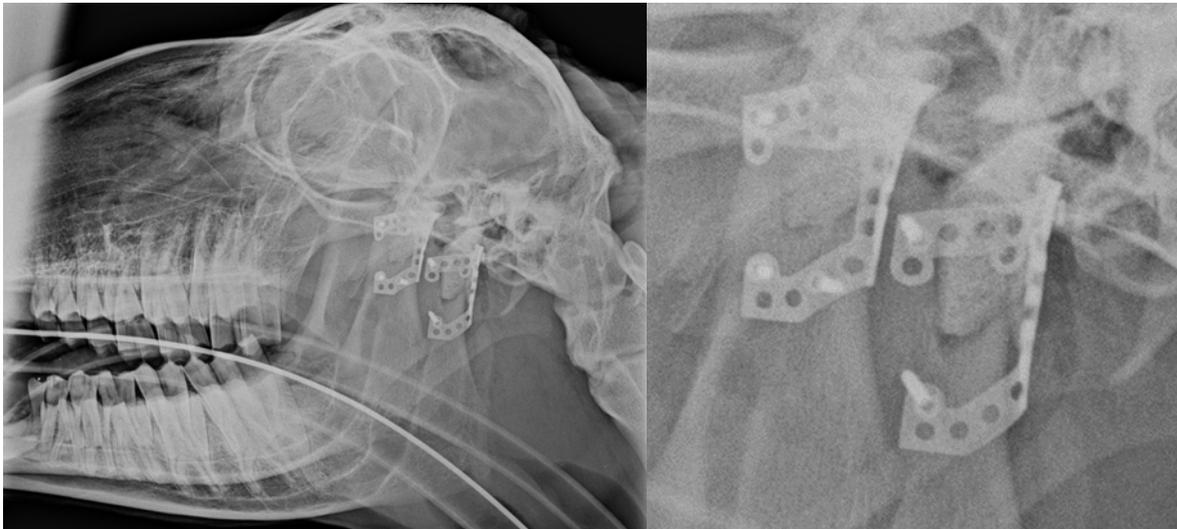
Taglio secondo la dima



Fissaggio dello scaffold

L'animale è stato curato presso la Facoltà di Veterinaria Medicina dell' Università degli Studi di Bologna. Acqua e cibo non sono stati razionati. L'animale è stato sacrificato dopo 4 mesi con ketamina (5mg / kg IM), midazolam (0,4 mg / kg IM), e una iniezione di embutramide (70mg / kg) più mebezony (15mg / kg) (Tanax). Dopo il sacrificio sono state eseguite le indagini TC del cranio

prima della raccolta del campione per confrontare i risultati anatomici e per individuare le variazioni di posizione dopo il funzionamento rispetto alla posizione dei condili pianificata in sede di progettazione pre-chirurgica. I campioni sono stati poi espianati per l'esame istologico e istomorfometrico. Sono stati asportati i condili mandibolari di HA e l'osso circostante del ramo compreso il tessuto connettivo adiacente (nel zona articolare) in un unico blocco; il campione raccolto è stato immerso in formalina tamponata al 10% e consegnato al laboratorio per l'analisi istologica.



3.4 – Analisi Istologica

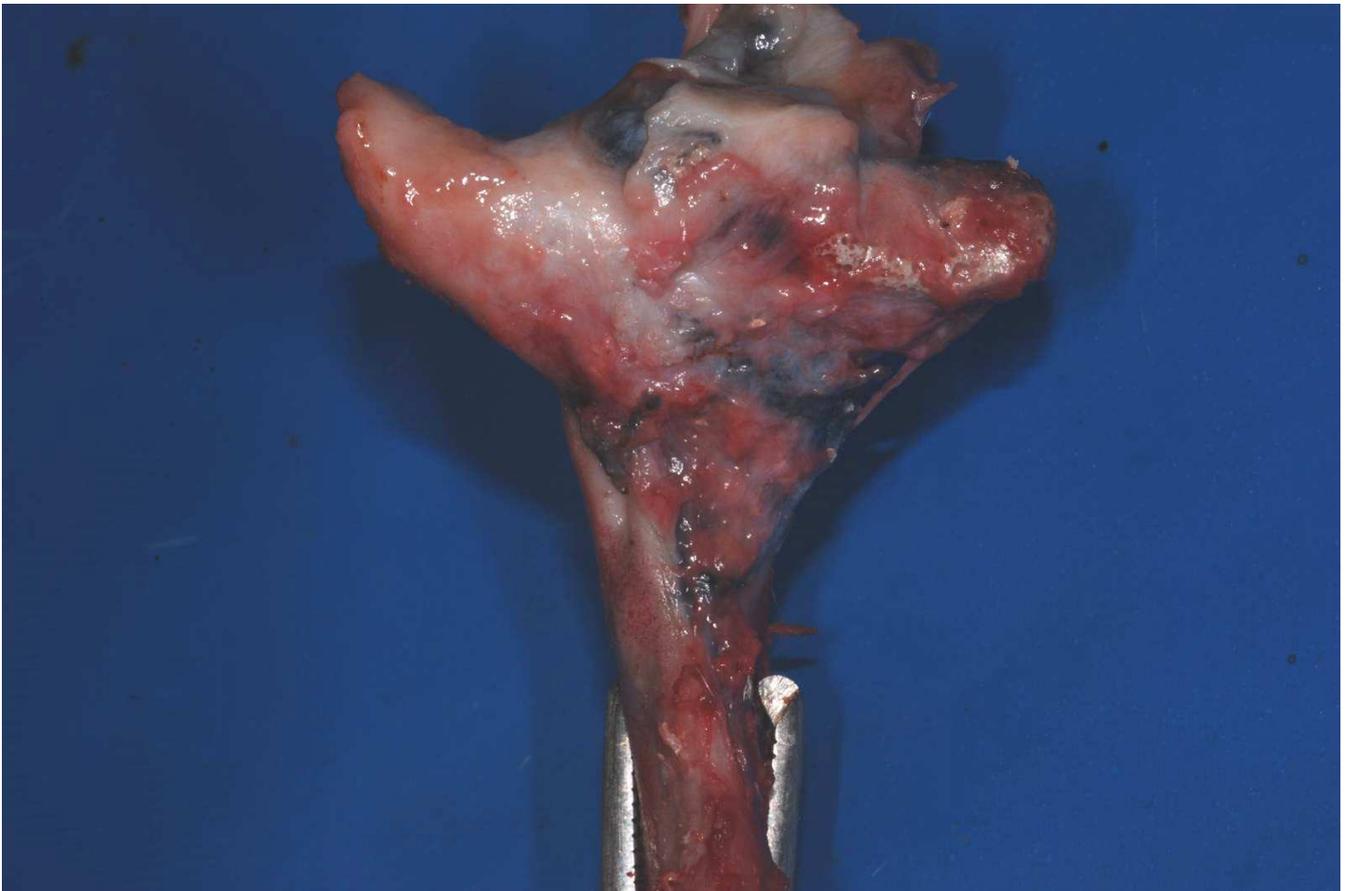
I campioni e i tessuti circostanti sono stati elaborati per ottenere delle sezioni macroscopiche. Per visualizzare meglio la superficie sezionata del condilo, sono state preparate due sezioni maggiori del campione: una parallela all'asse longitudinale del ramo con una direzione dalla parte posteriore

(caudale) alla parte anteriore dello scaffold e l'altra parallela al piano frontale dalla parete laterale alla parte mediana dello scaffold rispetto alla superficie articolare. Mediante sega circolare continua irrigata sono stati separati i campioni, che sono stati trattati con un sistema automatizzato (Precise 1 Automated System, Assing, Roma, Italia), disidratati successivamente con una serie di immersioni graduate in etanolo, e in seguito in resina glycolmethacrylata (Technovit 7200 VLC, Kulzer, Wehrheim, Germania). Dopo la polimerizzazione, i campioni sono stati sezionati parallelamente alla sezione principale con un disco diamantato di alta precisione a circa 150 micron e rifiniti a uno spessore pari a circa 30 micron con uno speciale dispositivo di rettifica. Sono stati così ottenuti tre vetrini secondo l'asse parallelo al ramo (parte centrale dello scaffold), e due vetrini sono stati ottenuti lungo l'asse frontale parallelo al piano (superficie condilo). I vetrini sono stati colorati con acido di fucsina e blu di toluidina ed esaminati al microscopio (Leitz, Wetzlar, Germania).

L'analisi istomorfometrica è stata eseguita in ceco rispetto alle condizioni sperimentali specifiche, utilizzando un Leitz Orthoplan Microscopio Luce (LM, Leica Microsystem Inc., Bannockburn, IL, USA) integrato a una analizzatore di immagine computerizzata Sistema (Qwin, Leica Microsystem Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK). Tre sezioni di ogni campione sono state scelte a caso e osservati sotto LM per l'analisi istomorfometrica. Cinque fotografie sono state scattate per ogni sezione. E' stata selezionata una regione di 1218×898 micron ($1,09 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) come regione di interesse (ROI). Per ogni fotografia con un ingrandimento finale di 6.3x tramite indagine con il software Leica Qwin si sono ottenute informazioni sulla percentuale di porosità (Percentuale di area di vuoti su un'area totale di ogni campione) e i crescita ossea (BI, la quantità di nuova crescita ossea all'interno dei pori HA) (New Bone / ROI).E' stata disegnata la superficie totale dei pori dell'HA all'interno campione quindi sono è stato individuato l'osso che andava a riempire i fori stessi usando il Software LeicaQwin. Da queste misurazioni è stata calcolata la percentuale di porosità dell'HA nelle zone esaminate (area di pori / zona esame), la percentuale di area piena di nuovo osso nei pori (ROI totale, di vuoti residui aree / Area pori), e la conseguente riduzione della porosità disponibili

(porosità area, area di vuoti residui). I campioni sono stati analizzati come singole unità (valore assoluto) per l'effetto della presenza o assenza di cellule staminali mesenchimali rispetto alla crescita ossea e alla sua maturazione. Si è poi fatta una seconda considerazione prendendo in esame lo stesso animale per valutare come la presenza di cellule staminali o la loro assenza influenzasse la formazione di nuovo osso nelle medesime condizioni.

Analisi statistica. È stata effettuata la valutazione statistica dei dati utilizzando il software GraphPad InStat, versione 3.05 per Di Windows. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando Student *t*-test, e *t* valori sono stati calcolati con 10 gradi di libertà; la soglia di significatività era $P = 0.05$ e l'intervallo di confidenza è stato stabilito per una differenza del 95%.

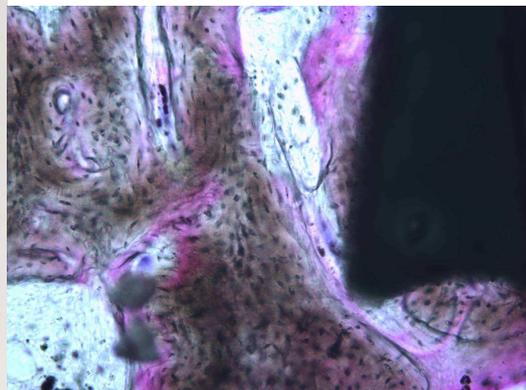
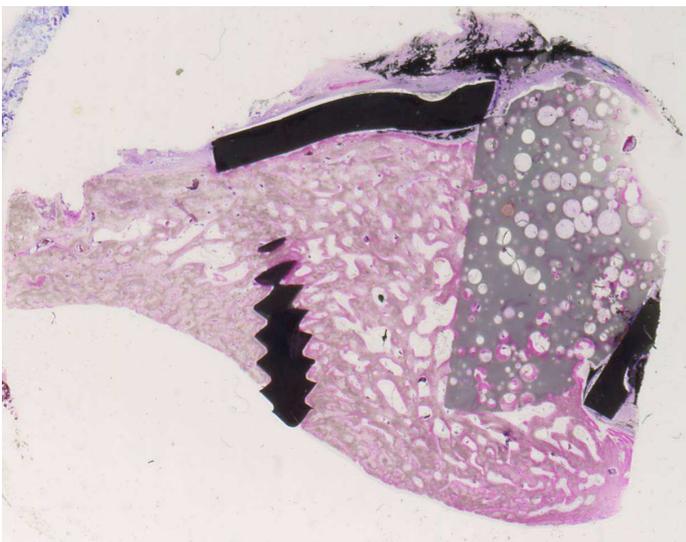
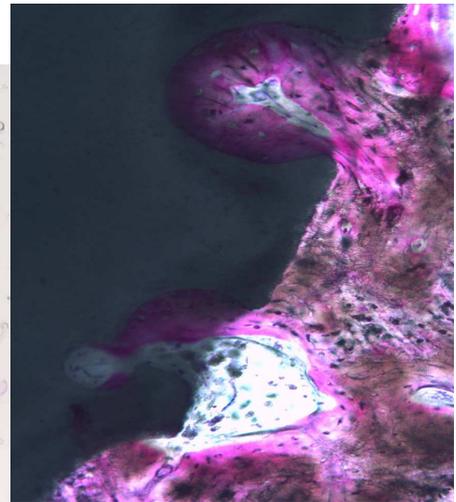
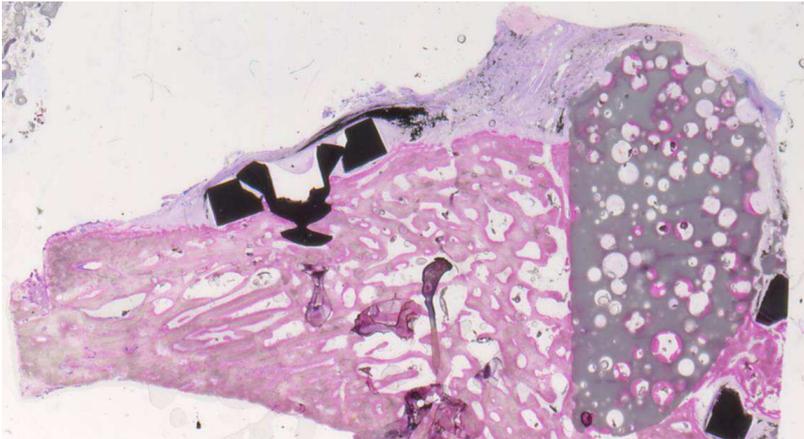


4. RISULTATI

4.1 – Comportamento del materiale

Il materiale è risultato ben integrato nell'animale con assenza di reazioni avverse.

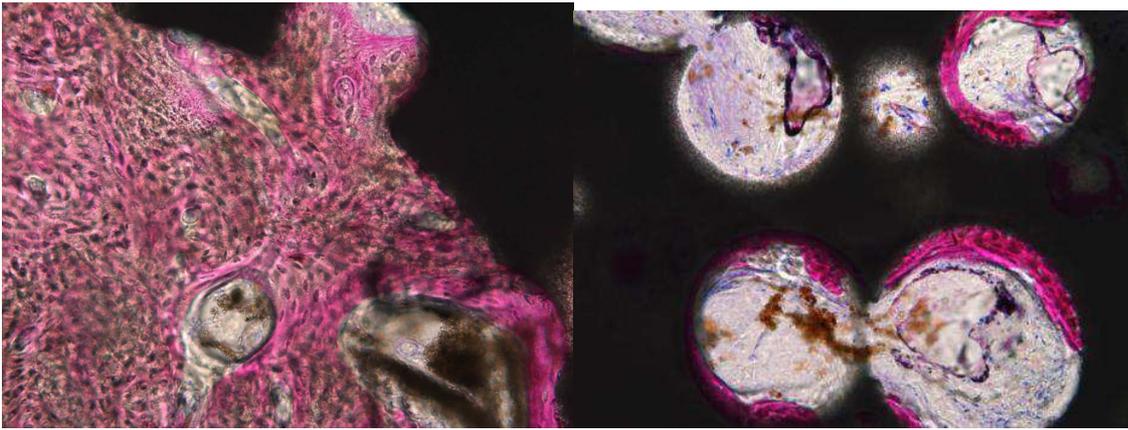
La precisione del taglio effettuato con l'aiuto delle guide chirurgiche progettate è stato quantitativamente valutato confrontando virtualmente il taglio previsto con il taglio effettuato dal chirurgo per rimuovere il condilo. La precisione nel confronto fra i due tagli è stata valutata utilizzando la funzione di analisi di deviazione shell-shell in Rapidform XOS2 (INUS Technology, Inc, Seoul, Corea). Il modello 3-D della mandibola con il taglio previsto creato nella progettazione pre-operatoria sovrapponendo i dati CT e 3-D del modello della mandibola con il taglio progettato con i dati CT acquisiti nel post-operatorio per fornire una mappa a colori che evidenzia le deviazioni a distanza dei due modelli nell'area di taglio. La differenza media è stata di 0,25 millimetri; la differenza massima era 2,50 millimetri. Le discrepanze maggiori (visualizzate in rosso) sono risultate essere concentrate nella parte mediale della zona taglio verticalmente. In due campioni è stata evidente al microscopio una frattura dello scaffold. Tuttavia, in tutti i campioni la parte inferiore dello scaffold risultava collegato stabilmente con la mandibola. Questa osservazione macroscopica è stata confermata durante la preparazione della sezione istologiche dove, negli stessi due casi, la parte superiore dello scaffold (superficie condilo) risultava collegato alla parte adiacente bassa solo attraverso un sottile strato di tessuto fibroso. L'analisi istologica ha evidenziato diversi tipi di tessuto che circondava lo scaffold impiantato. Nella sezione centrale lo scaffold presentava sempre un buon legame con l'osso adiacente caratterizzato dalla presenza di un contatto diretto, senza interposizione di tessuto fibroso. La mandibola ha mostrato segni di riarrangiamento e la formazione di nuovo tessuto osseo che ha migliorato il contatto osso-impianto. In sezione nelle profondità della scaffold, si poteva osservare nuovo osso depositato all'interno dei pori. Nella parte superiore, l'impalcatura era circondata da tessuto molle fino alla superficie articolare, in cui si poteva apprezzare un'architettura come di una nuova articolazione, inoltre l'analisi istologica ha mostrato la presenza di tessuto fibroso a contatto con lo scaffold, ma nessuna prova di rigenerazione ossea. Quando un frammento di scaffold è stato rilasciato nel tessuto molle, non è stata osservata nessuna penetrazione da parte del tessuto.



4.1.1 - Interazione cellula materiale

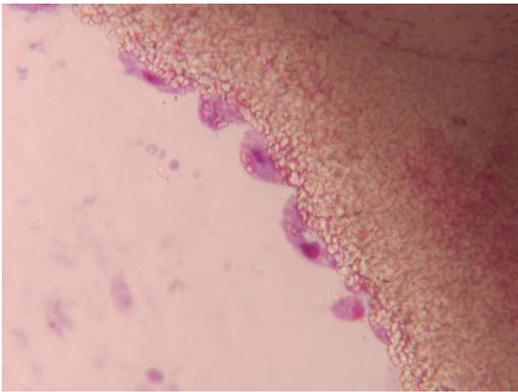
Era evidente un cerchio di osteoblasti lontani dal margine della superficie con l'osso che appariva completamente maturo e una limitata attività lisosomiale.

Tuttavia, i pori sono apparsi profondamente invasi dalle cellule che intervengono durante la formazione di nuovo osso, indicando la capacità dello scaffold di essere perfuso da fluidi organici e di essere vascolarizzato, evidenziando l'importanza dell'interconnessione dei pori a livello macro e micro. In uno dei due condili esclusi dallo studio split-mouth, il condilo fratturato di HA era caduto nella fascia muscolare mediale non mostrando comunque alcun coinvolgimento del tessuto molle circostante. Ciò testimonia come la funzione stimoli la deposizione e la funzionalizzazione cellulare.

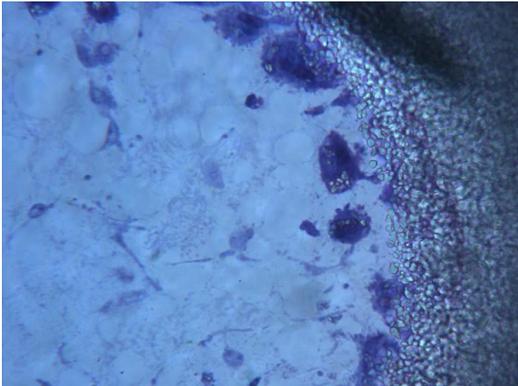


4.1.2 - Degradazione materiale

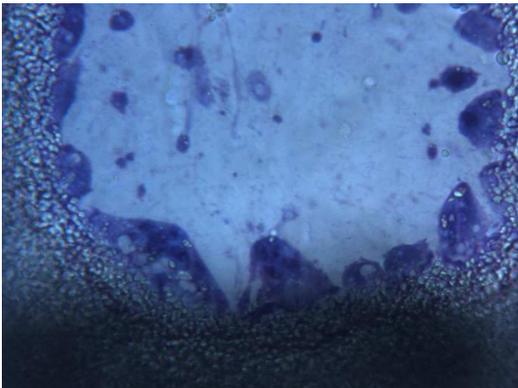
La documentazione istologica di rimodellamento osseo ha mostrato la degradazione del materiale e apposizione di osso nuovo. Anche se il follow-up è stato programmato con il sacrificio dopo 4 mesi (16 settimane), sono stati trovati diversi gradi di maturazione ossea. E' stata rilevata la deposizione iniziale dei macrofagi sulla superficie dei pori e l'organizzazione di cellule multinucleate segnale della prima fase di degradazione del materiale. La degradazione iniziale del materiale è stata valutata misurando l'attività osteoclastica: frammenti del materiale erano visibili nel citoplasma, mentre l'attività enzimatica extracellulare è stata rilevata nelle microparticelle separate tra osteoclasti e la parete dei micropori / macropori. Il passo successivo ha mostrato le cellule multinucleate (osteoclasti) polarizzate con i loro nuclei all'estremità opposta del citoplasma rispetto alla superficie della membrana coinvolte in un'attività lisosomiale.



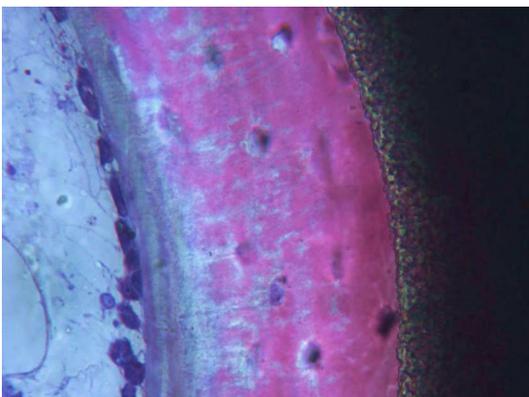
Iniziale deposizione dei macrofagi sulla superficie del poro



Iniziale attività di degradazione del materiale



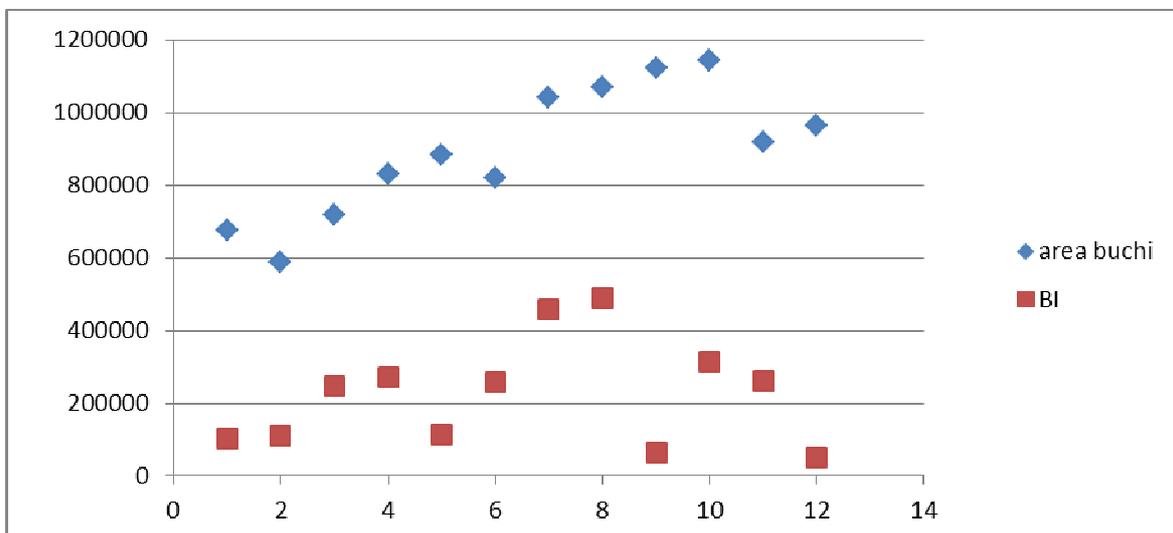
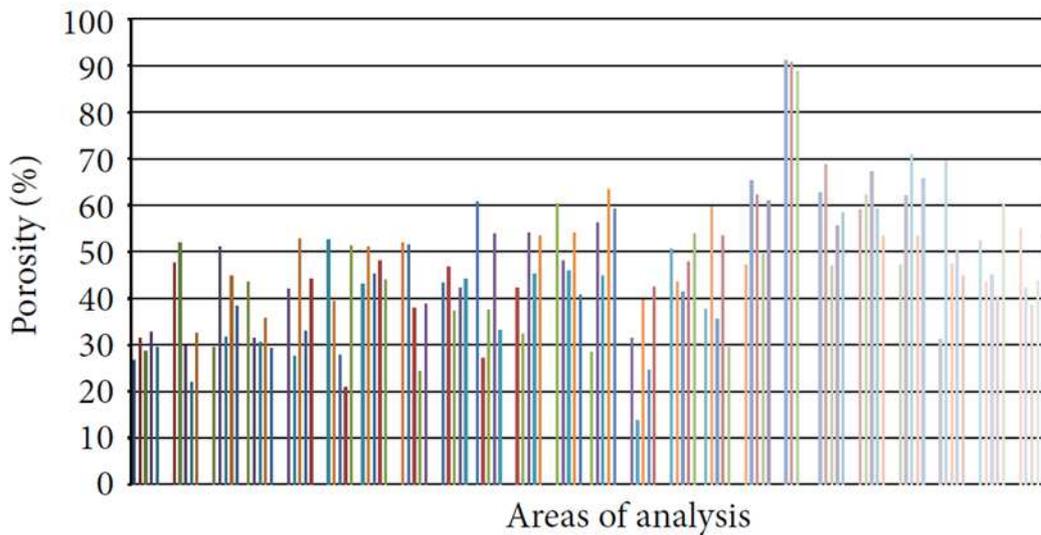
Le cellule multinucleate (osteoclasti) polarizzano i loro nuclei nella parte opposta del citoplasma rispetto alla membrana di superficie coinvolta in processi lisosomiali



Fine della degradazione

4.1.3 – Porosità

I valori di porosità degli scaffold utilizzati non sono risultati omogenei ed è stata calcolata la percentuale di area vuota sulla superficie totale esaminata in 120 aree analizzate (cinque aree standard in tre diverse posizioni per ciascuno condilo). I valori variavano da un minimo pari al 14% di porosità ad un massimo del 91% . Secondo una distribuzione gaussiana della percentuale di porosità, i valori estremi rappresentano soltanto i codici curva, mentre la frequenza media di porosità era 45.43%.Questo valore è diverso dalla porosità totale del materiale (70%) perché rappresenta solo la porosità media, valore utilizzato per i nei campioni dell' istomorfometria.

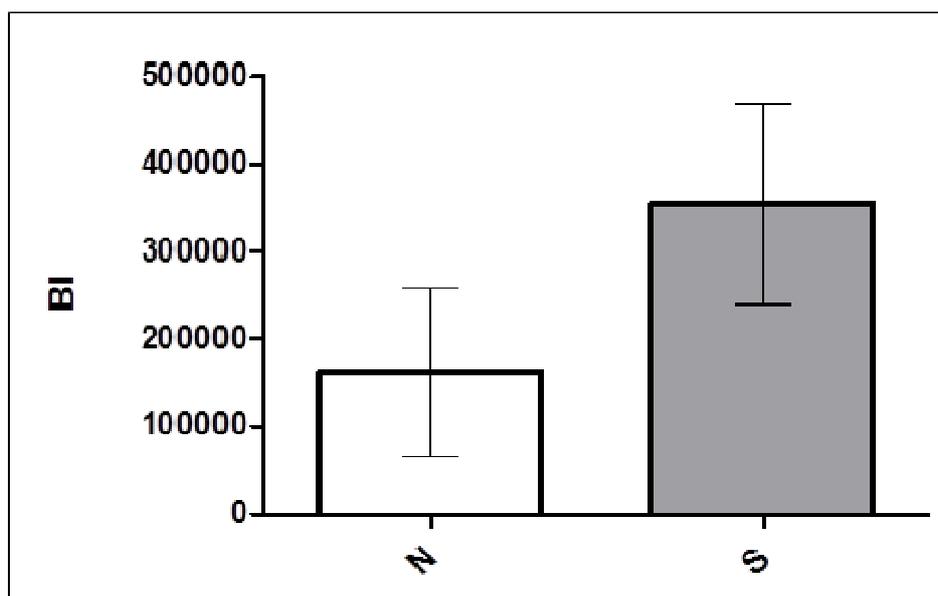


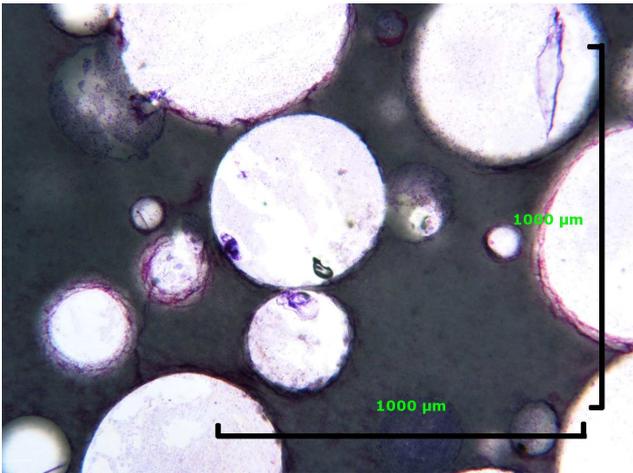
4.2 – Crescita ossea

Valori assoluti di bone ingrow (BI). I valori assoluti di crescita ossea sullo scaffold tra i condili seminati con MSC rispetto ai condili non seminati sono stati basati sui campioni raccolti in sei animali impiantati bilateralmente. Due condili, uno con e uno senza MSC, sono stati esclusi dall'analisi a causa di complicanze intercorse durante il periodo di guarigione. Un condilo è stato escluso a causa di infezione e l'altro a causa di una vite allentata durante il periodo di follow up che ha provocato lo spostamento del condilo. I condili individuali sono stati valutati come singole unità nel confronto tra presenza o assenza di MSC denominati come rispettivamente "S" ed "N", rispetto alla percentuale della porosità di HA valutando la riduzione della porosità dovuta al riempimento del nuovo osso, e calcolando la superficie relativa di osso neoformato all'interno dei pori. L'analisi della riduzione porosità causa l'apposizione di osso neoformato mostrando una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra condili caricati con MSC e condili non caricati. L'area media BI nei condili senza MSC era $112,692 \mu\text{m}^2 (\pm 95,787 \mu\text{m}^2)$, mentre quello per i condili con MSC era $315,501 \mu\text{m}^2 (\pm 113,547 \mu\text{m}^2)$; questa differenza era statisticamente significativa ($p = 0,0389$). Nei condili senza MSC, l'analisi qualitativa del campione ha dimostrato un osso con un ritardo di maturazione dopo un periodo di guarigione di 4 mesi, che era in contrasto con la buona organizzazione e maturazione di osteoblasti e osteoclasti dei condili con MSC.

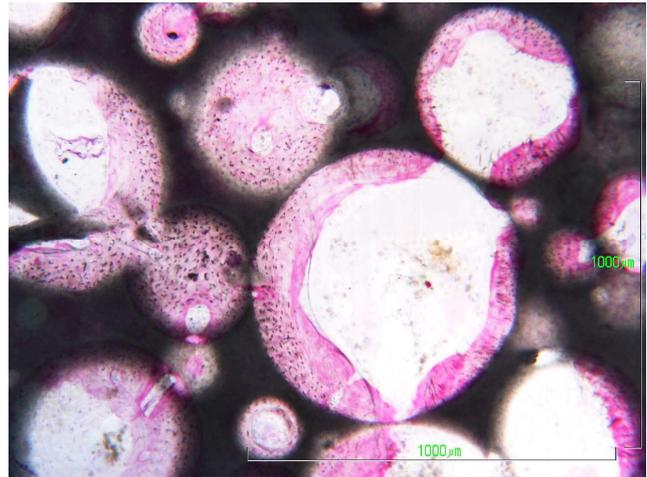
La presenza delle MSC ha dimostrato accelerare e facilitare l'ingresso nei pori di osso neoformato, aumentando la percentuale di osso di riempimento nei pori ad un valore medio del 180% superiore agli scaffold senza MSC.

Condyle	MSC	HA porosity	New Bone Area	Porosity Reduction
1 Left		35,20%	5,30%	14,60%
2 L		43,30%	14,10%	31,90%
3 L		45,90%	5,90%	13,20%
4 L		58,50%	3,40%	6%
5 L		47,90%	13,50%	28,50%
1 Right	X	37,50%	12,80%	31,10%
2 R	X	42,80%	13,40%	28,20%
3 R	X	54,20%	23,90%	44,30%
4 R	X	55,70%	25,50%	45,20%
5 R	X	59,50%	16,40%	28,20%



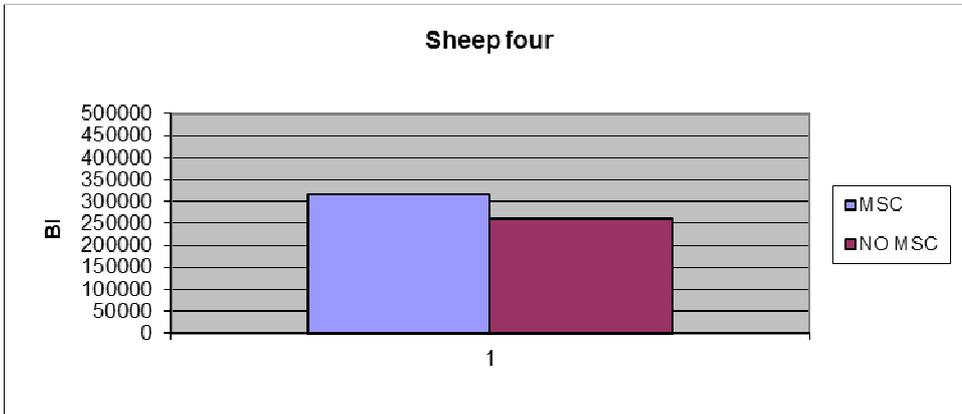
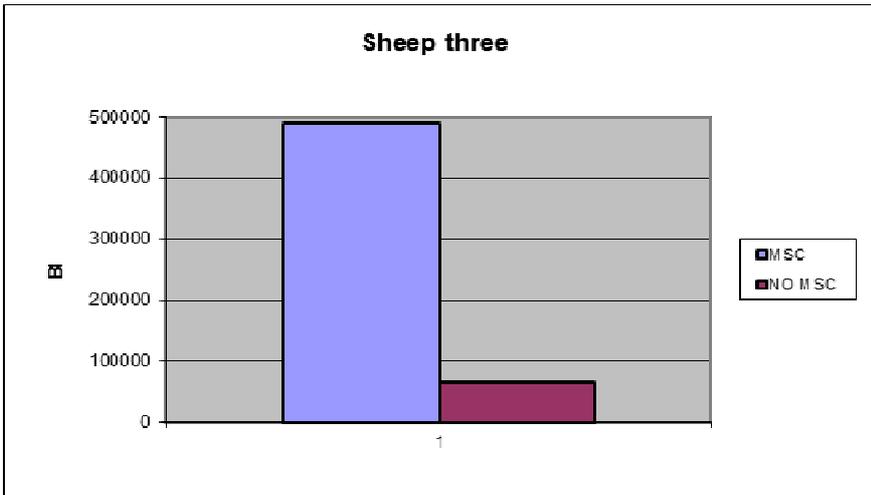
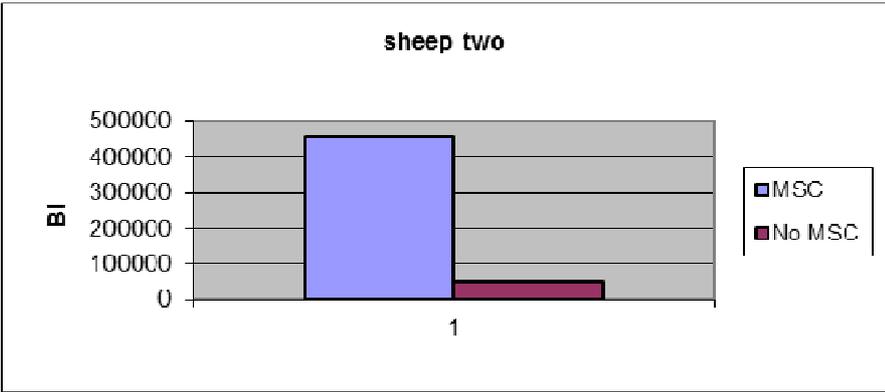
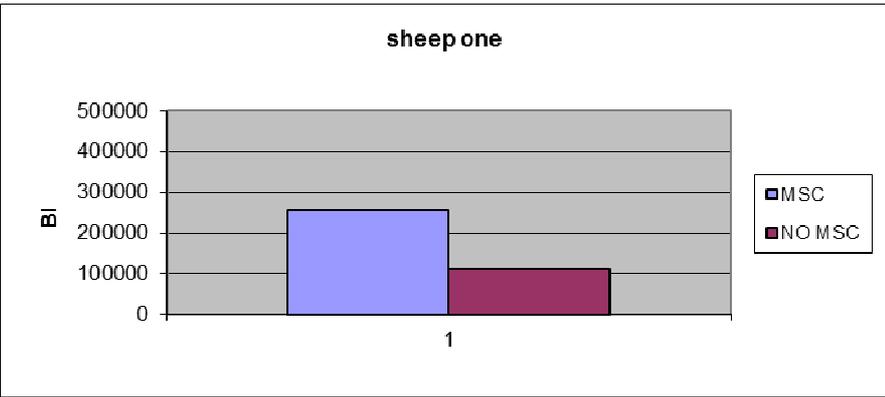


Senza MSC



Con MSC

Valori relativi di BI. I valori relativi di crescita ossea nello stesso animale nel confronto dello scaffold con cellule staminali mesenchimali rispetto allo scaffold senza MSC è stato effettuato su 4 animali in quanto 2 sono stati esclusi per le complicanze intercorse che sono state espresse in precedenza. I condili caricati con MSC hanno mostrato una formazione ossea superiore anche raffrontando lo stesso soggetto. Pecora 1 ha mostrato un'area di nuova BI pari a 257.937 μm^2 con MSCs e 112.692 μm^2 senza MSCs (differenza del 129%). Pecora 2 ha mostrato una BI di 458.210 μm^2 con MSC e 51.064 μm^2 senza MSCs (differenza del 797%). Pecora 3 ha mostrato una BI di 489.576 μm^2 con MSC e 65.774 μm^2 senza MSCs (differenza del 644%). Pecora 4 ha mostrato una BI di 315.501 μm^2 con MSC e la di 260.072 μm^2 senza MSCs (differenza del 21%)



5. DISCUSSIONE

Ancora oggi i difetti ossei critici creati dopo la resezione di neoplasie o intercorsi dopo traumi rappresentano ancora un ostacolo nella medicina rigenerativa e una sfida per il chirurgo.

Con lo scopo di ridurre la morbilità postoperatoria e di accorciare i tempi operatori e la degenza del paziente, la ricerca si è sempre più orientata verso l'utilizzo di biomateriali di sintesi con capacità osteoconduttive per sostituire parzialmente o interamente l'osso autologo che, con le sue caratteristiche osteogenetiche, rimane ancora il gold standard nella chirurgia ricostruttiva.

Diversi materiali sono ad oggi disponibili: tra quelli non riassorbibili abbiamo per esempio il Poly-Ether-Ether-chetone (PEEK) che è un materiale noto per la sostituzione delle ossa in grandi o piccoli difetti [75]. Ha però mostrato alcune complicazioni rispetto ad altre protesi alloplastiche (come ad esempio, politetrafluoroetilene espanso, porosa polietilene, metacrilato di metile, e gomma di silicone) in particolare complicanze post-operatorie come gonfiore, infezione, reazione da corpo estraneo, lo spostamento dell'innesto fino all'espulsione dello stesso [76-77]. Tuttavia, non sono disponibili dati a lungo termine circa il mantenimento delle protesi impiantate e le proprietà biomeccaniche del PEEK quando viene utilizzato in grandi difetti con un significativo carico funzionale. La ricerca in ingegneria tissutale è focalizzata sulla ricerca di nuovi approcci per la rigenerazione ossea che possano ottimizzare i risultati e diminuire i rischi di morbilità del paziente tramite l' utilizzo di scaffold di ceramica porosa seminate con MSC. Il successo della crescita ossea grazie alla stabilità e porosità del materiale è stato ampiamente riportato [78]. Diversi studi ortopedici su grandi animali sottolineano la differenza tra la guarigione in siti trattati con scaffold caricato con MSCs rispetto alla guarigione dei casi trattati con scaffold senza MSCs [79] Kon et al. [80] hanno valutato l'uso di cellule staminali mesenchimali per la riparazione ossea di difetti su modello animale di pecora. Hanno ricostruito un difetto critico nell'osso tibiale utilizzando due metodi: uno scaffold poroso di 100% HA seminato con MSC, il solo scaffold senza MSC e il difetto lasciato vuoto come controllo. Nonostante la formazione ossea sia stata osservata

istologicamente in entrambi i gruppi, negli scaffold seminati con MSCs la formazione ossea si è verificata sia nello spazio interno dei pori che su tutto lo scaffold mentre, nell' HA senza MSCs, la formazione di osso è stata limitata alla superficie e non è stata osservata alcuna penetrazione dei pori interni. Petite et al. [81] hanno utilizzato un modello di pecora simile allo studio precedente dove sono state utilizzate MSC espanse in vitro seminate poi su uno scaffold riassorbibile a base di corallo e hanno riportato che nei difetti lasciati vuoti o con lo scaffold non caricato non si è verificato riempimento o apposizione di nuovo osso nel difetto. In un ulteriore studio [82], lo stesso gruppo suggerisce che le modalità di semina delle cellule sullo scaffold influenzano le prestazioni dell'innesto nella . Yuan et al. [83] hanno riportato uno studio in cui esaminavano la rigenerazione ossea in un difetto lungo segmentale mandibolare di 30 millimetri creato in un modello canino utilizzando uno scaffold poroso di idrossiapatite beta-tricalcico seminato con MSCs indotte in senso osteogenetico. Cinque animali sono stati impiantato. Nel gruppo sperimentale (gruppo MSC) è stata osservata formazione di nuovo osso dopo 4 settimane dall'intervento, e un unione ossea è stata raggiunta dopo otto mesi. Viceversa, nel gruppo che aveva utilizzato il solo scaffold non caricato si è ottenuta una formazione ossea minima con una unione di collegamento tra i capi molto scarsa. Schliephake et al. [83] hanno usato cellule osteoprogenitrici autologhe coltivate ed espanse su scaffold poroso di fosfato-calcico, per migliorare la formazione ossea in un difetto segmentale di 35 mm in mandibola di otto pecore. Gli autori hanno riportato una formazione ossea significativamente maggiore nel gruppo con cellule ossee coltivate rispetto al gruppo controllo. Neo- formazione ossea era presente nel 34,4% delle unità trasversali valutate dello scaffold seminato ma solo nel 10,4% del controllo gruppo. Inoltre una differenza significativa è stata osservata nella distribuzione spaziale della formazione ossea rispetto allo scaffold; in particolare le cellule osteoprogenitrici sembrano aver aumentato la formazione ossea nel centro del difetto rispetto al gruppo di controllo dove la neo-osteogenesi risultava presente ai margini del difetto nelle vicinanze dell'osso nativo. Sebbene questi studi si differenzino per il modello animale utilizzato, il tipo di difetto considerato, le caratteristiche delle ossa trattate, la composizione chimica e la capacità di riassorbimento dello

scaffold utilizzato, in tutti i campioni gli scaffold caricati con MSCs presentavano un significativo vantaggio nella formazione ossea e nella guarigione dei difetti. Nel nostro studio è stato scelto un modello split-mouth per il suo valore statistico anche in una piccola popolazione. Da un punto di vista quantitativo, due tipi di analisi sono state eseguite. La prima ha analizzato i dati come valori assoluti, senza considerare se i risultati fossero dello stesso animale, ma valutando il campione come caricato o non caricato con MSCs. La seconda ha analizzato i dati come valori relativi utilizzando il disegno sperimentale split-mouth dello studio. Inoltre, il nostro modello ha usato un difetto articolare anziché difetti intercalari, come negli studi precedentemente citati, e descrive il processo di rigenerazione in un difetto più complesso come quello della superficie osteocondrale dell'ATM cercando di tenere conto di tutti i possibili scenari in ortopedia con gli scaffold in aree articolati. L'analisi quantitativa di rigenerazione ossea nel nostro studio ha mostrato un elevato grado di eterogeneità con importanti differenze di formazione ossea tra i diversi animali, molto probabilmente a causa della risposta locale del singolo host. Infatti, le cellule MSCs seminate e inserite in loco possono esercitare un effetto paracrino e possono richiamare vari co-fattori di guarigione (cellule osteoprogenitrici) che sono variabili individualmente [84-85]. Anche le dimensioni dei pori sembrano rivestire un ruolo differente nella neo-osteogenesi e neo-angiogenesi secondo un effetto dimensionale; i pori più piccoli sembrano svolgere un ruolo più importante nell'iniziale ancoraggio cellulare rispetto ai pori più grandi [85]. Nel nostro studio, la grande variabilità di porosità sia dimensionale tra i pori dello stesso campione, che tra i campioni non ha permesso di individuare una correlazione tra la presenza delle cellule MSC e la dimensione dei pori. Tuttavia, anche se con importanti differenze a seconda delle dimensioni dei pori, tutti gli scaffold seminati con MSC hanno sempre mostrato una maggiore BI rispetto ai campioni non seminati. Gli scaffold che durante il primo follow-up hanno mostrato il raggiungimento di una buona stabilità primaria, hanno presentato all'analisi istologica una continuità osso-scaffold, senza interposizione di tessuto connettivo o fibroso, ma quasi un'unione strutturale ben rappresentata e ben organizzata; la composizione superficiale e la struttura dell'idrossiapatite ha consentito una perfetta

osteointegrazione all'interfaccia osso-scaffold. L'importanza di condizioni meccaniche stabili è stato confermato dal condilo fratturato che cadendo nella fascia muscolare, non ha mostrato alcuna integrazione con i tessuti circostanti. La seconda analisi di confronto tra i due condili (con e senza MSC) nello stesso animale, secondo il progetto split-mouth dello studio ha utilizzato quattro pecore.

Analisi dei valori assoluti Riempimento Osseo. Nell'analisi quantitativa che è andata a misurare il valore di riempimento di nuovo osso all'interno dei pori dell'HA, si è potuto apprezzare una notevole discrepanza tra il riempimento dei pori negli scaffold caricati con MSC e quelli non caricati, tale valore era statisticamente significativo. Questa differenza era rilevante in quanto l'area media di BI nei pori interni dell'HA era $315,501 \mu\text{m}^2$ per il gruppo con MSC, mentre quella nel gruppo di controllo era $112,692 \mu\text{m}^2$. Tale risultato conferma i dati della letteratura riguardanti il potenziale delle MSC per la rigenerazione ossea in medicina rigenerativa. Poiché le deviazioni standard (SD) variano notevolmente (MSC gruppo SD = $\pm 113,547 \mu\text{m}^2$ e Controllo SD group = $\pm 95,787 \mu\text{m}^2$), una ulteriore analisi dettagliata di confronto dei dati split-mouth è stato condotta per valutare l'incremento del riempimento osseo dovuto alla presenza di MSC cercando di limitare le variabili considerando lo stesso animale.

Analisi nel modello Split-Mouth del Riempimento Osseo. Nei quattro animali inclusi in questa sezione dello studio, i valori percentuali di incremento a causa delle MSC variavano dal 21% al 797% . Questo ampio range è dovuto probabilmente alla risposta individuale dell'ospite individuale e a fattori chirurgici e di follow-up. La pecora con il più basso valore di incremento (pecora 4) è stata colpita da una grave reazione infiammatoria della parotide sinistra nel corso del secondo mese di guarigione ed è stata trattata con anti-infiammatori e antibiotici per una settimana. Cellule infiammatorie sono state trovate anche in corrispondenza del condilo sinistro. Pecora 1 ha avuto una frattura parziale alla base dello scaffold di destra (con MSC), probabilmente ciò ha causato un micromovimento all'interfaccia che ha interferito con l'osso nel processo di guarigione intorno e all'interno del condilo. Un'ulteriore osservazione qualitativa ha indicato che le capsule articolari sono state restaurate e risultavano perfettamente funzionanti in tutti gli esemplari tranne i due

condili persi. L'analisi macroscopica degli scaffold espianati mostrano un' insolita camera articolare, con il disco articolare saldamente adeso alla superficie articolare del condilo tale che la camera non era suddivisa in due aree (superiore e inferiore, diviso per il disco). La fossa glenoidea era intatta, e priva di segni di infiammazione. Dopo 4 mesi di guarigione erano presenti il liquido sinoviale e i legamenti del condilo sembravano essere correttamente collegati alle pareti posteriore, mediale e anteriori della capsula. Un'osservazione interessante che è stata potuta fare è stata quella di poter apprezzare la presenza di nuova cartilagine sulla superficie articolare dell' osso. Ulteriori studi saranno necessari per determinare perché e in quali condizioni la nuova parete ossea sviluppa una nuova cartilagine.

6. CONCLUSIONI

I risultati dello nostro studio hanno confermato i dati della letteratura riguardanti il potenziale delle cellule MSC per la rigenerazione dei tessuti molli in chirurgia ricostruttiva. Il disegno split-mouth dello studio ha mostrato sul medesimo scaffold di HA, un incremento di rigenerazione ossea fino al 797% in seguito all'applicazione di MSCs. L'analisi macroscopica degli espianati degli scaffold hanno mostrato, insolitamente, una camera articolare intatta e l'analisi istologica la presenza di una nuova cartilagine sulla superficie articolare dell' osso rigenerato.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Wei and P. X. Ma, "Structure and properties of nanohydroxyapatite/ polymer composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 25, no. 19, pp. 4749–4757, 2004.
- [2] F. W. Cooke, "Ceramics in orthopedic surgery," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 276, pp. 135–146, 1992.
- [3] E. Lucarelli, M. Fini, A. Beccheroni et al., "Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 435, pp. 62–68, 2005.
- [4] G. Berger, R. Gildenhaar, and U. Ploska, "Rapid resorbable, glassy crystalline materials on the basis of calcium alkali orthophosphates," *Biomaterials*, vol. 16, no. 16, pp. 1241–1248, 1995.
- [5] G. Daculsi, "Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute," *Biomaterials*, vol. 19, no. 16, pp. 1473–1478, 1998.
- [6] S. Kessler, U. Mayr-Wohlfart, A. Ignatius, W. Puhl, L. Claes, and K. P. Günther, "Histomorphological, histomorphometrical and biomechanical analysis of ceramic bone substitutes in a weightbearing animal model," *Journal of Materials Science*, vol. 13, no. 2, pp. 191–195, 2002.
- [7] P. S. Eggli, W. Müller, and R. K. Schenk, "Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone ingrowth and implant substitution," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 232, pp. 127–138, 1988.
- [8] K. A. Hing, S. M. Best, K. E. Tanner, W. Bonfield, and P. A. Revell, "Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes," *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 68, no. 1, pp. 187–200, 2004.
- [9] M. Mastrogiacomo, A. Muraglia, V. Komlev et al., "Tissue engineering of bone: search for a better scaffold," *Orthodontics & Craniofacial Research*, vol. 8, no. 4, pp. 277–284, 2005.
- [10] J. L. Drury and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337–4351, 2003.
- [11] A. Y. Thompson, K. A. Piez, and S. M. Seyedin, "Chondrogenesis in agarose gel culture: a model for chondrogenic induction, proliferation and differentiation," *Experimental Cell Research*, vol. 157, no. 2, pp. 483–494, 1985.
- [12] D. R. Diduch, L. C. M. Jordan, C. M. Mierisch, and G. Balian, "Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects," *Arthroscopy*, vol. 16, no. 6, pp. 571–577, 2000.
- [13] C. R. Chu, R. D. Coutts, M. Yoshioka, F. L. Harwood, A. Z. Monosov, and D. Amiel, "Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 29, no. 9, pp. 1147–1154, 1995.
- [14] D. J. Griffon, M. R. Sedighi, A. Sendemir-Urkmez, A. A. Stewart, and R. Jamison, "Evaluation of vacuum and dynamic cell seeding of polyglycolic acid and chitosan scaffolds for cartilage engineering," *The American Journal of Veterinary Research*, vol. 66, no. 4, pp. 599–605, 2005.

- [15] J.M.Moran,D. Pazzano, and L. J. Bonassar, “Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering,” *Tissue Engineering*, vol. 9, no. 1, pp. 63–70, 2003.
- [16] C. R. Nuttelman, A. M. Kloxin, and K. S. Anseth, “Temporal changes in peg hydrogel structure influence human mesenchymal stem cell proliferation and matrix mineralization,” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 585, pp. 135–149, 2006.
- [17] J. Elisseeff, W. McIntosh, K. Anseth, S. Riley, P. Ragan, and R. Langer, “Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 51, no. 2, pp. 164–171, 2000.
- [18] D.-A.Wang,C.G.Williams, Q. Li,B. Sharma, andJ.H.Elisseeff,“Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate- containing hydrogel,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 22, pp. 3969–3980, 2003.
- [19] A. Tampieri, E. Landi, F. Valentini et al., “A conceptually new type of bio-hybrid scaffold for bone regeneration,”*Nanotechnology*, vol. 22, no. 1, Article ID015104, 2011.
- [20] H. Ohgushi, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan, “Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic: experiments in rats,” *Acta Orthopaedica Scandinavica*, vol. 60, no. 3, pp. 334– 339, 1989.
- [21] J.-P. van Loon, L. G. M. de Bont, F. K. L. Spijkervet, G. J. Verkerke, and R. S. B. Liem, “A short-term study in sheep with the Groningen temporomandibular joint prosthesis,” *International Journal of Oral andMaxillofacial Surgery*, vol. 29, no. 5, pp. 315– 324, 2000.
- [22] S. P. Bruder, A. A. Kurth, M. Shea, W. C. Hayes, N. Jaiswal, and S.Kadiyala, “Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells,” *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 16, no. 2, pp. 155–162, 1998.
- [23] S. P. Bruder, K. H. Kraus, V. M. Goldberg, and S. Kadiyala, “The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects,” *Journal of Bone and Joint Surgery A*, vol. 80, no. 7, pp. 985–996, 1998.
- [24] H. Petite, V. Viateau,W. Bensaïd et al., “Tissue-engineered bone regeneration,” *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 9, pp. 959–963, 2000.
- [25] Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*. 1963;62:327-336.
- [26] Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-454.
- [27] Friedenstein AY, Chailakhyan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinetics* 1970;3:392-403.
- [28] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;5:393-5.

- [29] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
- [30] Thomas ED, et al.: "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy". *New Engl J Med*, 257: 491,1957
- [31] Evans, M.J. and Kaufman, M.H., 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos', *Nature*, 292, pp. 154-156.
- [32] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.
- [33] Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature*. 2001;414:88-91.
- [34] Takahashi K, Yamanaka S "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell* 126 (4): 663–76.
- [35] Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*.2001;414:92-97.
- [36] Kahan BW, Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst*. 1970;44:1015-1036.
- [37] Rosenthal MD, Wishnow RM, Sato GH. In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1970;44:1001-1014.
- [38] Evans MJ. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1972;28:163-176.
- [39] Vescovi AL, Feroni C, Ferrari D, Galli R, Gritti A. Le cellule staminali neurali e la loro capacità di transdifferenziamento. *Prospettive in pediatria*. 2001;31:329-333.
- [40] Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441:1068-1074.
- [41] Diaz-Flores L, Jr., Madrid JF, Gutierrez R, et al. Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol Histopathol*. 2006;21:995-1027.
- [42] Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*.2001;414:98-104.
- [43] Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006;441:1075-1079.
- [44] Fang TC, Alison MR, Wright NA, Poulosom R. Adult stem cell plasticity: will engineered tissues be rejected? *Int J Exp Pathol*. 2004;85:115-124.)
- [45] Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961; 14: 213-22.

- [46] Hansen-Smith FM, Carlson BM. Cellular responses to free grafting of the extensor digitorum longus muscle of the rat. *J. Neurol. Sci.* 1979; 41(2): 149-173.
- [47] Jensen UB, Lowell S, Watt F.M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 1999; 126(11): 2409-2418.
- [48] Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 1997; 8(6): 389-404.
- [49] Baum C, Weissman I, Tsukamoto A, Buckle A, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:2804
- [50] Ogawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single 34-low/ negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996;273:242-245.
- [51] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 2001;7:1028-1034.
- [52] Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med.* 1996;2:1329-1337
- [53] Michallet M, Philip T, Philip I, et al. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol.* 2000;28:858-870.
- [54] Kawashima I, Zanjani E, Almada-Porada G, Flake A, Zeng H, Ogawa M. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood.* 1996;87:4136-4142
- [55] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315-7
- [56] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393-403.
- [57] Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts indifferent populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2:83-92.
- [58] Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980;56:289-301.
- [59] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.
- [60] Pistoia V, Uccelli A, Moretta L. Le cellule staminali mesenchimali: nuove protagoniste nell'immunoregolazione. *Gaslini.* 2008;40:73-78.

- [61] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008.
- [62] Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*. 1982;1:87-94.
- [63] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006;36:2566-2573.
- [64] Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262:509-525.
- [65] Xu W, Zhang X, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:623-631.
- [66] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22:377-384.
- [67] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
- [68] Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. 2004;77:192-204.
- [69] Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*. 2004;77:174-191.
- [70] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91:1017-1026
- [71] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
- [72] Xu W, Zhang X, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:623-631
- [73] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22:377-384.
- [74] Rameshbabu, N., Rao, K. P. & Kumar, T. S. S.(2005) Accelerated microwave processing of nanocrystalline hydroxyapatite. *J. Mater. Sci*. 40, 6319–6323.
- [75] S. L. Edwards and J. A. Werkmeister, “Mechanical evaluation and cell response of woven polyetheretherketone scaffolds,” *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 100, no. 12, pp. 3326–3331, 2012.
- [76] W. J. Binder, “Custom-designed facial implants,” *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, vol. 16,no. 1, pp. 133–146, 2008.

- [77] J. Niamtu III, "Essentials of cheek and midface implants," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 68, no. 6, pp. 1420–1429, 2010.
- [78] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaïd et al., "Tissue-engineered bone regeneration," *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 9, pp. 959–963, 2000.
- [79] Y. He, Z.-Y. Zhang, H.-G. Zhu, W. Qiu, X. Jiang, and W. Guo, "Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate," *Journal of Craniofacial Surgery*, vol. 18, no. 4, pp. 800–805, 2007.
- [80] E. Kon, A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, I. Martin et al., "Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 49, no. 3, pp. 328–337, 2000.
- [81] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaïd et al., "Tissue-engineered bone regeneration," *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 9, pp. 959–963, 2000.
- [82] W. Bensaïd, K. Oudina, V. Viateau et al., "De Novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model," *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 5-6, pp. 814–824, 2005.
- [83] J. Yuan, L. Cui, W. J. Zhang, W. Liu, and Y. Cao, "Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate," *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1005–1013, 2007.
- [83] H. Schliephake, J. W. Knebel, M. Aufderheide, and M. Tauscher, "Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep," *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 30, no. 6, pp. 531–537, 2001.
- [84] A. T. Badillo, L. Zhang, and K. W. Liechty, "Stromal progenitor cells promote leukocyte migration through production of stromal-derived growth factor 1 α : a potential mechanism for stromal progenitor cell-mediated enhancement of cellular recruitment to wounds," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 43, no. 6, pp. 1128–1133, 2008.
- [85] L. Chen, E. E. Tredget, P. Y. G. Wu, Y. Wu, and Y. Wu, "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 4, Article ID e1886, 2008.