

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Biotecnologie Mediche

Ciclo XXIV

06/F4 - Malattie dell'apparato locomotore e medicina fisica e riabilitativa

MED/33 - Malattie dell'apparato locomotore

MODULAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DI
PRECURSORI MESENCHIMALI UMANI PER APPLICAZIONI DI
INGEGNERIA TISSUTALE

Presentata da: Dott.ssa Elisa Fiorentini

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof. Maria Luisa Zerbini

Relatore

Chiar.mo Prof. Nicola Baldini

Esame finale anno 2012

INDICE

Introduzione

Processo di guarigione ossea.....	3
Ruolo delle cellule staminali.....	7
Eventi molecolari della riparazione ossea.....	11
Ruolo dei fattori di crescita.....	17
Ingegneria tissutale in ortopedia.....	20
Approccio cellulare per applicazioni di ingegneria tissutale in ortopedia.....	23

Effetto degli induttori del differenziamento osteogenico su culture di cellule staminali mesenchimali (hMSC)

Obiettivo dello studio.....	25
<i>Materiali e metodo.....</i>	27
Colture cellulari.....	27
Caratterizzazione genica	33
Analisi dei dati.....	35
<i>Risultati.....</i>	36
Caratterizzazione delle colture di MSC.....	36
Analisi della variazione dell'espressione genica di MSC in risposta ai diversi additivi aggiunti al terreno di coltura.....	44
<i>Discussione.....</i>	48
<i>Conclusioni.....</i>	51
Processo di rimodellamento osseo.....	53
Ruolo del sistema nervoso nel controllo dell'omeostasi ossea.....	55
<i>Valutazione dell'effetto della sostanza P sulla modulazione del differenziamento osteogenico</i>	57

Obiettivo dello studio	57
<i>Materiali e metodo</i>	59
Colture cellulari.....	59
Caratterizzazione delle colture cellulari.....	61
Estrazione dell'RNA.....	62
Real time PCR.....	62
Western blot	65
Espressione di NK1-r.....	65
Valutazione dell'attivazione del segnale di trasduzione	65
Mobilizzazione delle riserve di calcio.....	66
MTS assay.....	67
<i>Risultati</i>	68
Caratterizzazione delle colture di MSC.....	68
Determinazione dell'espressione del recettore, NK1-r, in MSC.....	70
Determinazione dell'attività di NK1r.....	71
Valutazione dell'effetto della sostanza P sull'induzione del commissionamento osteogenico.....	73
Valutazione della sostanza P sulla proliferazione cellulare.....	74
Valutazione dell'espressione di NK1r in presenza di sostanza P.....	79
Mineralizzazione.....	80
<i>Discussione</i>	82
<i>Conclusioni</i>	86
BIBLIOGRAFIA	88

Introduzione

L'osso è un tessuto vascolarizzato, altamente dinamico e complesso, con una matrice extracellulare mineralizzata e dotato della capacità di rispondere alle diverse richieste funzionali e rigenerarsi attraverso un processo noto come rimodellamento osseo¹. Tale processo, che avviene costantemente nel corso della vita di ogni individuo, determina la peculiare caratteristica dello scheletro di rigenerare il tessuto danneggiato senza la formazione di tessuto cicatriziale. Il rimodellamento osseo non si attua solo in seguito ad un insulto traumatico, quale una frattura, ma anche quando si rende necessario l'innesto di un impianto artificiale o la resezione di un segmento osseo.

Molteplici fattori, fra cui citochine e fattori di crescita contenuti nella matrice extracellulare (ECM), interagiscono con le cellule staminali mesenchimali, le cellule del tessuto osseo e della cartilagine e le cellule endoteliali che vengono reclutati al sito del danno tissutale. Tali fattori regolano i meccanismi di segnalazione intra- ed extracellulare che, attraverso i processi di migrazione, proliferazione, chemiotassi, differenziamento e sintesi di proteine extracellulari, sono responsabili dei fenomeni di osteoconduzione ed osteoinduzione.²

Processo di guarigione ossea

Il processo di guarigione ossea è istologicamente caratterizzato da: una fase di infiammazione precoce, con formazione di tessuto di granulazione; una fase ripartiva, che ha inizio con la formazione del callo cartilagineo ed osso immaturo e termina con la sostituzione del callo con osso lamellare; ed una fase di rimodellamento tardiva che consente di ripristinare la forma originale dell'osso.

Infiammazione. In caso di frattura il trauma consiste non solo nell'interruzione dell'integrità scheletrica, ma anche nella distruzione della struttura vascolare, che compromette l'apporto di nutrienti al sito della lesione. Ciò determina una ridotta tensione di ossigeno e la distruzione dell'architettura del midollo. L'ematoma che si genera tra i capi di frattura rappresenta una fonte di molecole segnale, come fattori di crescita e citochine, per i precursori monocito-macrofagici e osteo-condroblastici.³ I macrofagi e le altre cellule infiammatorie reclutate secernono *fibroblast growth factor* (FGF), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β* (TGF β), *insulin-like growth factor I* (IGF-I) ed una varietà

di citochine, fra cui interleuchina 1 (IL-1) e interleuchina 6 (IL-6). A loro volta, queste hanno un effetto chemiotattico sulle cellule infiammatorie e sui precursori osteoblastici.^{4,5} Durante la fase precoce, i precursori mesenchimali proliferano e si differenziano in senso osteogenico e condrogenico⁶ (Figura 1); si assiste inoltre alla formazione di nuovi vasi sanguigni per gemmazione dalle strutture vascolari preesistenti attraverso una complessa catena di eventi: degradazione enzimatica della membrana basale, migrazione delle cellule endoteliali in direzione dello stimolo angiogenetico, proliferazione, maturazione e organizzazione delle cellule endoteliali in tubi capillari. Tale processo è regolato da FGF, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e angiopoietina 1 e 2.

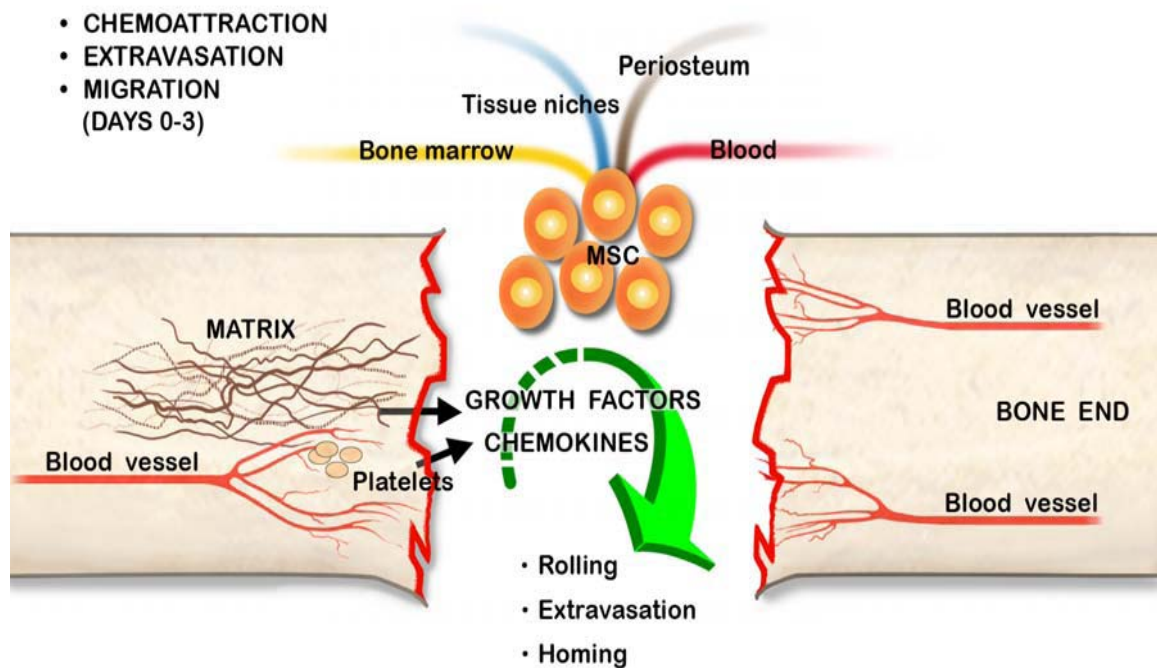


Figura 1. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) provenienti da sangue, periostio, midollo osseo e altre nicchie tissutali, migrano al sito della frattura ossea. I fattori di crescita $TGF\beta$, FGF, PDGF e IGF-I e le chemochine IL-1, IL-6 e $TNF-\alpha$, rilasciati dalla ECM e dalle piastrine, promuovono il reclutamento, la migrazione, la proliferazione e l'homing delle MSC al sito della lesione.

Riparazione. L'ossificazione intramembranosa ha inizio pochi giorni dopo il danno tissutale, mentre l'ossificazione encondrale, che coinvolge i tessuti adiacenti il sito della frattura, si sviluppa nell'arco di un mese circa. L'area subperiostale e i tessuti molli che circondano il sito della frattura formano il cosiddetto 'callo duro' e creano direttamente nuovo tessuto osseo. In tale processo i precursori mesenchimali reclutati al sito della lesione si differenziano in senso osteoblastico e producono sia osso compatto che osso trabecolare senza indurre la formazione di cartilagine. L'ossificazione encondrale coinvolge il reclutamento e la proliferazione dei progenitori multipotenti ed il loro differenziamento in cartilagine. La proliferazione delle cellule staminali mesenchimali (MSC) è già apprezzabile 3 giorni dopo la frattura e rimane elevata per alcuni giorni.⁷ (Figura 2)

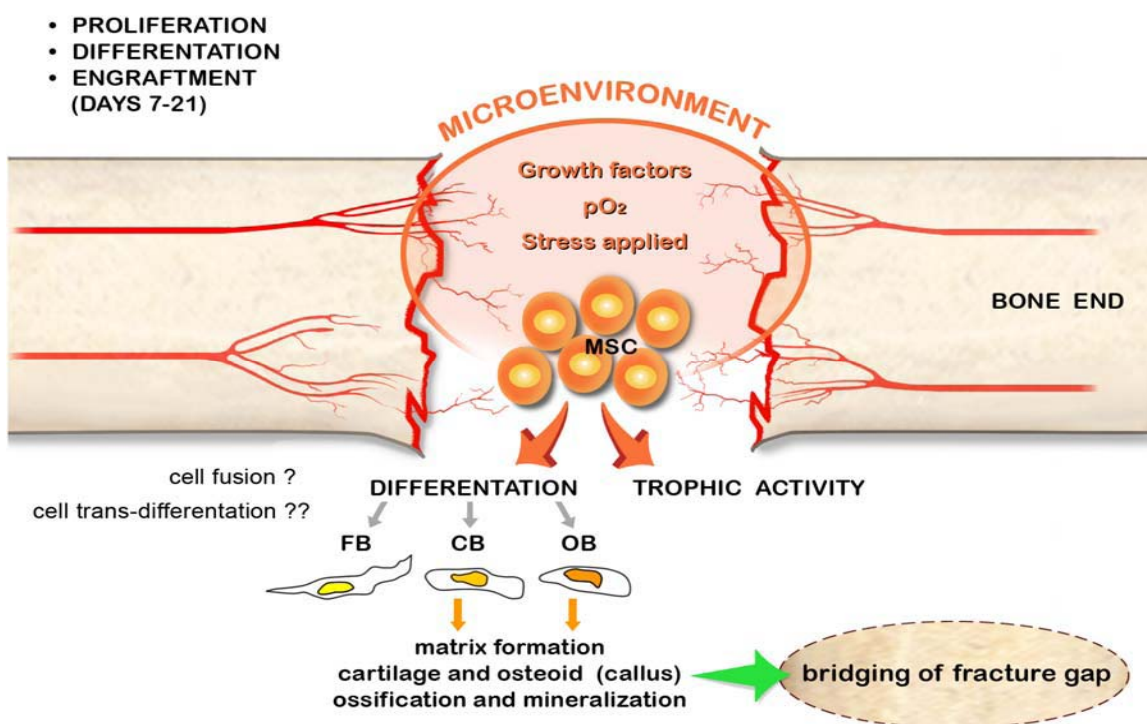


Figura 2. Nel sito della frattura, fattori microambientali, quali ridotta tensione dell'ossigeno, sollecitazioni meccaniche e fattori di crescita, inducono il differenziamento delle MSC in fibroblasti (FB), condroblasti (CB) ed osteoblasti (OB). Tali cellule sintetizzano la ECM che andrà incontro ad un processo di calcificazione per poi essere convertita in osso. Recentemente è stato ipotizzato che le MSC possiedano anche una rilevante attività 'trofica' oltre alla nota abilità differenziativa.

La condrogenesi determina la formazione di un callo cartilagineo che riempie e stabilizza il sito della frattura. I condrociti del callo cartilagineo, adiacenti al callo osseo, rilasciano calcio mitocondriale nella matrice e depongono collagene di tipo Idi Tipo II ed aggregano. Dopo 2 settimane tali cellule vanno incontro ad ipertrofia e producono collagene di tipo Idi Tipo X. In seguito, la membrana, parzialmente mineralizzata, viene riassorbita e sostituita con una matrice formata principalmente da collagene di tipo Idi tipo I. I condrociti rilasciano fosfatasi e proteasi per preparare la matrice alla successiva mineralizzazione ⁸. L'attività delle fosfatasi consiste nel rendere disponibili gruppi fosfato, che reagiscono con il calcio rilasciato dai mitocondri determinando la precipitazione del fosfato di calcio e quindi la calcificazione della cartilagine. Le proteasi degradano i proteoglicani che impediscono la mineralizzazione, permettendo ai condrociti di controllare la velocità e l'andamento chimico-fisico del processo di mineralizzazione della cartilagine. Dopo 4-5 settimane si attivano i condroclasti, cellule multinucleate responsabili della degradazione della cartilagine calcificata. Durante il riassorbimento della matrice cartilaginea, i condroclasti inviano dei segnali che permettono ai vasi sanguigni di penetrare nel tessuto, portando con sé cellule mesenchimali staminali perivascolari che si differenzieranno in cellule osteoprogenitrici. Le cellule endoteliali, assieme ad altri tipi cellulari che esprimono metalloproteasi, facilitano l'invasione vascolare e la rimozione dei setti e delle strutture cartilaginee residue ⁹. I tessuti derivanti dall'ossificazione intramembranosa ed encondrale crescono fino a congiungersi, e dopo 6-7 settimane si osserva una combinazione di cartilagine calcificata e nuovo osso reticolare. La transizione da cartilagine a osso coinvolge una serie di eventi programmati di rimozione cellulare e modificazione della matrice, durante la quale i condrociti vanno incontro ad apoptosi ¹⁰.

Rimodellamento. La completa guarigione della frattura si ottiene durante la fase di rimodellamento, in cui osteoblasti ed osteoclasti cooperano al fine di convertire il callo della frattura in una struttura ossea capace di sostenere i carichi meccanici fisiologici. A differenza di quanto accade nel corso dello sviluppo delle ossa lunghe, in cui la crescita apposizionale periostale è bilanciata dal riassorbimento della superficie endostale, nel rimodellamento del callo della frattura si assiste ad una rimozione esterna di osso e ad apposizione sulle superfici interne. L'osso trabecolare è prima riassorbito dagli osteoclasti, a livello di una cavità di riassorbimento poco profonda chiamata lacuna di Howship. Ogni cellula acidifica lo spazio extracellulare locale e secerne enzimi

lisosomali, proteasi seriniche, collagenasi e la fosfatasi acida tartrato resistente 5b, che degradano la matrice ossea. La distruzione enzimatica della matrice ossea determina il rilascio di varie proteine, tra cui i fattori di crescita immagazzinati precedentemente durante la formazione di osso. Essi, assieme alle citochine prodotte dagli osteoclasti e da altre cellule, reclutano al sito di lesione gli osteoprogenitori che si differenziano in osteoblasti. Gli osteoblasti penetrano nelle cavità di riassorbimento, producono nuova matrice ossea di tipo intrecciato o lamellare e, rimanendovi intrappolati, si differenziano in osteociti¹¹. Infine alcuni osteoblasti assumono una morfologia piatta e si dispongono sulle superfici quiescenti dell'osso (c.d. 'bone lining cells'). L'angiogenesi ha un ruolo di fondamentale importanza nella regolazione del rimodellamento osseo e della riparazione delle fratture. Fattori angiogenici quali VEGF ed endotelina sono regolatori dell'osteoclasto e dell'osteoblasto ed inoltre la formazione di vasi sanguigni è funzionale al trasporto di precursori osteoclastici ed osteoblastici circolanti al sito di rimodellamento attivo. L'interfaccia tra le superfici ossee ed il midollo osseo presenta strutture vascolari, i capillari sinusoidali paratrabecolari, che possiedono una parete interna costituita da cellule endoteliali ed una esterna formata da uno strato di osteoblasti. Il rimodellamento osseo è associato ad un flusso sanguigno più intenso attraverso i microvasi che si adattano alla superficie dell'osso spugnoso¹². Inoltre è stata caratterizzata una struttura vascolare specializzata, 'bone remodeling compartment' (BRC)¹³, composta da cellule piatte simili alle *bone lining cells*. Tali cellule esprimono le principali citochine ed i fattori di crescita osteotropi, rendendo il BRC la probabile sede per l'accoppiamento dei processi di riassorbimento e formazione ossea. La secrezione di tali fattori in uno spazio confinato e separato dal midollo osseo faciliterebbe la regolazione locale del rimodellamento senza interferire con i fattori di crescita secreti dalle cellule del sangue nel midollo.

Ruolo delle cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule definite dalla capacità di proliferare, autorigenerarsi (self-renewal), differenziarsi e generare nuovo tessuto *in vivo*. Esse sono state originariamente descritte da Friedentstein¹⁴ come una popolazione di cellule aderenti alla plastica, clonogeniche, con un fenotipo simile ai fibroblasti e con la capacità di differenziare in osteociti, condrociti, adipociti, tenociti e miociti definendoli "*colony*

forming units fibroblast” (CFU-Fs). Esistono due tipi di cellule staminali: cellule staminali embrionali (ESC) e cellule staminali adulte. Le cellule staminali embrionali derivano dalle cellule interne della blastocisti, pochi giorni dopo la fecondazione dell’uovo e possono differenziarsi in qualunque linea differenziativa. Per ragioni etiche non è possibile utilizzare le ESC per applicazioni cliniche in quanto si renderebbe necessaria la distruzione dell’embrione. Le cellule staminali adulte, isolate per la prima volta dal midollo osseo, sono state ampiamente studiate per il trattamento di malattie ematologiche. Sebbene la staminalità di queste cellule non sia ancora stata dimostrata, l’acronimo hMSC indica “human multipotent mesenchymal stromal cell” e definisce cellule non ematopoietiche (CD34-) derivate dallo stroma, aderenti alla plastica e capaci di differenziarsi, *in vitro*, in osteoblasti, adipociti e condroblasti ^{15,16}.

Negli ultimi anni le MSC si sono rivelate importanti per la comprensione dei *pathways* di differenziamento, per la promozione dell’ingegneria tissutale, per il loro utilizzo come vettori di geni per applicazioni di terapia genica ed infine come immunomodulatori nel trattamento di malattie autoimmunitarie. Per quanto concerne le applicazioni cliniche le MSC autologhe sono state utilizzate in protocolli clinici per il trattamento della cardiopatia ischemica, di malattie vascolari, di lesioni del midollo spinale, di mancata consolidazione di fratture, dell’osteogenesi imperfetta, di malattie neurologiche e del diabete di tipo I ¹⁷.

Inizialmente le MSC sono state definite in base alla loro abilità di differenziare in cellule di origine mesodermica; recenti studi hanno però dimostrato la loro capacità di differenziare in cellule che derivano dai tre diversi foglietti embrionali. Tuttavia la loro abilità di differenziare in cellule non derivanti dal mesoderma è ancora controversa e potrebbe essere attribuita alla mancanza di omogeneità della popolazione di MSC al momento dell’isolamento. Infatti, tuttora non è stato identificato uno specifico antigene di superficie per definire le MSC. Attualmente la *International Society for Cell Therapy* definisce cellule mesenchimali umani multipotenti una popolazione di cellule capaci di aderire *in vitro* alla plastica e capace di esprimere CD105, CD73 e CD90 ma non CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR. Inoltre, le MSC sono state definite cellule MHC classe II negative, in quanto la caratteristica di essere prive di molecole co-stimolatorie come CD40, CD80 e CD86, permette il loro trapianto allogenico senza bisogno di sottoporre il paziente ricevente a terapie di immunosoppressione. Sebbene esse siano state principalmente trovate nel midollo osseo e nel tessuto adiposo, sono noti esempi di

isolamento da sangue periferico, cordone ombelicale, membrana sinoviale, denti decidui, liquido amniotico e regione perivascolare tenendo aperta la questione della naturale nicchia delle MSC.^{18,19}

Il midollo osseo è costituito da cellule stromali ed ematopoietiche; le prime comprendono cellule commissionate, come adipociti ed osteoblasti, e precursori multipotenti. La percentuale di MSC nel midollo osseo è molto bassa (0,001-0,01%). Il tessuto adiposo contiene cellule staminali multipotenti molto simili alle MSC del midollo osseo e che possono essere isolate in elevata quantità dal tessuto derivante dalla liposuzione cosmetica. La proporzione di CFU-F, che rappresentano la reale componente di precursori nella popolazione totale di MSC *in vitro*, è di 1:100 in cellule derivate dal tessuto adiposo, ossia circa 500 volte più alta che nel midollo osseo.²⁰ La presenza di precursori osteogenetici nel sangue è controversa; in ogni caso la loro quantità risulta molto bassa e dipende dal metodo di isolamento.²¹ È possibile che il numero di precursori sia sottostimato a causa del metodo di selezione per aderenza su plastica, ma è comunque interessante notare che la loro quantità aumenta in seguito a fratture, ustioni ed infarto miocardico.^{22,23}

I periciti subendoteliali, che forniscono supporto meccanico, stabilità e contrattilità ai vasi di piccole e grandi dimensioni, sono considerati precursori delle MSC, in quanto capaci di dare origine ad osteoblasti, condrociti ed adipociti.²⁴

La plasticità delle MSC è un ulteriore oggetto di discussione, dal momento che i diversi protocolli sperimentali determinano la selezione di diverse popolazioni di MSC effettivamente isolate e saggiate. Le MSC possono riparare un tessuto danneggiato differenziandosi nel fenotipo opportuno, rilasciando citochine e fattori di crescita ed andando incontro a fusione cellulare. Le principali prove della loro plasticità *in vitro* sono: la capacità di ‘de-differenziarsi’ a partire da un fenotipo condrocitico o adipocitico precedentemente acquisito per poi progredire verso la linea differenziativa osteoblastica; la capacità di transdifferenziarsi, ossia di andare incontro al processo noto come ‘transizione epitelio-mesenchimale’. Alcuni autori ritengono peraltro che ad essere responsabile del cambiamento fenotipico delle MSC sia la fusione cellulare piuttosto che i due meccanismi sopra descritti, pertanto la plasticità osservata sarebbe semplicemente correlata all’eterogeneità della popolazione.²⁵

Anche la consistenza della matrice cellulare potrebbe guidare inizialmente il commissionamento delle MSC, sebbene non sia sufficiente per il completamento del

differenziamento.²⁶ Su substrati semi-solidi (0,1-1 kPa), che simulano la consistenza del tessuto cerebrale, le MSC mostrano un fenotipo neuronale; su substrati di rigidità intermedia (8-17 kPa) esse si differenziano in mioblasti e su substrati rigidi (25-40 kPa), somiglianti ad osteoni, assumono il fenotipo osteoblastico. Se lo stimolo committente è prolungato per qualche settimana, il differenziamento non è reversibile o revocabile tramite l'aggiunta di fattori solubili specifici per un'altra linea differenziativa. Tale osservazione, oltre ad essere consistente con la perdita di elasticità delle cellule differenziate, mette in evidenza il ruolo del microambiente (in particolare dei fattori meccanici) nel determinare il destino delle cellule indifferenziate e suggerisce un ulteriore meccanismo tramite il quale potrebbe essere definito l'homing delle cellule. (Figura 3)

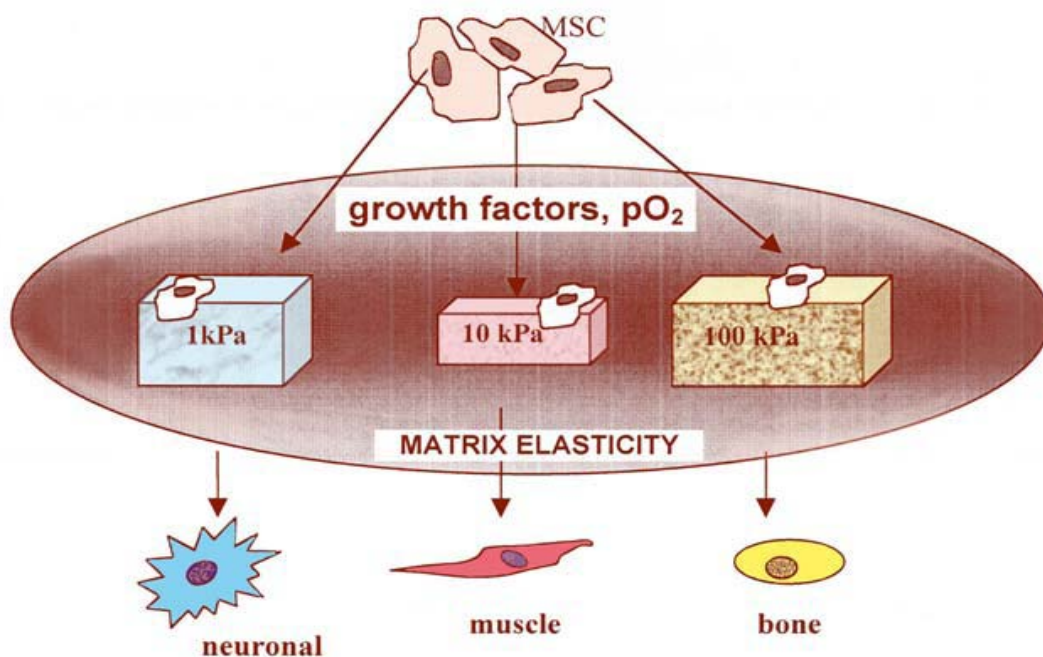


Figura 3. Il differenziamento delle MSC è influenzato dalla consistenza della matrice extracellulare circostante, che fornisce alle cellule un segnale meccanico. Come descritto da Engler et al.,²⁶ un substrato semi-solido (1kPa) può indurre l'acquisizione di un fenotipo neuronale; un substrato di rigidità intermedia (10kPa) determina l'acquisizione di un fenotipo mioblastico ed un substrato rigido (100kPa) induce il differenziamento delle MSC in osteoblasti.

Le MSC riscuotono grande interesse nel campo dell'ingegneria tissutale in quanto possono essere facilmente isolate dal midollo osseo o dal tessuto adiposo attraverso disgregazione meccanica, sono in grado di eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite ed esibiscono proprietà immunosoppressive, in condizioni ottimali mostrano una buona capacità di autoreplicazione, essendo in grado di andare incontro a 25-40 passaggi cellulari *in vitro*. Esistono tre differenti modalità di utilizzo delle MSC nell'ambito dell'ingegneria tissutale ossea: 1) è possibile seminare le cellule su scaffold ed impiantare il sistema cellule-scaffold dopo un breve periodo di incubazione *ex vivo*; 2) il sistema può essere incubato in terreno differenziante in modo da stimolare la progressione verso una specifica linea differenziativa; 3) lo scaffold può essere funzionalizzato con siti specifici per l'ancoraggio cellulare o con fattori che facilitino il reclutamento cellulare (chemiotassi) e quindi impiantato.

Eventi molecolari della riparazione ossea

Il processo di guarigione ossea è il risultato dell'attività coordinata di numerosi programmi trascrizionali che regolano l'espressione di centinaia di geni *osteoblast-specific*.²⁷ La tecnologia microarray ha permesso di eseguire l'analisi su larga scala del trascrittoma nelle diverse fasi del processo di guarigione della frattura.²⁸ Confrontando il profilo di espressione genica in femori di ratto non fratturati ed in seguito a frattura, Li et al. hanno individuato gruppi di geni differenzialmente espressi durante le fasi precoci della riparazione ossea.²⁹ Più recentemente gli stessi autori hanno anche effettuato un'analoga analisi proteomica.³⁰

I geni implicati in attività metaboliche o con funzione di trasporto e legame, risultano sovraespressi dopo 24 ore dalla frattura, momento in cui si osserva un aumento della divisione cellulare. L'analisi proteomica funzionale ha dimostrato che la fase di preparazione alla guarigione della frattura coinvolge la regolazione del ciclo cellulare e la segnalazione cellula-cellula, confermando il ruolo essenziale della comunicazione cellulare nella riparazione tissutale.³¹ I pathway di segnalazione di IGF-I, PDGF e *mitogen-activated protein kinase* (ERK/MAPK) hanno un ruolo chiave durante la fase dell'infiammazione. Quattro giorni dopo la frattura l'ematoma è invaso da cellule indifferenziate e tessuto connettivo vascolarizzato, mentre i macrofagi rimuovono i detriti ed il numero di neutrofili diminuisce. L'espressione genica, in questa fase è

caratterizzato da due gruppi di geni: al primo appartengono i geni la cui espressione aumenta progressivamente dal primo al quarto giorno. Questo gruppo è costituito da geni funzionalmente associati al processo riparativo quali IGF-I, PDGF, *fibroblast growth factor receptor* (FGFR), fibronectina, metalloproteasi di matrice, glicani, biglicani, osteomodulina, osteonectina, tenascina C, collagene di tipo I cartilagineo (tipo VI e XI), e collagene di tipo I osseo (tipo I, V, VI e XII). Al secondo gruppo appartengono geni costantemente espressi che controllano la crescita e la sopravvivenza cellulare ed hanno funzioni di legame, trasporto ed attività catalitica. Durante la fase di ossificazione diretta, che ha inizio al quarto giorno, le proteine differenzialmente espresse sono associate alla regolazione della morte cellulare, alla risposta immunitaria ed al segnale cellulare. Inoltre IL-6 risulta fortemente espresso e svolge un ruolo chiave nel coordinare i tre gruppi funzionali. Al settimo giorno si assiste all'inizio dell'ossificazione endocrale caratterizzata, a livello molecolare, dall'attivazione dei pathway di PDGF, VEGF, *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR) e, a valle, pi3k/akt (coinvolto nella sopravvivenza cellulare) mentre a livello istologico, si osserva la presenza di condrociti ipertrofici e di cellule a morfologia osteoclastica che rimuovono la cartilagine. Al termine dell'ossificazione endocrale (ventottesimo giorno) inizia la fase del rimodellamento, che vede coinvolti i pathway P13K/AKT, IGF-I, MAPK/ERK e delle integrine. Diversi *signaling pathways* sono stati riportati essere coinvolti nella modulazione del differenziamento delle MSC in senso osteogenico.³²

Wnt signaling pathway. Le proteine Wnt appartengono ad una famiglia di glicoproteine secrete, che legano i recettori transmembrana Frizzled (FZD) attivando due distinte vie di trasduzione del segnale: il pathway canonico ed il pathway non canonico di Wnt. Il primo coinvolge la formazione di un complesso tra le proteine Wnt, FZD, ed il corecettore *low density lipoprotein receptor related protein* (LRP) 5 o 6. Nel pathway non canonico, Wnt5a lega il recettore FZD ed attiva le proteine G eterotrimeriche, determinando un incremento del calcio intracellulare tramite meccanismi proteina G-dipendenti o inducendo cambiamenti Rho- o c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dipendenti nell'actina citoscheletrica.³³

Le proteine Wnt, codificate da una famiglia di 19 geni, sono coinvolte nella proliferazione cellulare, nel differenziamento e nell'apoptosi e sono cruciali nello sviluppo tissutale nell'embrione e nella rigenerazione del tessuto osseo nell'adulto.³⁴

Evidenze sperimentali affermano il ruolo importante del pathway canonico di Wnt nella formazione del tessuto osseo e nell'espressione di marcatori specifici degli osteoblasti *in vitro*.³⁵ È probabile che l'attività della β -catenina sia necessaria per l'attivazione di fattori di trascrizione specifici, come Runx2, la cui assenza nell'osteochondroprogenitore, ossia il precursore bipoteniale del lineage osteoblastico, determina inevitabilmente il differenziamento in senso condrogenico.³⁶

TGF β Signaling. La superfamiglia del TGF- β consiste di molti fattori di crescita che hanno un ruolo cruciale nello sviluppo e nel mantenimento dell'omeostasi dello scheletro. Diversi membri di questa superfamiglia, come *le bone morphogenetic proteins* (BMP), hanno potenti effetti osteogenetici. Il *signaling* della superfamiglia BMP/TGF β è trasmesso da due differenti tipi di recettori serina/treonina chinasi. Sono stati descritti:

- recettori di tipo I: recettore delle BMP di tipo IA e IB (BMPR-IA o ALK-3, e BMPR-IB o ALK-6) e recettore dell'attivina tipo IA (ActR-IA o ALK-2);
- recettori di tipo II: recettore delle BMP di tipo II (BMPR-II) e recettore dell'attivina tipo II e IIB (ActR-II e ActR-IIB).

Mentre BMPR-IA, IB e II sono specifici per le BMP, ActR-IA, II e IIB legano anche le attivine.³⁷ L'attività di BMPR-IB è necessaria per gli stadi iniziali della condrogenesi, mentre BMPR-IA regola l'induzione dell'ipertrofia condrocitica.

Le BMP trasmettono segnali tramite *pathway* Smad-dipendenti e Smad-indipendenti, che includono le vie di trasduzione ERK, JNK e p38/MAPK. Esistono tre classi di proteine Smad: 1) Smad regolate da recettore (R-Smad), che possono essere attivate da BMP (BMPR-Smad), come Smad 1, 5 e 8, o TGF β (TGFR-Smad), come Smad 2 e 3; 2) *common mediator* Smad (Co-Smads), proteine mediatrici comuni di BMP e TGF β , come Smad 4; 3) Smad inibitorie, come Smad 6 e 7.³⁸ Le R-Smad fosforilate legano il partner comune Smad-4. Tali complessi traslocano nel nucleo e regolano la trascrizione dei geni bersaglio interagendo con vari fattori di trascrizione e co-attivatori o corepressori trascrizionali. Le BMPR-Smad attivano l'espressione di *Distal-less homeobox 5* (Dlx5), che a sua volta induce l'espressione di Runx2 e Osterix (Osx) nelle cellule osteoprogenitrici. Le Smad inibitorie regolano negativamente il segnale trasmesso a monte da R-Smads e Co-Smads.³⁹ Sebbene le proteine Smad siano regolatori critici nel TGF β signaling pathway, la BMP-2 può anche attivare risposte Smad-indipendenti, che coinvolgono la via delle MAP chinasi (ERK, JNK e p38) e determinano la

regolazione dell'espressione della fosfatasi alcalina e dell'osteocalcina nelle cellule osteoblastiche.⁴⁰

FGF signaling. I polipeptidi della famiglia FGF regolano l'ossificazione endondrale e membranosa attraverso quattro recettori tirosin-chinasici correlati (Fgfr1-Fgfr4). Fgfr1 è espresso nei condrociti ipertrofici ed ha effetti stadio-specifici sulla maturazione degli osteoblasti: stimola il differenziamento dei precursori, ma arresta la maturazione degli osteoblasti differenziati.⁴¹ FGF 2, 9 e 18 interagiscono probabilmente con Fgfr1 espresso dagli osteoblasti. Sebbene FGF 9 e 18 rappresentino i mediatori predominanti durante lo sviluppo embrionale, FGF2 sembra essere il più rilevante nel periodo postnatale. Negli osteoblasti differenziati FGF2 attiva Runx2 attraverso il MAPK pathway e ha un ruolo importante nella regolazione della mineralizzazione e della formazione di osso.

L'espressione di Fgfr2 è indotta nei condrociti quiescenti ed inibita nei proliferanti. Il recettore è soggetto a splicing alternativo tessuto-specifico, che genera una variante epiteliale (forma b) ed una mesenchimale (forma c) con diverse specificità di legame. FGF18 è il ligando fisiologico di Fgfr3, che regola la crescita ed il differenziamento dei condrociti proliferanti e la densità e lo spessore corticale dell'osso.⁴²

Notch signaling. Dal momento che i recettori Notch e i loro ligandi (Delta 1, 3, 4 e Jagged 1, 2) sono proteine transmembrana, la cascata di trasduzione del segnale viene attivata in seguito all'interazione cellula-cellula. Notch 1 e Notch 2 sono espressi dagli osteoblasti, mentre Notch 3 e Notch 4 sono stati identificati in sottogruppi del *lineage* osteogenico.⁴³ Dati sperimentali sostengono la funzione dimorfica del Notch signaling, che sembra essere in grado di regolare positivamente l'espressione dei geni del differenziamento osteoblastico ed indurre osteosclerosi, ma anche di reprimere la maturazione degli osteoblasti indotta dalla BMP, inibendo l'azione transattivatrice di Runx2.⁴⁴

MAPK signaling. Le MAPK sono proteine serina/treonina chinasiche coinvolte in diversi aspetti della regolazione cellulare. Il pathway MAPK è attivato da una varietà di fattori di crescita implicati nell'osteogenesi quali FGF, PDGF, TGFβ e IGF. Gli stimoli extracellulari determinano l'attivazione di una cascata di traduzione del segnale composta da MAP chinasi, MAP chinasi chinasi (MKK o MAP2K) e MAP chinasi chinasi chinasi (MKKK o MAP3K). Studi recenti hanno messo in luce la funzione

fisiologica della cascata nel controllo dell'espressione genica, della proliferazione cellulare e della morte cellulare programmata. La cascata MAPK comprende gruppi distinti di proteine chinasi, che sono state caratterizzate nei mammiferi.⁴⁵ (Tabella I)

Tabella I

FAMIGLIA	NOME	FUNZIONE
<i>Extracellular signal-regulated kinases (ERK)</i>	ERK1, ERK2	Le ERK (note anche come MAPK classiche) sono attivate in risposta a fattori di crescita e regolano proliferazione e differenziamento cellulare.
	ERK5 (MAPK7)	Attivate sia da fattori di crescita che da condizioni di stress, sono implicate nella proliferazione cellulare.
	ERK3 (MAPK6) ERK4 (MAPK4)	MAPK atipiche. ERK3/4 sono per lo più proteine citoplasmatiche che legano, traslocano e attivano MK5 (PRAK, MAP2K5). ERK3 è noto come fattore instabile, mentre ERK4 è relativamente stabile.
	ERK7/8 (MAPK15)	Famiglie delle MAPK Nuovi membri delle MAPK, strutturalmente correlati ad ERK3/4.
<i>c-Jun N-terminal kinases (JNKs).</i>	MAPK8, MAPK9, MAPK10	Proteine chinasi attivate da stress (Stress-activated protein kinases-SAPK).
<i>Isoforme p38</i>	MAPK11, MAPK12 (ERK6), MAPK13, MAPK14	I pathway JNK e p38 rispondono a condizioni di stress quali citochine, irradiazione UV e shock termico ed osmotico, e sono coinvolti nel differenziamento cellulare e nell'apoptosi.

Fattori di trascrizione (TF). I TF guidano il commissionamento tessuto-specifico delle MSC. *Runx2*, membro della famiglia dei fattori *Runt-related*, è considerato l'interruttore molecolare chiave del differenziamento osteoblastico, media infatti l'attivazione temporale e/o la repressione di geni essenziali nel processo.⁴⁶ I membri *Runx1* e *Runx3* della stessa famiglia sono codificati da geni distinti che hanno in comune un motivo per il riconoscimento del DNA, e legano stabilmente le sequenze target in seguito ad eterodimerizzazione con la subunità ubiquitaria *Cbfb*. *Runx2* è abbondantemente espresso nella cartilagine calcificata e nell'osso. Possiede un dominio di transattivazione, ricco in residui di glutamina e alanina, che attiva i promotori di osteocalcina e collagene di tipo I (COL1A1); la sua inattivazione determina l'inibizione della formazione di osso, rivelando il ruolo essenziale del TF nell'ossificazione endondrale e diretta. Oltre ad essere espresso negli osteoprogenitori ad uno stadio precoce del differenziamento, *Runx2* è essenziale per la funzionalità degli osteoblasti. Molti TF coinvolti nella regolazione del differenziamento osteoblastico esercitano la loro funzione interagendo con *Runx2*, alcuni forniscono segnali stimolatori, altri reprimono direttamente l'attività del TF compromettendone il legame al DNA e/o la funzione di transattivazione.

La progressione del programma differenziativo delle cellule osteoprogenitrici vede implicati altri geni chiave, come *Osterix*, che codifica per un TF geneticamente 'a valle' rispetto a *Runx2*.⁴⁷ *Osterix* contiene tre domini 'zinc finger' C2H2 responsabili del legame al DNA ed un dominio di transattivazione ricco in proline e serine che determina l'attivazione dei geni *Osteocalcina* e *COL1A1*. Le MSC di topi *Osx*-null esprimono livelli normali di *Runx2*, ma non sono in grado di differenziarsi in osteoblasti e depositare matrice ossea, pertanto non si assiste alla formazione di osso (endondrale o membranosa). È interessante notare che precursori osteoblastici del periostio in cui *Osx* viene inattivato esprimono marcatori condrocitici come *Sox9* e *COL2A1*, ciò suggerisce che i preosteoblasti che esprimono *Runx2* siano ancora cellule bipotenziali e che *Osx* agisca a valle di *Runx2* nell'indurre il differenziamento osteoblastico dell'ostecondroprogenitore. È possibile che *Osx* induca una via di trasduzione del segnale che agisce parallelamente a *Runx2* o in maniera *Runx2*-indipendente. È stato inoltre dimostrato che il TF *Runx2* è necessario ma non sufficiente per l'induzione di *Osx* dipendente da *BMP2*, il pathway di *MAPK* e altri fattori trascrizionali agiscono

infatti da punti di convergenza mediando l'effetto della BMP-2 sull'espressione di *Osx*. Infine, la cooperazione tra NFAT ed *Osx* determina l'attivazione dei promotori di COL1A1 ed osteocalcina ed accelera il differenziamento osteoblastico e la formazione di osso in maniera Runx2-indipendente.

Ruolo dei fattori di crescita

I fattori di crescita (GF) sono polipeptidi che modulano le funzioni cellulari in maniera autocrina, paracrina o endocrina.⁴⁸ Un singolo GF può avere effetti su tipi cellulari multipli e può indurre risposte differenti in base al tipo cellulare sul quale agisce; tuttavia una caratteristica fondamentale del sistema di segnalazione è la ridondanza, per cui un fattore di crescita può legare recettori differenti trasducendo il medesimo segnale. I GF più rilevanti nella biologia del tessuto osseo sono BMP, TGF β , FGF, PDGF, VEGF e IGF. (Tabella 3) Come esposto precedentemente, i GF vengono prodotti e secreti durante tutte le fasi della riparazione ossea dalle cellule del microambiente, come le cellule infiammatorie, i fibroblasti, le cellule endoteliali, le MSC e gli osteoblasti. Nella fase infiammatoria il contributo maggiore proviene dai GF contenuti negli α -granuli delle piastrine (TGF β , PDGF, VEGF e IGF), mentre i macrofagi e le altre cellule infiammatorie secernono FGF, PDGF e TGF β . La migrazione degli osteoprogenitori è stimolata da BMP, PDGF, FGF e VEGF, e inoltre PDGF e FGF stimolano la proliferazione delle cellule periostali, contribuendo alla risposta mitogenica del periostio nelle fasi iniziali della riparazione.⁴⁹

La proliferazione ed il differenziamento dei progenitori sono modulati da TGF β , IGF, BMP6, BMP2 e BMP7, mentre VEGF e FGF2 regolano la crescita vascolare. Lo studio della risposta temporale dei GF nei topi durante la riparazione della frattura ha messo in luce una forte correlazione tra VEGF, TGF β e IGF-I, suggerendo che essi agiscano in maniera coordinata nella crescita degli osteoprogenitori. Una simile correlazione è stata riscontrata anche tra BMP2, PDGF e FGF2, e tra TGF β e PDGF.⁵⁰

Le BMP (ad eccezione della BMP1) appartengono alla superfamiglia del TGF β , sono immagazzinate nella ECM e vengono sintetizzate principalmente da cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e condrociti⁵¹. Anche altri tipi cellulari possono produrre tali proteine, come le cellule endoteliali che esprimono BMP2⁵².

Osteoblasti e condrociti maturi producono livelli significativi di BMP durante il processo di riparazione della frattura⁵³ ed è indotta da diversi stimoli, tra cui lo stress meccanico generato a livello dei siti di formazione di nuovo tessuto osseo.⁵⁴ Sebbene le BMP siano funzionalmente e strutturalmente correlate, ogni isoforma ha un ruolo unico e un distinto quadro di espressione temporale durante il processo di riparazione ossea⁵⁵. Le BMP inducono la cascata di eventi che determina l'osteogenesi e che coinvolge chemotassi, proliferazione, differenziamento, sintesi della matrice extracellulare ed angiogenesi. BMP2 e 4 vengono espresse sin dalle fasi precoci del differenziamento delle MSC e, avendo un'azione chemioattraente, richiamano i precursori mesenchimali durante lo sviluppo osseo, il rimodellamento e la riparazione delle fratture. VEGF coopera con BMP4 nel reclutare i precursori osteoblastici.⁵⁶ BMP2, 6 e 9 stimolano il differenziamento delle MSC pluripotenti in cellule osteoprogenitrici, e BMP2, 4, 6, 7 (osteogenic protein-1, OP-1) e 9 ne inducono la maturazione terminale in osteoblasti. BMP2 determina la sovraespressione di Runx2 e Osterix nelle fasi precoci del differenziamento,⁵⁷ ed aumenta l'espressione di fosfatasi alcalina (ALP) ed osteocalcina e la deposizione del calcio nelle fasi successive (come BMP4, 7 e 9). La maggior parte delle BMP sono inoltre capaci di indurre il differenziamento degli osteoblasti in osteociti. BMP13 e 14 stimolano il differenziamento condrocitico.^{58, 59} BMP2-BMP7 e BMP9 sono capaci di indurre la formazione ossea de novo in seguito ad impianti ectopici.⁶⁰ L'attività osteoinduttiva di BMP3 dipende dalle condizioni sperimentali e dallo stadio differenziativo, essa può avere infatti un effetto inibitorio in presenza di BMP2 e BMP7.⁶¹ Inoltre le BMP sono in grado di stimolare la sintesi di altri GF quali IGF e VEGF,⁶² e di indurre il rilascio di fattori che promuovono l'osteoclastogenesi.⁶³

Fino ad oggi sono state identificate 5 isoforme del TGF β (TGF β 1-TGF β 5).

TGF β 1 e TGF β 2 vengono immagazzinati nella ECM e nel sangue in una forma inattiva complessata alla proteina di legame TGF β -binding protein-1. TGF β 1 è stato rilevato in osso, cartilagine e α -granuli piastrinici, ma è prodotto da diversi tipi cellulari, come i fibroblasti, i macrofagi e le cellule endoteliali; mentre TGF β 2 è prodotto essenzialmente da osteoblasti e cellule endoteliali. Durante il processo di guarigione ossea TGF β ha un ruolo rilevante nella condrogenesi e nell'ossificazione endondrale.⁶⁴ TGF β 1 induce la sintesi di BMP nelle cellule osteoprogenitrici, recluta i precursori osteoblastici, stimola

il differenziamento ed induce la produzione di osteoide e proteine extracellulari quali collagene, proteoglicani, osteopontina, osteonectina e ALP.⁶⁵ L'effetto sul differenziamento terminale e sulla mineralizzazione è tuttavia inibitorio⁶⁶ ed il potenziale osteoinduttivo risulta limitato.⁶⁷ TGF β 1 è un importante fattore di accoppiamento tra osteoblasti ed osteoclasti:⁶⁸ da un lato favorisce il reclutamento dei precursori ematopoietici degli osteoclasti,⁶⁹ dall'altro ha un effetto inibitorio sul riassorbimento osseo e stimola la produzione di osteoprotegerina.⁷⁰

Gli FGF sono una famiglia di 24 polipeptidi strutturalmente correlati, che stimolano la proliferazione di osteoblasti, condrociti, miociti e cellule endoteliali. FGF1 e FGF2, i più abbondanti, sono stati identificati nelle fasi precoci del processo di guarigione ossea. Il primo ha un ruolo rilevante nella maturazione dei condrociti;⁷¹ il secondo è sintetizzato dagli osteoblasti, viene immagazzinato nella ECM e stimola la proliferazione ed il differenziamento osteoblastico. FGF2 induce Runx2⁷² e osteocalcina⁷³ e favorisce la formazione di noduli minerali;⁷⁴ inibisce l'apoptosi degli osteoblasti immaturi, mentre stimola l'apoptosi degli osteociti;^{75,76} regola

l'osteoclastogenesi in maniera indiretta, tramite meccanismi mediati dagli osteoblasti, ed in maniera diretta, agendo sui pathway di segnalazione di RANKL, cicloossigenasi-2 e p42/p44 MAPK.⁷⁷ Esso possiede inoltre un effetto proangiogenetico che si accompagna ad un'induzione dell'osteoclastogenesi e quindi, ad una maggiore attività di riassorbimento.⁷⁸

Il PDGF è secreto come dimero composto da diverse combinazioni delle catene A, B, C e D. È presente negli α -granuli delle piastrine, nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e negli osteoblasti.⁷⁹ Durante le fasi precoci della guarigione della frattura è rilasciato dagli α -granuli,⁸⁰ mentre in seguito viene secreto dalle cellule presenti nel sito di riparazione, ed agisce in un primo momento sulla proliferazione e successivamente sul differenziamento degli osteoprogenitori. PDGF-BB è generalmente considerato più efficace di PDGF-AA nello stimolare l'attività mitogena nel tessuto osseo.⁸¹

Il VEGF è prodotto dalle cellule endoteliali e dagli osteoblasti e, nelle fasi precoci della rigenerazione ossea, è anche rilasciato dagli α -granuli piastrinici. Sebbene l'induzione dell'angiogenesi sia l'effetto più conosciuto del VEGF, esso ha un ruolo importante anche nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule ossee.⁸² È coinvolto nella conversione della cartilagine in callo osseo durante la fase riparativa⁸³ e determina un

aumento del numero degli osteoblasti.⁸⁴ VEGF inoltre favorisce l'osteoclastogenesi inducendo l'espressione di RANK nei precursori degli osteoclasti.⁸⁵

Sono stati identificati due Insulin-like Growth Factor: IGF-I o somatomedina C e IGF-II. La concentrazione sierica di IGF-I è regolata principalmente dall'ormone della crescita, mentre le sue azioni biologiche sono modulate in maniera cellulo specifica dal legame con le IGF-binding protein.

IGF-I è prodotto principalmente dalle cellule del fegato in risposta all'ormone della crescita, ma viene anche sintetizzato da cellule endoteliali, osteoblasti e condrociti e viene immagazzinato nella matrice cellulare. I tessuti bersaglio del fattore di crescita sono muscolo, cartilagine, osso, fegato, reni, nervi, pelle e polmoni. Sebbene IGF-II sia più abbondante nel tessuto osseo rispetto a IGF-I, quest'ultimo ha un effetto più potente e la sua presenza è stata rilevata in fratture in fase di guarigione.⁸⁶ Nelle prime fasi della riparazione ossea IGF-I stimola la proliferazione cellulare⁸⁷ e promuove la formazione della matrice ossea da parte degli osteoblasti differenziati.⁸⁸ IGF-II agisce negli stadi tardivi dell'ossificazione encondrale, stimola la produzione di collagene di tipo I, la sintesi della matrice cartilaginea e la proliferazione cellulare.⁸⁹ IGF ha un ruolo rilevante nell'equilibrio tra formazione e riassorbimento osseo.⁹⁰

Ingegneria tissutale in Ortopedia

L'ingegneria tissutale si occupa della progettazione di nuove terapie cellulari per il trattamento di alcune delle malattie fortemente debilitanti come osteoporosi, diabete e malattia di Alzheimer.²⁸

Negli ultimi vent'anni l'obiettivo è stato quello di riuscire a mimare, *in vitro*, la complessità dei tessuti biologici, a livello macromolecolare ed ultrastrutturale e sulla possibilità di utilizzare cellule, fattori e costrutti allo scopo di generare tessuti ed organi in laboratorio. Malgrado i notevoli progressi scientifici ottenuti nei diversi campi è necessario superare alcuni limiti come la disponibilità di un numero consistente di cellule, lo sviluppo di polimeri adatti migliorandone la stabilità meccanica e funzionale, la vascolarizzazione dell'impianto e la modulazione della risposta immunitaria all'impianto stesso. Numerose strategie sono state sviluppate per superare questi problemi e migliorare l'efficacia degli approcci di ingegneria tissutale, come l'utilizzo

di fattori di crescita ricombinanti negli scaffold, l'utilizzo di cellule autologhe e la terapia genica.

In Ortopedia, le tecnologie del trapianto osseo e dell'ingegneria tissutale hanno l'obiettivo di influenzare l'attività degli osteoblasti stimolando la rigenerazione scheletrica per il trattamento dei difetti ossei, di origine congenita o acquisita come ad esempio eventi traumatici, osteoporosi o tumori. La tecnica del trapianto osseo è stata utilizzata a lungo e svolge un ruolo importante nelle moderne tecniche chirurgiche di ricostruzione del tessuto osseo. Esistono comunque complicazioni e limitazioni associate a questo tipo di approccio. L'ingegneria tissutale è la scienza che si pone l'obiettivo di superare tali limiti ed è definita come un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della scienza della vita attraverso lo sviluppo di sostituti biologici che consentano di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni tissutali.⁹¹

In campo ortopedico gli eventi traumatici, l'osteoporosi, le neoplasie, le malformazioni congenite, possono portare a grandi perdite di sostanza ossea. Il trattamento chirurgico per la cura dei grandi difetti ossei prevede due possibilità, l'innesto di osso, autologo o allogenico, o l'impiego di costrutti ingegnerizzati. L'osso autologo rappresenta una soluzione sicura per la compatibilità e l'assenza di risposta immunitaria, ma anche disagiata poiché è richiesto un secondo intervento e presenta un rischio di morbidità associato al prelievo. Inoltre è spesso difficile sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione della porzione mancante, e la qualità dell'osso recuperato non consente buoni risultati al reimpianto. Per quanto riguarda l'osso allogenico, la crescente diffusione di banche dell'osso consentono un maggiore utilizzo di innesti di tale tipo, che però molto spesso sono soggetti a scarso rimodellamento e insufficiente rivascularizzazione, funzionando quindi da mero supporto. Inoltre, non sono da sottovalutare anche problematiche quali il rigetto e il rischio di infezioni legato all'impianto di tessuti di origine omologa.

L'ingegneria tissutale rappresenta l'alternativa ai metodi tradizionali, e, due diverse strategie sono emerse come approcci promettenti: la *tissue engineering* e la *in situ tissue regeneration*. Il primo prevede la semina e il differenziamento di MSC autologhe su scaffold e l'impianto del sistema cellule-scaffold dopo un breve periodo di incubazione *ex vivo*; i costrutti ingegnerizzati, una volta

reimpiantati nel paziente, dovrebbero essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso. Le applicazioni cliniche già in uso comprendono cartilagine, cute e sistema vascolare. La *in situ tissue regeneration* prevede la funzionalizzazione degli scaffolds con siti specifici per l'ancoraggio cellulare o con fattori che facilitino il reclutamento cellulare (chemiotassi) promuovendo la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare, come le BMPs, possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione o frammentazione del supporto. A seconda della tecnica di ingegneria tissutale applicata si distinguono: sistemi acellulari, sistemi cellulari e terapie con fattori e geni. Nei primi (matrix-based approaches), le componenti chimiche e strutturali dello scaffold giocano un ruolo predominante per la corretta riparazione. Relativamente al tessuto scheletrico, pori e interconnessioni devono necessariamente essere di dimensioni tali da consentire vitalità e funzioni di cellule ossee, cellule vascolari e tessuto osteoide. I supporti devono essere inoltre biodegradabili nei tempi appropriati, parallelamente alla rigenerazione ossea in situ, senza generare prodotti tossici. La creazione di sistemi cellulari (cell-based therapies) prevede la raccolta di cellule dal sito donatore, la semina sul supporto, l'induzione della proliferazione e del differenziamento cellulare e infine il trapianto del costruito così ingegnerizzato. Al fine di ottenere un'efficace e stabile riparazione occorre ottenere un numero adeguato di cellule o tessuto per riempire il difetto, nonché mantenere il corretto fenotipo cellulare. Le cellule, quindi, dovrebbero organizzarsi in strutture tridimensionali e produrre matrice extracellulare, in modo da ottenere in tempi adeguati una piena integrazione locale con il tessuto ospite e la vascolarizzazione del tessuto neoformato.

Infine, le *factor-based therapies* consistono nell'associare al sistema scaffold/cellule uno stimolo osteoinduttivo. Il primo esempio è stato l'uso della *demineralized bone matrix* (DBM) e successivamente delle BMPs purificate. Gli aspetti complessi di questa tecnica comprendono la difficoltà di legare in modo funzionale i fattori a molecole di trasporto o ai supporti, ma anche quella di modularne in maniera efficace l'emivita e il rilascio graduale.

Altro approccio è rappresentato dalle *gene o cell therapies* che si basano sull'impiego di vettori, virali e non, per il trasferimento di materiale genetico a cellule che verranno poi impiantate. Studi preclinici hanno dimostrato la maggiore efficacia delle BMPs

mediante questo tipo di approccio, poiché è possibile mantenere la loro espressione a livelli idonei per un periodo di tempo più lungo rispetto al rilascio diretto della proteina.^{92, 93} Le cellule ingegnerizzate diventano quindi semplici carrier dei geni appropriati e producono il fattore osteoinduttivo. Questo approccio comporta inevitabilmente un alto rischio di trasmissione di vettori patogeni.

L'ingegneria tissutale si propone di utilizzare biomateriali con sempre più elevata capacità di integrazione, con proprietà meccaniche molto simili all'osso nativo e con cinetiche di riassorbimento controllate. Tali biomateriali devono inoltre presentare una serie di proprietà atte ad indurre nella cellula una specifica risposta che stimoli l'osteogenesi e l'angiogenesi. Per l'impiego in clinica è inoltre auspicabile la disponibilità di materiali modellabili in fase pre-operatoria o durante la seduta operatoria, secondo le necessità anatomiche dell'intervento.

Approccio cellulare per applicazioni di ingegneria tissutale in ortopedia

La rigenerazione del tessuto osseo è mediato dall'azione di osteoprogenitori e dei loro precursori, le MSC. Come menzionato in precedenza, la mancanza di uno specifico marcatore di membrana ha determinato la mancanza di chiarezza nella definizione di osteoprogenitori mesenchimali. L'importanza di questa popolazione cellulare per applicazione di ingegneria tissutale ha determinato un crescente interesse nel trovare una tecnica di selezione per le MSC.⁹⁴ Infatti, colture di MSC sottoposte ad espansione *ex vivo* hanno mostrato un eccellente potere di riparazione in modelli animali⁹⁵ e la loro sicurezza in studi clinici di coorte per la cura di osteogenesi imperfetta^{96, 97} ed osteonecrosi della testa del femore è stata soddisfacente^{98, 99}. Tuttavia il passaggio da studi pilota alla pratica clinica rappresenta ancora una scommessa che riguarda soprattutto l'ottimizzazione delle condizioni di coltura delle MSC prima del trapianto⁹⁴. Il dibattito rimane aperto sulla densità di semina delle MSC, l'utilizzo di *Fibroblast Growth factor* (FGF-2) e la bassa tensione di ossigeno, oltre che i tempi di aggiunta di acido ascorbico, desametasone e b-glicerofosfato al mezzo di coltura, riconosciuti come additivi in grado di indurre il differenziamento osteogenico di precursori mesenchimali umani. Per riparare grandi difetti ossei, è necessario ottenere un numero consistente di MSC, per questo motivo l'attenzione è stata rivolta all'identificazione di nuove sorgenti di MSC come ad esempio il tessuto adiposo e la polpa dentale. Tuttavia MSC isolate da

questi tessuti hanno mostrato un basso potere osteogenico. Un altro interessante aspetto riguarda lo sviluppo di scaffold seminati con MSC precedentemente differenziate o con MSC in combinazione con cellule endoteliali ^{100, 101, 102}.

Effetto di induttori del differenziamento osteogenico su colture di cellule mesenchimali staminali (MSC)

Obiettivo dello studio

Le MSC rappresentano una promessa per le applicazioni di ingegneria tissutale, la medicina rigenerativa e la terapia cellulare, grazie alle loro caratteristiche di autorigenerarsi e di differenziare in diverse filiere cellulari. Il numero di tessuti ed organi che possono rappresentare una sorgente di MSC è aumentato nel corso del tempo e rende le applicazioni cliniche più realizzabili. Una delle ragioni della discrepanza tra il numero degli studi sperimentali ed il piccolo numero delle applicazioni cliniche è la necessità di rendere più sicuri i protocolli di espansione delle MSC *in vitro* in modo da ottenere un numero consistente di precursori mantenendo, però, il loro stato indifferenziato¹⁰³. La senescenza replicativa, determinata dal mantenere in coltura le cellule per molti passaggi, così come la perdita della multipotenza, che determina il commissionamento delle cellule, rappresentano le principali ragioni che limitano l'espansione in colture delle MSC prima del trapianto^{104, 105}. Per queste ragioni sono stati pubblicati diversi lavori che descrivono le procedure di espansione di MSC indifferenziate prima di vederle impiegate in applicazioni di terapia cellulare¹⁰⁶. Allo scopo di studiare le caratteristiche delle MSC, come ad esempio, la proliferazione, il differenziamento il profilo di espressione genica e la caratterizzazione fenotipica è necessario utilizzare, *in vitro*, un numero consistente di MSC. Per applicazioni di ingegneria tissutale in campo ortopedico, è necessario utilizzare biomateriali con proprietà osteoconduttive. Sono definiti supporti osteoconduttivi i biomateriali che hanno la capacità di creare un supporto strutturale alla neo formazione di tessuto osseo, con un processo di neo angiogenesi e di migrazione di cellule mesenchimali differenziate in senso osteogenico. Allo scopo di promuovere il processo di guarigione di una frattura i biomateriali sono impiantati con o senza cellule precedentemente seminate. La coltura *in vitro* di MSC e la loro semina su scaffold da saggiare *in vitro* per future applicazioni cliniche rappresentano i primi passi per la creazione di uno scaffold che sia in grado di supportare la rigenerazione ossea. Le condizioni per la coltura *in vitro* delle MSC sono state studiate in maniera dettagliata e un largo accordo è stato

trovato sulla scelta del tipo di terreno, siero e additivi da utilizzare per l'induzione di un fenotipo mesenchimale ¹⁰⁷.

Allo scopo di indurre il differenziamento osteogenico è richiesta una soluzione di additivi chimici che include acido ascorbico, desametasone e β -glicerofosfato ¹⁰⁸ anche se è stata documentata la capacità delle cellule mesenchimali di differenziarsi in senso osteoblastico in seguito all'adesione ai supporti utilizzati in laboratorio per la coltura e l'espansione delle MSC ^{109, 110}. Sottoponendo le MSC ad un pretrattamento di tre settimane con desametasone è stata dimostrata una induzione della formazione di tessuto osseo *in vivo* ¹¹¹, mentre l'acido ascorbico sembra determinare un aumento della proliferazione senza determinare una perdita della multipotenza ¹¹². Malgrado il generale accordo raggiunto sulle tecniche di coltura delle MSC, in letteratura c'è ancora una complessiva discrepanza che riguarda l'effetto dell'aggiunta di fattori allo scopo di promuovere la proliferazione ed il differenziamento e del tempo di esposizione delle cellule agli stessi ^{113, 114, 115}. Inoltre una migliore conoscenza dei cambiamenti a cui le MSC sono potenzialmente sottoposte durante l'espansione *in vitro* potrebbe aiutare nella definizione di nuovi protocolli di espansione in accordo ad una definita applicazione, in campo clinico o sperimentale, minimizzando il rischio di contaminazione e di senescenza replicativa in seguito all'espansione *in vitro*.

In questo studio è stato elaborato un protocollo sperimentale *in vitro* per analizzare la risposta delle MSC ai più comuni additivi riconosciuti come induttori del differenziamento osteogenico, acido ascorbico, desametasone e β -glicerofosfato.

Lo scopo di questo studio è quello di analizzare il protocollo di espansione *in vitro* di MSC attualmente in uso per l'induzione del differenziamento osteogenico esaminando i cambiamenti morfologici, biochimici e nel profilo di espressione genica di cellule stromali derivate dal midollo osseo nel corso del processo di commissionamento. Inoltre il lavoro si propone di individuare il ruolo dei diversi additivi utilizzati singolarmente o in combinazione, nel corso del differenziamento. Le MSC utilizzate in questo lavoro sono state isolate dal canale femorale di pazienti sottoposti ad intervento di artroprotesi d'anca.

MATERIALI E METODO

Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti con cellule staminali stromali umane ottenute da prelievi di midollo osseo da canale femorale di pazienti sottoposti ad intervento primario di protesi d'anca. La raccolta di tessuto è stata approvata dal comitato etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. I campioni sono stati prelevati da quattro pazienti informati e consenzienti, due uomini e due donne di età compresa tra i 64 e i 73 anni. Il prelievo è stato raccolto in terreno di coltura *alpha modification of Eagle's medium* (α -MEM; Sigma-Aldrich) addizionato con eparina sodica 100 U/ml, stratificato su Ficoll Istopaque 1077 (Sigma Aldrich, Milano) e centrifugato a 2000 rpm per 20'. L'anello di cellule mononucleate, che si trova all'interfaccia tra le fasi organica e acquosa, contenente le cellule mesenchimali (MSC), è stato raccolto e lavato due volte con PBS; il pellet ottenuto è stato risospeso in α -MEM addizionato di FBS (*Fetal Bovine Serum*) al 10%, penicillina 100U/ml, streptomicina 0.1mg/ml e mantenute in coltura in atmosfera umida (in incubatore a 37°C al 5% di CO₂). Le cellule sono state mantenute in coltura per quattro giorni, al termine dei quali (T0) sono state rimosse le cellule non aderenti mentre le cellule aderenti sono state mantenute in terreno in α -MEM addizionato al 10% FBS, penicillina 100U/ml, streptomicina 0.1mg/ml, sostituendo il mezzo di coltura ogni tre o quattro giorni; ad ogni cambio di terreno è stato sostituito soltanto il 50% del volume, per apportare nutrienti freschi alle cellule senza deprivarle di eventuali molecole segnale secrete dalle cellule in coltura. Al raggiungimento della prima confluenza (70-80% della superficie della fiasca, T1), sono state allestite le quattro colture parallele per testare l'effetto di diverse di additivi. I diversi trattamenti sono stati così codificati:

- C1** α -MEM+ 10% FBS
- C2** α -MEM+ 10% FBS+ ascorbato (50 mg/L)
- C3** α -MEM+ 10% FBS+ ascorbato (50 mg/L)+ desametasone (10^{-8} M)
- C4** α -MEM+ 10% FBS+ ascorbato (50 mg/L)+ desametasone(10^{-8} M)+ β -glicerofosfato (2,5g/L)

A tempi stabiliti le cellule sono state contate, sono stati effettuati saggi biochimici e morfologici ed è stato estratto l'RNA totale dalle cellule nelle diverse condizioni di coltura allo scopo di correlare l'acquisizione del fenotipo osteogenico con il caratteristico profilo di espressione genica. Queste analisi sono state effettuate ad ogni passaggio. Le cellule sono state mantenute in coltura nelle specifiche condizioni riportate precedentemente, per 14 giorni dal T1 o fino al raggiungimento della seconda confluenza (T2) ed è stata, infine, saggiata la capacità di formare noduli minerali

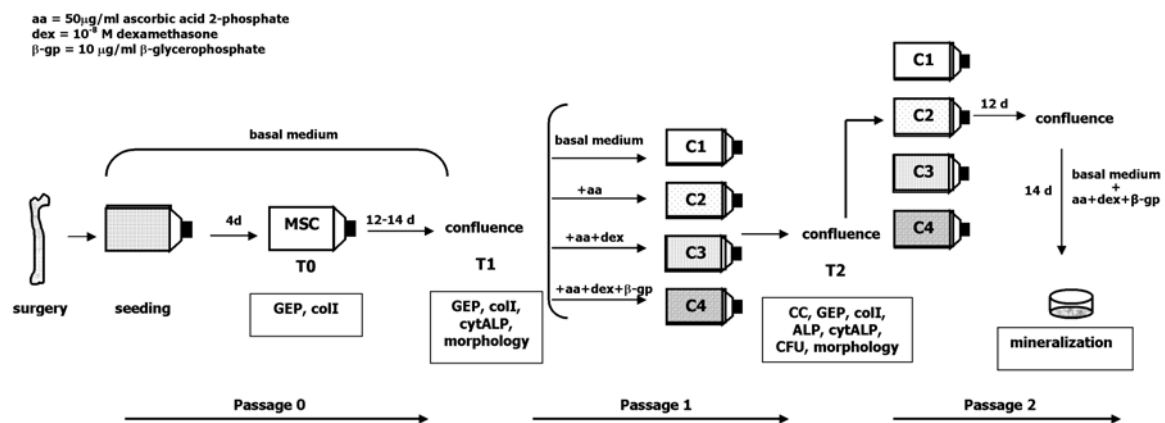


Figura 4: diagramma del protocollo di coltura delle MSC per la valutazione del differenziamento osteogenico: T0: 4 giorni dopo la semina; T1: prima confluenza (70-80%); T2: seconda confluenza. Saggi eseguiti ai diversi tempi: CC, conta cellulare; Morfology: colorazione con arancio di Acridina, citometria a flusso; ALP, fosfatasi alcalina; cytALP, espressione citochimica della fosfatasi alcalina; colI, collagene di tipo I; CFU, formazione di colony-forming units; GEP, profilo di espressione genica.

Caratterizzazione delle colture cellulari

Al fine di caratterizzare le MSC e di valutare l'effetto dei diversi additivi aggiunti al medium di coltura sul differenziamento in senso osteogenico, le cellule, ai tempi indicati nel diagramma, sono state raccolte ed impiegate per effettuare i seguenti test:

- Arancio di acridina per l'osservazione della morfologia cellulare
- Efficienza clonale
- Attività della fosfatasi alcalina (ALP)
- Espressione citochimica di fosfatasi alcalina
- Test immunoenzimatici per la quantificazione del collagene di tipo I nei lisati cellulari a tutti i tempi
- Valutazione della capacità di deposizione di noduli minerali (Von Kossa staining)
- Analisi dell'espressione genica tramite *Real time* PCR, per analisi quantitativa dei geni del differenziamento

Arancio di Acridina

Per evidenziare eventuali variazioni della morfologia cellulare in risposta al differenziamento, le cellule da testare, sono state seminate in chamber slide in permanox® da 8 pozzetti alla concentrazione di 5000 cells/cm². Raggiunta la confluenza sono state lavate con PBS, fissate con paraformaldeide al 3,7% per 20 minuti a temperatura ambiente ed incubate con la soluzione A (92 ml di H₂O distillata + 8 ml di HCl 1M + 0.1 ml di Triton X-100 + 0.87 g di NaCl) per 15 secondi a cui è stata aggiunta in proporzione 1:3 la soluzione B (37 ml di acido citrico 0.1M + 63 ml di Na₂HPO₄ 0.2M + 0.87 g di NaCl + 34 mg di EDTA sale disodico) addizionata al momento dell'uso con arancio di acridina, nella proporzione 0,6 ml in 100 ml di soluzione B, per 10 minuti al buio. Successivamente è stato aspirato il surnatante e le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza.

Efficienza clonale

Il test delle CFU (*Colony-Forming Units*) è stato utilizzato per stimare l'abilità clonogenica dei precursori osteogenici. In breve, le cellule confluenti al T2, per ciascuna condizione, sono state sottoposte a digestione con tripsina e seminate alla densità di 140 cellule/cm² in fiasche da 25 cm², utilizzando il terreno specifico per ciascuna condizione. Dopo circa 12 giorni, le cellule sono state trattate con crystal violetto (0,25% in metanolo al 20% per 10 min a temperatura ambiente), un colorante basico che si lega alle membrane cellulari, e gli aggregati di almeno 50 cellule, visualizzati e contati al microscopio. La formazione di colonie è un indice dello stadio differenziativo della coltura: cellule più differenziate perdono in parte la capacità replicativa e quindi formano un minor numero di colonie. La caratterizzazione delle CFU è stata effettuata attraverso l'analisi citochimica dell'ALP e la successiva conta delle colonie ALP positive formatesi.

Quantificazione della fosfatasi alcalina intracellulare

La fosfatasi alcalina è stata valutata come marcatore del differenziamento osteogenico. La concentrazione di fosfatasi alcalina cellulare è stata determinata, al T2, sul lisato cellulare. L'attività dell'ALP è stata misurata con un metodo biochimico basato sulla conversione *del p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate* (Sigma-Aldrich) in p-nitrofenolo. Le cellule sono state lisate con SDS allo 0,01% ed il substrato della reazione (p-nitrofenilfosfato) è stato aggiunto in proporzione 1:1 ai lisati cellulari. Dopo un'incubazione di 15 minuti a 37°C, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei campioni a 405 nm, utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre (Spectra III, Tecan, Austria). L'attività della ALP è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza su una curva standard costituita da diluizioni seriali di una soluzione di p-nitrofenolo (range di concentrazione 0-40 mmoli). I risultati sono stati espressi come nmoli di p-nitrofenolo formato in 1 min e normalizzati per il quantitativo totale di proteine (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL). L'analisi citochimica della ALP è stata effettuata sulle cellule utilizzando un kit commerciale (Sigma-Aldrich).

Test citochimico della fosfatasi alcalina

Raggiunta la confluenza le cellule da testare, sono state seminate in chamber slide in permanox® da 8 pozzetti alla concentrazione di 5000 cells/cm². Le stesse sono state lavate con PBS ed incubate con una miscela di colorazione per ALP fornita dal kit SIGMA, a base di naphthol AS-BI (SIGMA, Diagnostic, 86-R) per 15' a temperatura ambiente. Quindi sono state lavate con PBS e osservate al microscopio per verificare l'avvenuta colorazione rossa. Il campione viene considerato positivo se il 50% delle cellule assumono la colorazione rossa.

Quantificazione del collagene di tipo I: test immunoenzimatico (ELISA)

Il collagene di tipo I è stato quantificato nei surnatante delle MSC, a diversi tempi e trattamenti, utilizzando il metodo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Il saggio, di tipo "sandwich", è stato effettuato mediante un kit commerciale (Metra CICP EIA) contenente stripwell rivestite con un anticorpo monoclonale che riconosce il propeptide C-terminale del collagene di tipo I (CICP), peptide escisso dalla molecola precursore al momento dell'incorporazione del collagene di tipo I in una fibrilla. Standard e campioni sono stati analizzati in doppio e, al termine di ogni incubazione, la piastra è stata sottoposta a tre lavaggi (Multiwash, PBI, Italia) con apposito buffer (300 µl). Sono stati dispensati 100µl in ciascun pozzetto: i campioni diluiti 1:50 e gli standard in un range di concentrazione compreso tra da 0 a 80ng/ml, per ottenere una curva di riferimento. La prima incubazione è stata di due ore a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 100µl di anticorpo anti-CICP di coniglio e la miscela è stata incubata per 50 minuti a temperatura ambiente. Per la rivelazione sono stati aggiunti 100µl di coniugato enzimatico costituito da un anticorpo di capra anti-coniglio con fosfatasi alcalina e la piastra è stata mantenuta a temperatura ambiente per 50 minuti. Infine, 100µl di substrato attivo, a base di paranaftolo, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e lasciati in incubazione per 35 minuti. Al termine di questa fase, la reazione è stata fermata con soluzione bloccante, a base di NaOH 1 N. La piastra è stata poi letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Mineralizzazione

La capacità di depositare noduli minerali è stata valutata tramite l'utilizzo di due diversi metodi: colorazione di von Kossa e con rosso di alizarina. Le MSC sono state seminate in fiasche da 25 cm², alla densità di 5000 cellule/cm² in α .MEM+10% FBS + 1% penicillina/streptomicina con l'aggiunta dei diversi additivi per le quattro diverse condizioni di coltura. Al raggiungimento della confluenza il terreno di coltura è stato sostituito con terreno mineralizzante costituito da α -MEM + 10%FBS + 1% penicillina/streptomicina + acido ascorbico (50 mg/l) + desametasone (10⁻⁸M) + β -glicerofosfato (10 mM). Dopo circa 14 giorni, per la colorazione di Von Kossa le cellule sono state fissate per 5 minuti con metanolo freddo ed incubate con nitrato d'argento al 2% sotto luce ultravioletta per 15 min. Infine, le cellule sono state fissate con sodio tiosolfato al 2.5% (Sigma-Aldrich) per 5 min e contrastate con safranina all'1%. Con questa colorazione si evidenziano precipitati di calcio carbonato e calcio fosfato trattati con nitrato di argento e contrastati con safranina o rosso neutro. Per la colorazione con rosso neutro le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3.7 % in PBS per 20 minuti, incubate con rosso alizarina 40 mM a pH 4.2 per un'ora a temperatura ambiente e successivamente, lavate con H₂O ed osservate al microscopio ottico. La colorazione con rosso di Alizarina evidenzia in rosso i noduli legandosi ai precipitati di calcio

CARATTERIZZAZIONE GENICA

Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule è stata effettuata ai tempi T0, T1 e T2 utilizzando, il kit RNasy Mini kit (Quiagen GmbH, Hilden Germany), seguendo il protocollo di estrazione specifico per le cellule animali. L'eluizione finale è stata effettuata utilizzando 30 µl di H₂O DEPC (diethylpirocarbonato). La concentrazione dell'RNA è stata determinata mediante lettura con lo spettrofotometro a 260 nm e 280 nm. Una *ratio* A₂₆₀/A₂₈₀ fra 1.7 e 2.0 depone per un RNA sufficientemente puro.

Retrotrascrizione dell'RNA

La trascrizione inversa dell'RNA totale è stata eseguita utilizzando il Gene Amp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystem, Roche). Ad una quantità di RNA totale pari ad 1 µg sono stati aggiunti MgCl₂ 5mM, PCR Buffer 1x, dGTP, dATP, dTTP e dCTP 1 mM, Oligo dT 2.5 µM, Rnase Inhibitor 1U/µl e MuLV Reverse Transcriptase 2.5 U/µl, per un volume finale di 20 µl. In un secondo momento il campione è stato sottoposto a fasi successive di incubazione: a temperatura ambiente per 10', a 42°C per 15', a 99°C per 5' ed a 4°C per 5'. Ogni cDNA ottenuto è stato analizzato mediante lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm, al fine di determinarne sia la concentrazione che la qualità. Il valore indicativo di una buona qualità del cDNA è infatti una *ratio* A₂₆₀/A₂₈₀ pari a 1,8. I campioni sono stati conservati a -20 °C fino al momento dell'uso.

Real time PCR

La *real time* PCR è stata eseguita mediante l'utilizzo dello strumento Light Cycler e il sistema Universal Probe Library (Roche Applied Science, Monza, Italy). I primers e le sonde per ogni saggio sono state selezionate utilizzando un software reperibile in rete chiamato Probe Finder (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/center.jsp?id=030000>), mentre il saggio migliore per ciascun gene è stato confermato utilizzando Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabella1). Ciascun cDNA (1 µg) è stato amplificato e il corrispondente ciclo soglia è stato riferito ad una curva standard. Il gene housekeeping, GAPDH, è stato usato come riferimento per normalizzare i dati della real time PCR, i quali sono stati espressi come *ratio* di cDNA analizzato e cDNA di riferimento.

Gene	ID number	Primer sequence (5'-3')		Probe	Detection limit (μg)
GAPDH	(NM_002046.3)	Sense	agccacatcgctcagacac	#60	$3e^{-12}$
		Antisense	gcccaatacgaccaaattcc		
RUNX2	(NM_001024630.2, NM_004348.3)	Sense	gtgcctaggcgcatttca	#87	$2.7e^{-11}$
		Antisense	cacctgcctggctcttctta		
ALP L	(NM_000478.3)	Sense	gggtcagctccaccacaa	#52	$2.1e^{-11}$
		Antisense	gcattgggtgtgtacgtcttg		
COL1A1	(NM_000088.3)	Sense	cccctggaaagaatggagat	#60	$3.7e^{-13}$
		Antisense	aatcctcgagcacctga		
OC	(NM_199173.2)	Sense	ggcgtacctgtatcaatgg	#1	$4e^{-12}$
		Antisense	tcagccaactcgtcacagtc		
OSTERIX	(AF477981.1)	Sense	catctgcctggctccttg	#69	$2.7e^{-11}$
		Antisense	caggggactggagccata		

Tabella 2. Lista dei primers e delle sonde selezionate per analizzare l'espressione dei geni del differenziamento osteogenico delle cellule

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata usando il software StatView 5.01 per Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC). I risultati sono stati riportati come media dei campioni \pm errore standard. Per l'analisi dei dati cellulari al T2, abbiamo utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney, per dati non appaiati. Le variazioni della gene expression sono state analizzate, utilizzando il Wilcoxon test, un'analisi non parametrica per dati appaiati; sono stati confrontate le variazioni nel tempo tra gli

endpoint T0/T1 e T1/T2, come anche gli effetti dei diversi trattamenti al T2. Sono stati considerati significativi valori di p inferiori a 0,05.

RISULTATI

Caratterizzazione delle colture cellulari

Dopo separazione su Ficoll, le cellule mononucleate sono state seminate e lasciate in coltura per quattro giorni. Al quarto giorno le MSC sono state selezionate in base alla loro capacità di aderire alla superficie di coltura mostrando, come da definizione, una forma *fibroblast-like*. (Figura 5A).

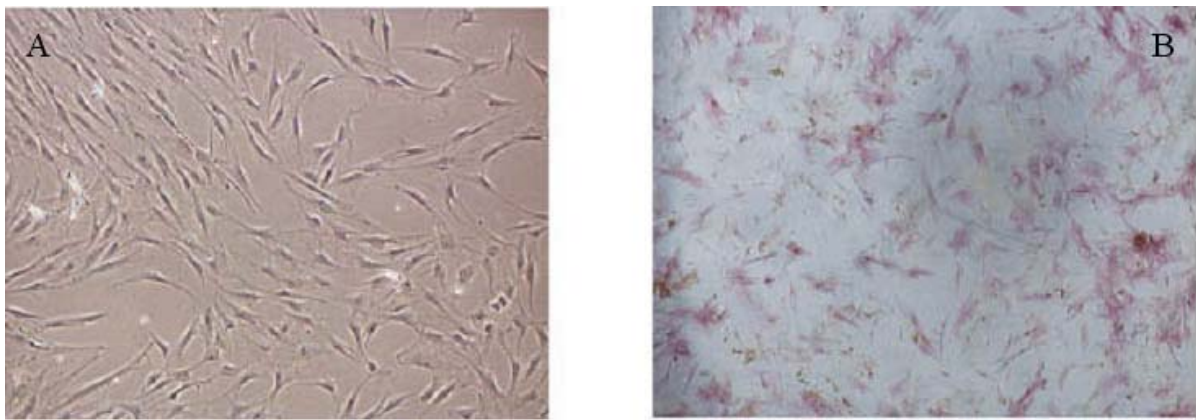


Figura 5: Morfologia di MSC. Le immagini rappresentano le MSC (A) al raggiungimento della prima confluenza, ed in seguito a test citochimico per l'espressione dell'ALP (B) allo stesso tempo T1 (4x).

Nel corso degli esperimenti le cellule mostrano morfologie diverse, sia ancora allungate e fusiformi come anche allargate e più granulose, spesso con contenuti diversi di ALP, a riprova della eterogeneità della popolazione cellulare di partenza. (Figura 5B). Nonostante la variabilità biologica interindividuale, la durata delle diverse fasi nei processi di differenziamento e mineralizzazione nelle diverse condizioni di coltura era simile nelle colture provenienti dai diversi soggetti (dal T1 al T2).

Per evidenziare la variazione della morfologia cellulare nel corso del differenziamento è stata effettuata la colorazione con arancio di acridina. Tale test è stato effettuato al raggiungimento della seconda confluenza (T2). Il differenziamento in senso osteogenico, indotto in coltura dai diversi additivi, non comporta sostanziali variazioni morfologiche anche se è possibile osservare che, mentre in C1 e C2 la popolazione

cellulare appare omogenea, in C3 e C4 coesistono cellule più allungate insieme a cellule poligonali (Figura 6).

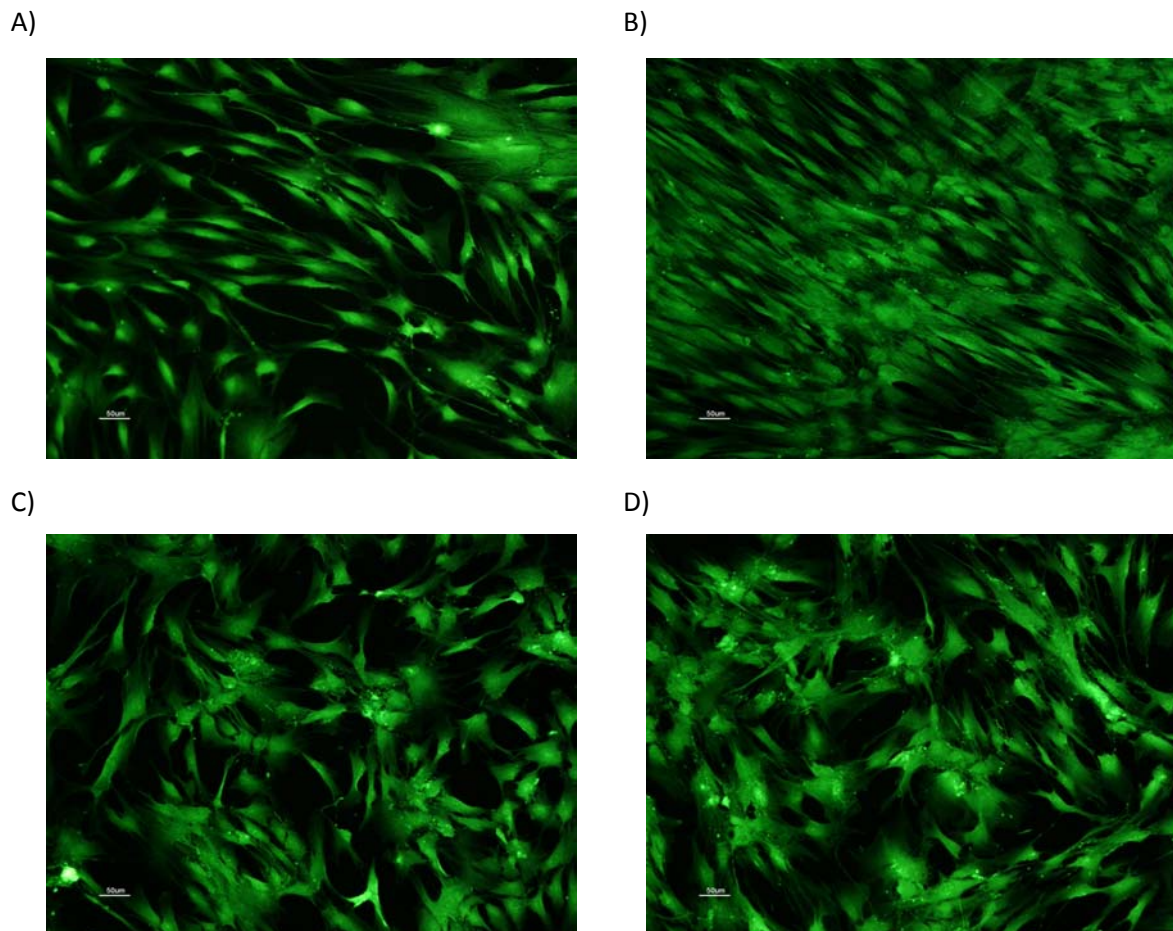


Figura 6: Morfologia cellulare. Le immagini rappresentano le MSC, dopo trattamento di 14 giorni con i rispettivi additivi. La colorazione con Arancio di Acridina è stata effettuata al raggiungimento della seconda confluenza T2 (10x): cellule in C1 (A), C2 (B), C3 (C) e C4 (D).

Per valutare eventuali effetti sulla proliferazione cellulare in risposta al differenziamento osteogenico indotto dai diversi additivi, è stato monitorato il tempo impiegato dalle cellule nelle diverse condizioni di coltura per il raggiungimento della confluenza.

Le cellule raggiungono la prima confluenza in $10,5 \pm 1,9$ giorni dal T0, mentre dal T1 al T2 impiegano $11,5 \pm 2,2$ e $12,8 \pm 1,4$ rispettivamente nelle condizioni C1/C2 e C3/C4.

Non si osserva nessuna differenza significativa nella velocità di crescita delle cellule confrontando i tempi di confluenza delle cellule in risposta ai diversi trattamenti (Figura 7A). Le ridotte barre di errore rivelano la omogeneità dei campioni mantenuti in coltura nelle medesime condizioni per quanto riguarda il raggiungimento della confluenza.

La proliferazione cellulare è stata valutata sulla base delle conte effettuate alla seconda confluenza (T2). Il numero delle cellule varia da 9×10^5 a $1,3 \times 10^6$, nei diversi trattamenti. Si può osservare che, l'aggiunta di solo acido ascorbico (C2), induce una differenza significativa ($p < 0,05$) nella capacità proliferativa rispetto alle cellule cresciute in terreno basale; lo stesso effetto non si riscontra con la stessa intensità quando l'acido ascorbico è usato in combinazione con ulteriori additivi (Figura 7B).

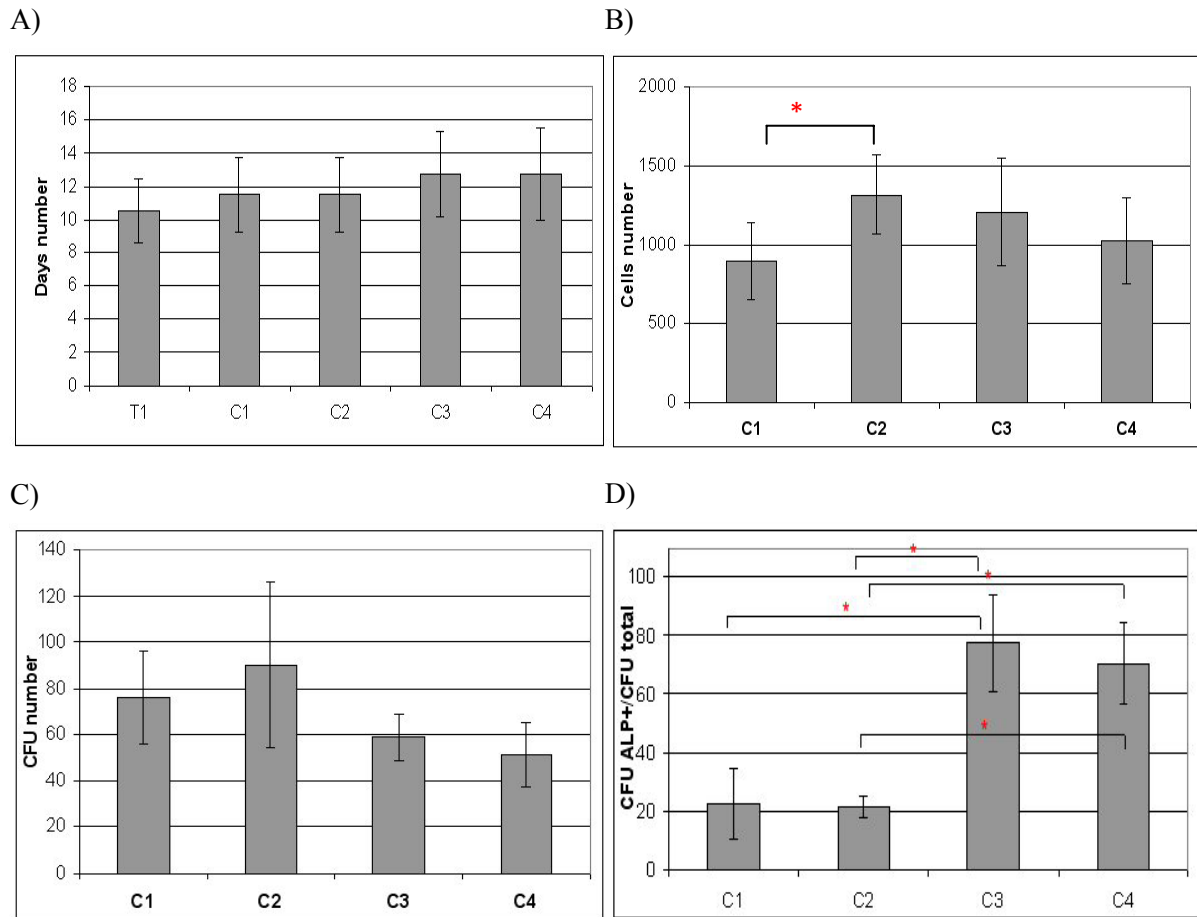


Figura 7: proliferazione delle MSC. a) il grafico mostra i giorni necessari al raggiungimento delle confluenze (dal T0 al T2 nelle diverse condizioni di coltura), b) il grafico mostra il numero delle cellule, contate con Trypan Blue, al T2, evidenziando un effetto clonogenico dell'acido ascorbico quando esclusivamente aggiunto al mezzo di coltura. Attività clonogenica delle MSC: c) il grafico mostra il numero di CFU totali evidenziate attraverso colorazione con crystal violetto; d) il grafico mostra l'effetto dei diversi additivi aggiunti al terreno di coltura sull'induzione del fenotipo osteogenico, mostrando la ratio tra le CFU totali e le CFU positive per l'espressione di ALP. Tutti i valori esprimono la media \pm l'errore standard di 4 campioni. (*) $p < 0.05$

La capacità di formare colonie è stata analizzata per i trattamenti C1, C2, C3 e C4, ottenendo i risultati rispettivamente di 76 ± 20 , $90,2 \pm 35,9$, 59 ± 10 , $51,2 \pm 14$ colonie. Anche se le differenze nel numero totale delle colonie non risulta essere statisticamente significativo confrontando i diversi trattamenti, le cellule mantenute in coltura con l'aggiunta di acido ascorbico (C2) sembrano mostrare una più elevata capacità clonogenica. (Figura 7C). Inoltre attraverso la colorazione con crystal violetto è stato possibile analizzare, qualitativamente, la grandezza e la forma delle colonie prodotte dalle cellule nelle diverse condizioni di coltura. Il pannello in figura 8 mostra l'elevata variabilità dei diversi campioni sottoposti allo stesso trattamento. Anche la morfologia, evidenziata con la colorazione crystal violetto, mostra che la dimensione delle colonie è molto variabile (Figura 8).

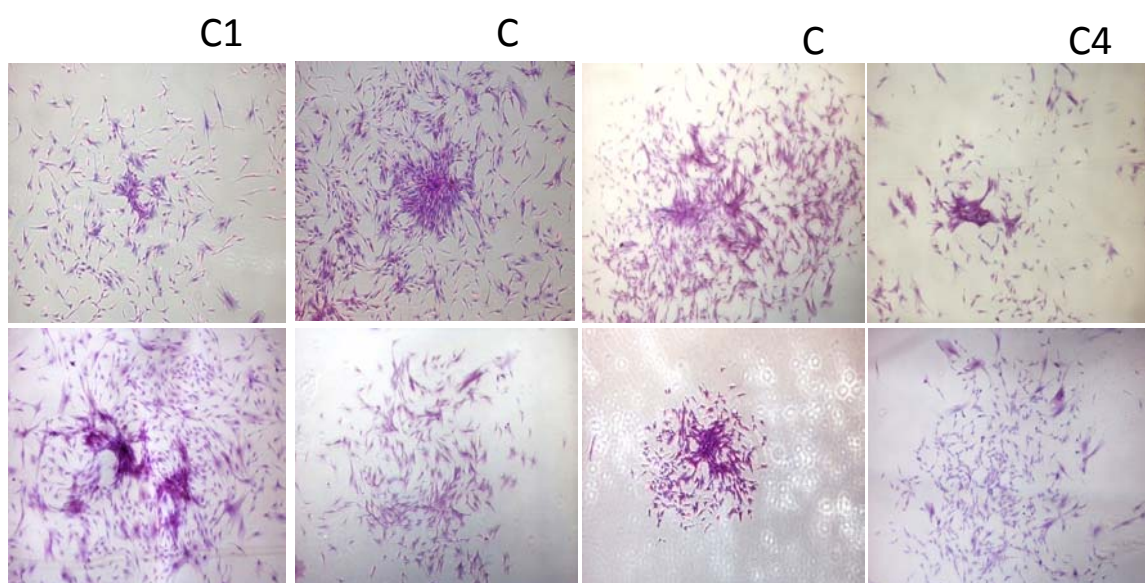


Figura 8: Analisi qualitativa delle CFU. Le diverse immagini sono rappresentative di MSC capaci di formare colonie trattate con crystal violetto al raggiungimento della seconda confluenza (T2). Le immagini mostrano che cellule cresciute nelle stesse condizioni di coltura possono originare CFU di diverse forma e dimensioni, sottolineando anche l'elevata variabilità interindividuale.

Mediante saggio citochimico, è stata valutata, la positività per l'espressione di ALP sulle colonie ottenute dal test di clonogenicità (Figura 6D). Il pannello in figura 9

mostra la colorazione citochimica di ALP. La positività è stata attribuita quando più del 50% delle sue cellule della stessa colonia mostravano colore rosso

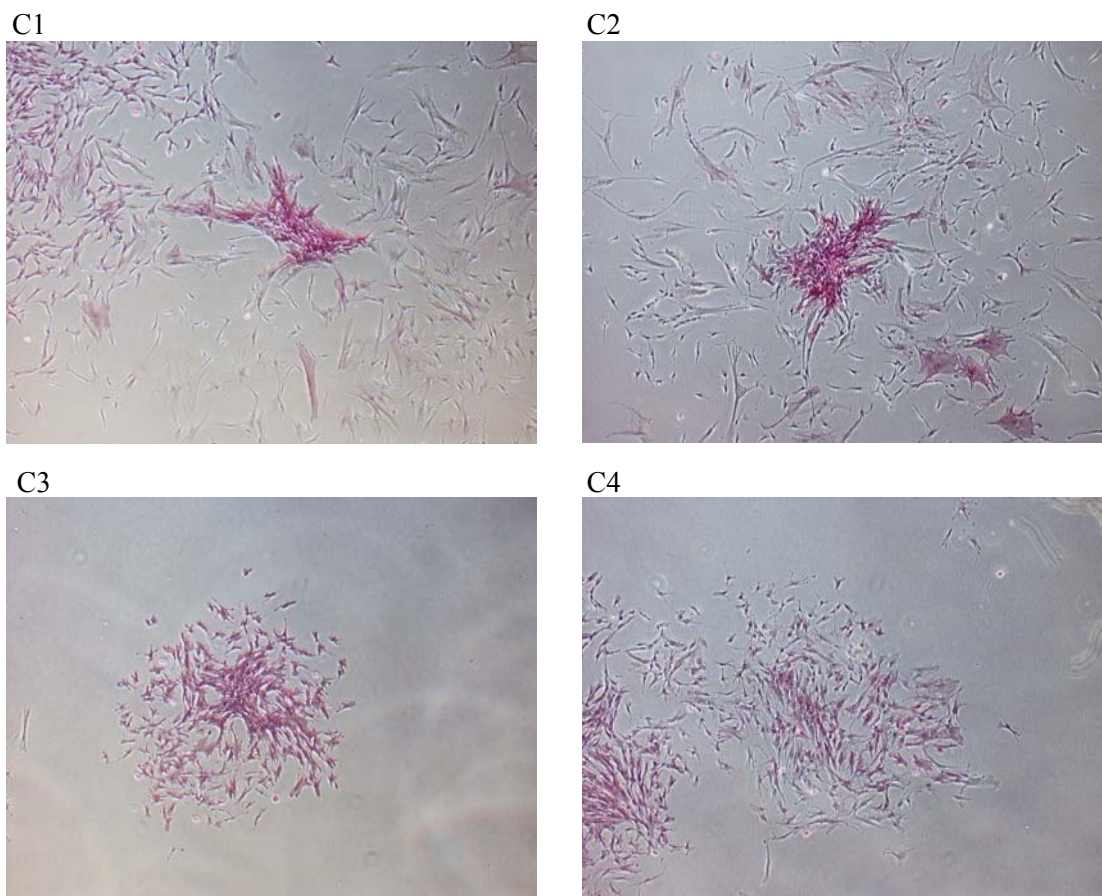


Figura 9: Analisi qualitativa dell'espressione di ALP in CFUS, al T2 nelle diverse condizioni di coltura.

Le colonie ALP positive rappresentano il 22% delle totali per C1 e C2, il 77,4% per C3 ed il 71% per C4. Si può notare che l'ascorbato, in C2, non modifica l'espressione di ALP, mentre l'aggiunta del desametasone al mezzo di coltura la aumenta in modo significativo ($p < 0,05$); infine il β -glicerofosfato, in C4, non interferisce con l'effetto che il desametasone aveva già sortito sull'espressione di ALP in C3 (Figura 7D).

L'attività cellulare della fosfatasi alcalina (ALP), marcatore specifico del differenziamento osteogenico, è stata valutata sui lisati cellulari ottenuti al raggiungimento della seconda confluenza (T2). E' possibile osservare che la progressiva aggiunta dei diversi additivi al terreno di coltura determina un aumento dell'attività della fosfatasi alcalina cellulare, anche se il solo effetto significativo ($p < 0,05$) è stato osservato con l'aggiunta di acido ascorbico (C2) al mezzo di coltura (Figura 10).

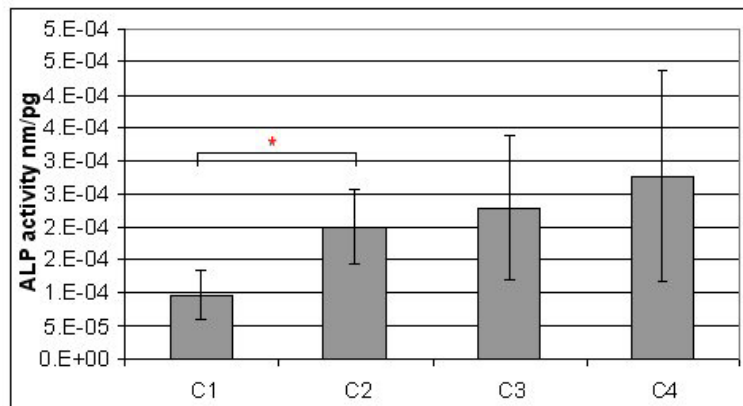


Figura 10: Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina cellulare (ALP) di MSC al raggiungimento della seconda confluenza (T2) nelle diverse condizioni di coltura. I valori sono espressi come media \pm Errore standard di 4 campioni, $p < 0.05$.

L'espressione di ALP è stata valutata, a livello citochimico, al T1, dopo circa 14 giorni dalla semina, e senza stimoli specifici, e al T2, dopo altri 10 giorni di coltura in ciascuna condizione.

Come per le colonie, il campione è considerato positivo quando più del 50% delle cellule mostrava colore rosso. La maggior parte dei campioni al T1 esprime livelli basali di fosfatasi alcalina, che si mantengono inalterati in C1 e C2; l'espressione di ALP risulta, invece, decisamente più evidente nelle colture C3 e C4 con distribuzione non uniforme nell'area di coltura (Figura 11).

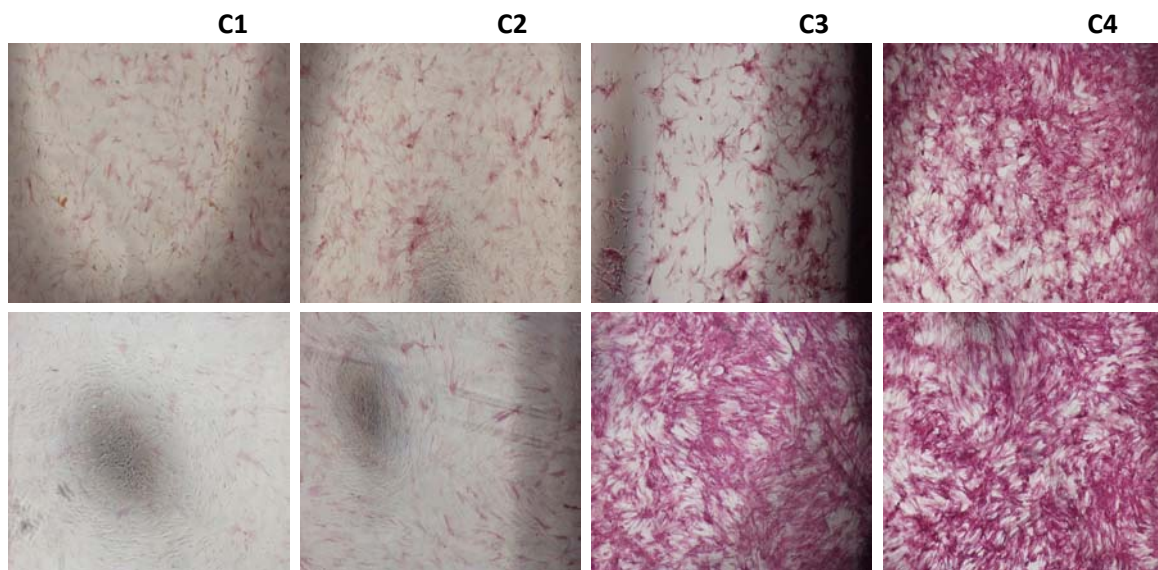


Figura 11: Fosfatasi alcalina citochimica. Il pannello si riferisce a due campioni nelle quattro diverse condizioni al T2 (4x)

La capacità di deporre noduli minerali è stata testata al raggiungimento della seconda confluenza per le cellule mantenute in coltura in presenza dei diversi stimoli specifici. Le cellule in tutte le condizioni di coltura sono state seminate per il saggio di mineralizzazione e mantenute in coltura per 14 giorni in terreno mineralizzante, corrispondente alla condizione C4. La presenza nel terreno di β -glicerofosfato garantisce una fonte di fosfato che le cellule indotte al differenziamento osteogenico utilizzano per la sintesi di cristalli di fosfato di calcio nel processo di mineralizzazione della matrice.

La presenza di noduli minerali è stata rilevata attraverso l'utilizzo di due diverse colorazioni, rosso di alizarina e Von Kossa, specifiche rispettivamente per il calcio ed il fosfato.

Dal pannello in figura 11 si evince che solo le cellule nelle condizioni C3 e C4 sono in grado di formare noduli minerali strutturati e riconoscibili, mentre nelle condizioni C1 e C2 non è possibile osservare depositi di calcio fosfato strutturati (Figura 12).

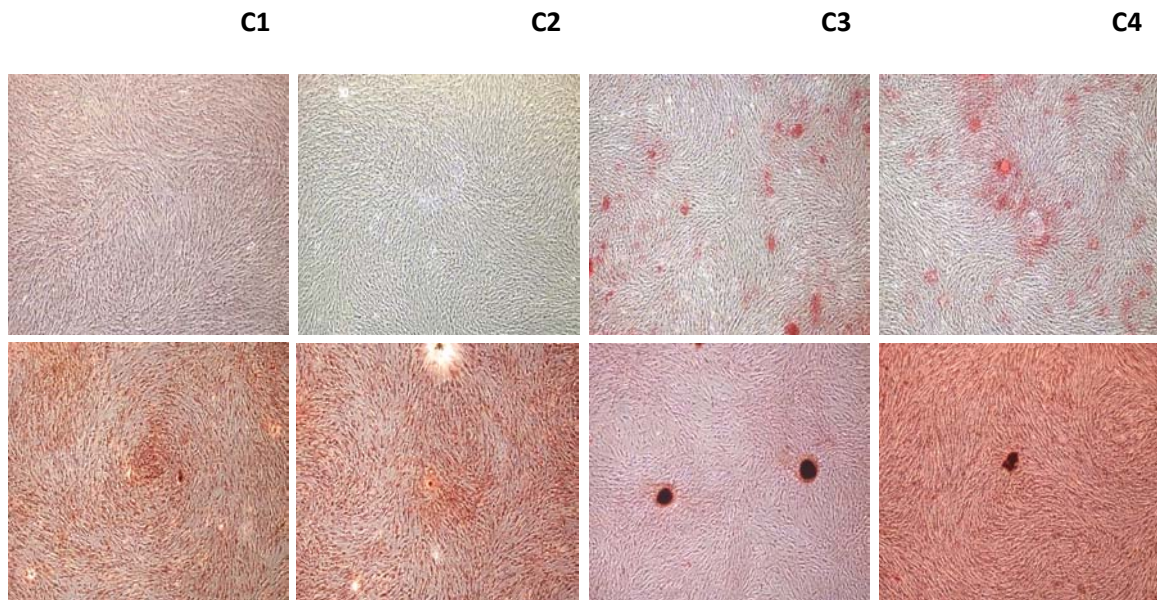


Figura 12: Mineralizzazione evidenziata con le colorazioni Rosso Alizarina (pannello in alto) e Von Kossa (pannello in basso). Immagini esplicative dei diversi trattamenti di coltura. Ciascuna immagine è rappresentativa dei diversi trattamenti applicati alle cellule (C1, C2, C3 e C4)

Analisi della variazione dell'espressione genica di MSC in risposta ai diversi additivi aggiunti al terreno di coltura

I geni marcatori del differenziamento osteogenico, che sottolineano i progressivi cambiamenti delle MSC dalle condizioni basali (T0), in assenza cioè di ogni trattamento specifico, alla fine della fase di proliferazione (T1) e fino all'acquisizione del fenotipo osteogenico (T2), sono stati analizzati a tempi stabiliti. Ciascun gene preso in esame è stato normalizzato in rapporto ad un gene housekeeping, la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH).

I valori relativi al gene Osterix sono risultati non riproducibili e non attendibili e per questo non sono stati riportati nell'analisi.

Le differenze tra l'espressione genica ai tempi T0 e T1, mostrano quali siano i livelli basali di espressione ed un eventuale differenziamento delle cellule in coltura priva di stimoli; attraverso l'analisi ai tempi T1 e T2 è possibile osservare il differenziamento indotto dagli additivi utilizzati, ed infine il confronto delle diverse condizioni al T2 evidenzia gli effetti dei singoli additivi. Analizzando l'espressione genica basale ed in risposta ai diversi trattamenti è stato sempre possibile osservare una elevata variabilità individuale tra i pazienti.

La figura 13 mostra che quasi tutti i geni, aumentano la loro espressione tra il T0 ed il T1, nonostante le differenze siano significative ($p < 0,01$) soltanto per l'espressione del collagene di tipo I1 α . Il fattore di trascrizione RUNX 2, marker precoce del differenziamento osteogenico, rimane invece costante fino al raggiungimento della prima confluenza.

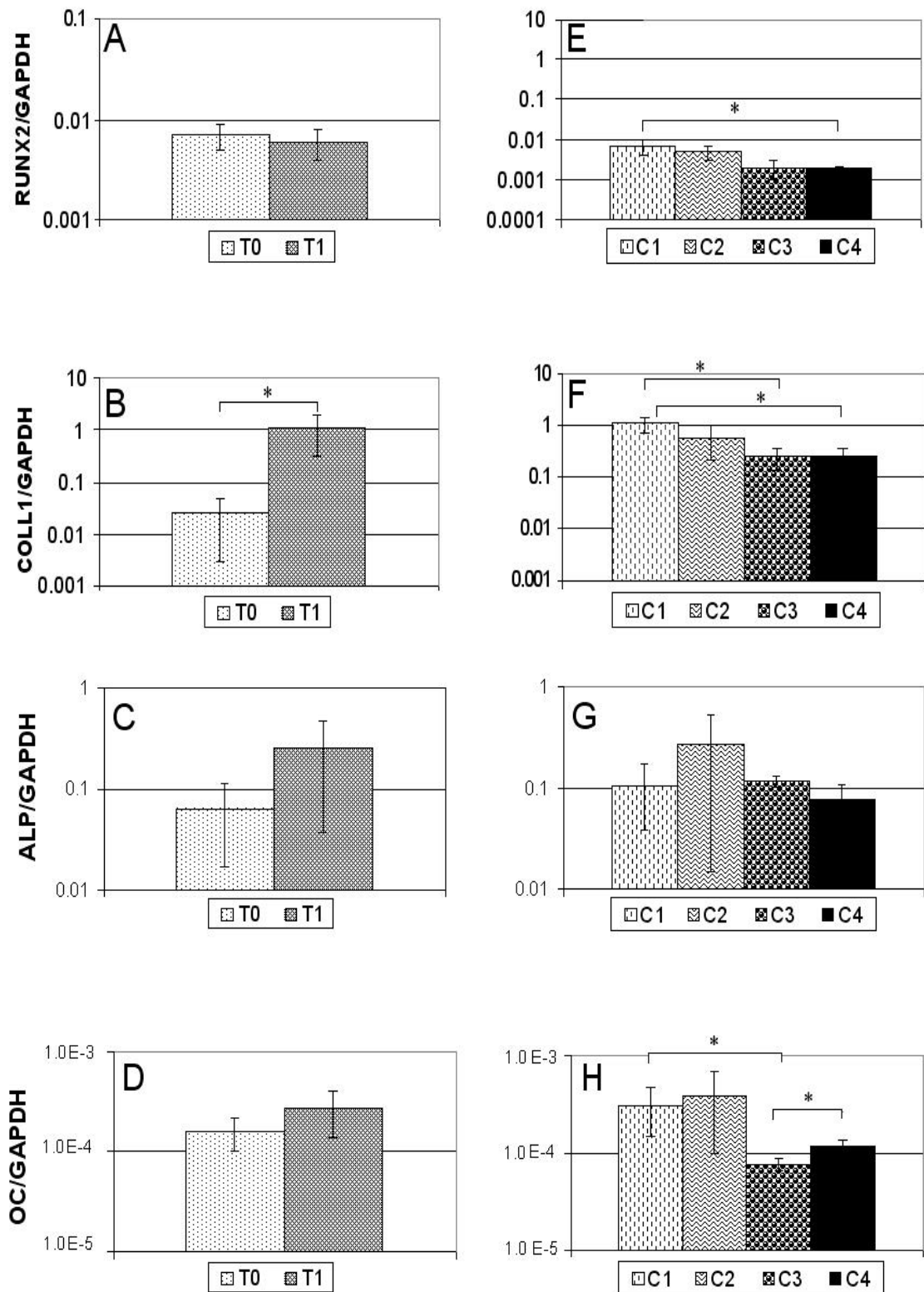


Figura 13: profilo di espressione genica di MSC monitorate nel corso del differenziamento osteogenico in risposta ai diversi additivi aggiunti in coltura. I dati sono espressione della media di 4 campioni \pm errore standard. I dati sono rappresentati in scala logaritmica. (*) $p < 0,01$

Dall'analisi T1/T2 possiamo osservare che, mantenendo le cellule in assenza di stimoli specifici (condizione C1), i livelli trascrizionali di tutti i geni, precoci e tardivi, rimangono sostanzialmente uguali ai livelli espressi al T1.

In presenza di acido ascorbico (condizione C2) il livello di espressione del trascritto del fattore di trascrizione a monte della cascata del segnale del differenziamento osteogenico RUNX2, diminuisce in modo sensibile, dal T1 al T2. Lo stesso comportamento è riscontrabile per i livelli di espressione di collagene di tipo I α , mentre per quanto riguarda i livelli di espressione del trascritto di ALP ed osteocalcina, sembrano aumentare, anche se la variabilità interindividuale non ci permette di apprezzarne l'effetto in modo significativo.

E' interessante notare che i livelli trascrizionali di tutti i geni presi in esame nelle condizioni C3 e C4 diminuiscano, evidenziando differenze significative sia in relazione all'endpoint precedente, sia alla coltura in assenza di additivi (Figura 13).

Determinazione immunoenzimatica del collagene di tipo I mediante ELISA

La concentrazione del collagene di tipo I è stata determinata mediante l'utilizzo del metodo ELISA nei supernatanti delle colture cellulari, a diversi tempi e per i differenti trattamenti. E' stato possibile evidenziare una differenza significativa, nella concentrazione di collagene, tra il T0 ed il T1 (Figura 14 A) mentre non si nota nessuna variazione significativa tra il T1 e i diversi trattamenti al T2 (Figura 14 B) anche se i livelli di produzione vengono mantenuti invariati rispetto al T1. I livelli di collagene di tipo I tendono ad aumentare nella condizione C2 e, più in generale, nelle colture dove sia presente ascorbato.

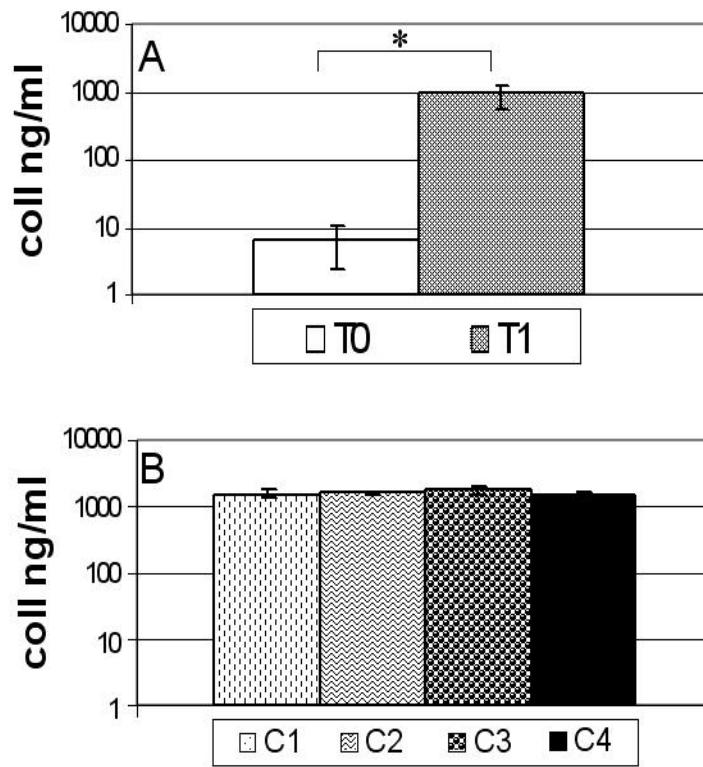


Figura 14: determinazione della concentrazione del collagene di tipo I. A) tempi T0 e T1; B) tutti i trattamenti al T2. I dati sono rappresentati in scala logaritmica. (*) $p < 0,05$

Discussione

Le cellule stromali mesenchimali (MSC) sono cellule che si trovano principalmente nella frazione vascolare dello stroma, nel tessuto adiposo e nel midollo osseo: la loro presenza nei tessuti adulti insieme alla loro capacità di differenziare verso citotipi di derivazione mesenchimale le rende particolarmente interessanti per applicazioni di ingegneria tissutale e medicina rigenerativa al fine di riparare difetti ossei¹¹⁶. Le MSC sono particolarmente suscettibili alle variazioni del microambiente tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Bianco e Robey¹¹⁷ hanno suggerito che il midollo osseo sia un tessuto connettivo caratterizzato da una presenza non particolarmente abbondante di matrice extracellulare. Questa caratteristica potrebbe essere alla base della relativa facilità delle MSC di differenziare in citotipi diversi¹¹⁸, infatti il segnale per la maturazione di MSC indifferenziate verso un determinato citotipo proviene prevalentemente da stimoli tessuto-specifici rilasciati da parte della matrice extracellulare. Infatti la matrice extracellulare non rappresenta semplicemente un substrato su cui le MSC vivono, ma regola in modo fine il bilancio tra replicazione e differenziamento attraverso il rilascio di citochine e fattori di crescita e garantisce la stimolazione del differenziamento osteogenico fornendo il giusto supporto meccanico^{119, 120, 121}. Per applicazioni di ingegneria tissutale, così come per protocolli sperimentali, è necessario ottenere un elevato numero di MSC. Ottimizzare i protocolli di espansione *in vitro* diventa quindi un argomento di cruciale importanza. La suscettibilità delle MSC ai diversi terreni di coltura, agli additivi così come alla plastica di coltura (TCPS) sono fenomeni largamente descritti da molti autori^{122, 123}. L'utilizzo di coltura di MSC in α -MEM commerciale addizionato con il 10% di siero fetale bovino è indicato come il terreno ottimale per l'espansione. Ad ogni modo la ricerca delle condizioni ottimali di coltura per evitare la senescenza replicativa e la perdita di multipotenza è ancora attiva^{124, 125}. Bonab et al.¹²⁶ hanno mostrato che le MSC entrano in senescenza ed iniziano a perdere le loro caratteristiche di staminalità dall'inizio della coltura *in vitro*. Le MSC dovrebbero quindi essere utilizzate per terapie cellulari o geniche solo dopo essere state sottoposte per brevi periodi a processi di espansione *in vitro*. E' stato anche osservato che il periodo di coltura *in vitro* è un momento critico per l'abilità delle MSC di rigenerare osso una volta impiantate al sito di danno; infatti un impianto pre-seminato con MSC fatte crescere *in vitro* per 14 giorni in terreno differenziante ha una potenzialità osteogenica minore se comparato con MSC espanse *in vitro* per 4 giorni.

Trovare un efficiente protocollo di espansione *ex vivo* per le MSC è diventato di particolare importanza da quando è diventato chiaro che il periodo di coltura *in vitro* può avere un impatto sull'organizzazione cellulare e sul potenziale differenziativo. Per il differenziamento osteogenico *in vitro* è necessario utilizzare acido ascorbico, desametasone e β -glicerofosfato. In queste condizioni di coltura le MSC crescono in monostrato acquistando un fenotipo osteogenico, mostrando una elevata espressione di ALP e la capacità di deporre calcio nella matrice extracellulare, mineralizzandola. Questo terreno è usato tuttora per indurre il differenziamento in colture cellulari di precursori osteogenici sebbene non ci sia ancora accordo tra gli autori sui tempi di aggiunta in coltura di tali additivi. Lo scopo di questo studio è quello di analizzare il protocollo *in vitro* attualmente in uso per l'espansione e l'induzione del differenziamento osteogenico di MSC e comprendere il ruolo dei singoli induttori aggiunti al terreno di coltura. Il piano sperimentale è stato definito considerando come riferimento tre tempi, indicativi delle diverse fasi del differenziamento che comprendono la proliferazione, la deposizione della matrice extracellulare e la sua mineralizzazione. L'acido ascorbico è generalmente considerato come un additivo chimico essenziale per la coltura delle cellule, è infatti noto per essere un cofattore nella reazione che porta alla sintesi del collagene di tipo I ed un induttore della proliferazione cellulare e della deposizione di matrice extracellulare^{112, 127}. In questo lavoro è stato confermato che l'acido ascorbico è essenziale per la proliferazione delle MSC, come dimostrato dall'aumento del numero di cellule in presenza di acido ascorbico (C2) se confrontato con la condizione di controllo (C1). Anche il numero delle CFU in seguito ad aggiunta di acido ascorbico risulta aumentato, il che potrebbe essere interpretato come la capacità di tale additivo di stimolare l'attività clonogenica. Nelle condizioni sperimentali studiate, l'espressione citochimica e l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina (ALP), in accordo con altri autori, è stata aumentata in presenza di acido ascorbico¹¹². Per quanto riguarda la produzione del collagene di tipo I non sono stati osservati cambiamenti significativi in seguito all'aggiunta dell'ascorbato al raggiungimento della seconda confluenza (T2) mentre un aumento nella quantità di proteina prodotta è stato osservato tra il T0 ed il T1.

Il desametasone è un glucocorticoide di sintesi aggiunto al terreno di coltura allo scopo di regolare il differenziamento osteogenico *in vitro*. In contrasto con alcuni autori, non si è osservato un aumento del potenziale proliferativo delle MSC^{114 e 126}. E'

generalmente riconosciuto un effetto del DEX sulla proliferazione delle MSC ma il tempo di aggiunta in coltura è ancora incerto: in accordo con alcuni autori l'assenza di DEX determina una diminuzione della velocità di crescita delle MSC, mentre altri autori suggeriscono di rimuovere il DEX dal mezzo di coltura dopo un breve trattamento per accelerarne la proliferazione¹²⁸. E' stato anche suggerito che un breve trattamento delle MSC con DEX migliori la fase di adesione alla plastica di coltura aumentando la produzione di fibronectina¹¹⁵. C'è diffuso accordo nell'affermare che la sensibilità della MSC al trattamento con glucorticoidi dipenda dal loro grado di differenziamento, sostenendo che potrebbero avere maggiore effetto sui precursori ad uno stadio precoce del differenziamento¹²⁹. Il passaggio da una forma fibroblast-like, osservata nelle condizioni C1 e C2, alla forma poligonale, più comune nelle condizioni C3 e C4, potrebbe essere un ulteriore segnale della progressione del differenziamento verso un fenotipo osteogenico, indotto dagli additivi aggiunti al terreno di coltura. Di fatto la morfologia "cuboidale" assunta dalle MSC adulte quando indotte al differenziamento osteogenico è stata ampiamente riportata¹³⁰. I risultati ottenuti nel corso di questo studio hanno mostrato un effettivo aumento delle CFU positive per l'espressione di ALP in presenza di DEX nel terreno di coltura. Queste cellule sono verosimilmente gli equivalenti in vitro dei precursori bone-forming in vivo, cioè i progenitori del tessuto connettivo (*connective tissue precursors*, CTP). I dati sperimentali mostrano che l'iniziale espansione di MSC in presenza di DEX è stato un prerequisito per ottenere la formazione di strutture nodulari simili al tessuto osseo ottenute da colture in multistrato di MSC. Si è osservato che un periodo di coltura di 14 giorni in terreno mineralizzante non ha avuto alcun effetto su cellule mantenute in coltura con il terreno di controllo (C1) e in cellule in terreno addizionato con acido ascorbico (C2). La presenza di aggregati nodulari di calcio-fosfato rappresenta la prova del passaggio delle MSC da precursori mesenchimali ad osteoblasti funzionali; quindi i nostri dati sperimentali confermano che il trattamento di MSC con DEX è necessario allo scopo di ottenere il potenziale osteogenico. Se, come è stato recentemente postulato, la capacità di formare noduli minerali *in vitro* è realmente un'indicazione del potenziale osteogenico delle MSC una volta impiantate *in vivo*, il DEX potrebbe essere utilizzato per promuovere una selezione di *connective tissue precursors* (CTP) dalla popolazione inizialmente eterogenea di MSC. Se questo è stato il risultato di una generale induzione al differenziamento osteogenico di precursori non ancora

commissionati o la selezione della popolazione di osteoprogenitori non è chiaro. Dati recenti mostrano che il trattamento continuo con DEX durante il periodo di coltura facilita la risposta delle MSC, e apparentemente riduce l'apoptosi determinata dalla densità cellulare^{131,132} confermando anche che il DEX agisce come un induttore in grado di completare il commissionamento in senso osteogenico. Il β -glicerico fosfato è una comune sorgente di fosfato inorganico necessario alle MSC per la deposizione di noduli di calcio fosfato: la formazione di noduli 3D è la prova del raggiungimento del fenotipo osteogenico. Nel piano sperimentale l'utilizzo di 10nM di β -glicerofosfato addizionato al terreno di coltura durante il differenziamento (dal raggiungimento della prima confluenza, T1, e durante il T2) non determina una visibile induzione della formazione di noduli minerali se confrontati con le cellule in C1, C2 e C3. I nostri risultati confermano che il β GP è richiesto per la deposizione di noduli minerali, ma i requisiti necessari sono la formazione di una matrice extracellulare, indotta dall'acido ascorbico, e l'espressione da parte della popolazione cellulare di ALP, stimolato dal trattamento con il DEX. Come dimostrato in diversi studi, il processo di osteogenesi è strettamente regolato da segnali specifici che inducono un caratteristico profilo di espressione genica^{133, 134}. L'osservazione che le cellule in C4 non sono in grado di formare noduli di calcio fosfato prima della terza confluenza suggerisce che gli aggregati minerali possono essere formati solo in un microambiente tridimensionale formato da cellule over confluenti presenti in vitro in multistrato, con una forte deposizione di matrice extracellulare. La matrice extracellulare rappresenta il substrato su cui le MSC crescono ed allo stesso tempo garantisce le caratteristiche di rigidità che determinano il giusto stimolo meccanico alla deposizione di noduli minerali, mentre inibisce la proliferazione cellulare¹³⁵. E' possibile che le MSC contengano cellule osteoprogenitrici che possono proliferare ed essere identificate in condizioni di coltura, definite osteogeniche. Trattamenti combinati con i diversi induttori stimolerà il potenziale di espansione *ex vivo* di MSC riducendo al minimo il tempo di coltura *in vitro* evitando quindi il rischio di senescenza replicativa: questo aspetto è di fondamentale importanza.

Conclusioni

Le tecniche di coltura *in vitro* sono studiate per supportare la funzionalità e la sopravvivenza delle MSC in condizioni *ex vivo* (al di fuori del corpo), ma le condizioni

ambientali ed i trattamenti sperimentali sono in grado di modificare significativamente la loro potenzialità proliferativa, la durata della vita ed il grado di commissionamento. In questo studio è stato confermato che la proliferazione di MSC può essere indotta dal trattamento con acido ascorbico in modo non correlato all'età dei pazienti ed alla variabilità interindividuale. L'acido ascorbico è quindi un induttore richiesto quando l'espansione di cellule indifferenziate, che include anche la capacità di formare colonie, è richiesta. Il DEX e il β GP forniscono alle cellule segnali che le inducono verso un commissionamento osteogenico partendo dalla produzione della matrice e dalla capacità di formare strutture nodulari simili al tessuto osseo. I dati di questo lavoro mostrano che il DEX agisce piuttosto attraverso la selezione o la stimolazione delle cellule in grado di formare CFU positive per l'espressione di ALP all'interno della popolazione eterogenea di partenza ed è assolutamente richiesto per ottenere noduli calcio fosfato. La deposizione dei noduli minerali dei precursori del tessuto connettivo nella popolazione di partenza rappresenta un'indicazione della capacità osteogenica delle MSC. Sulla base di questo studio, il protocollo sperimentale per l'induzione del differenziamento osteogenico di MSC dovrebbe riprodurre *in vitro* la progressione fisiologica degli eventi peculiari del differenziamento. Il protocollo messo a punto prevede l'utilizzo dell'acido ascorbico dall'inizio della cultura per promuovere la crescita cellulare, l'aggiunta di 10nM di DEX alla fine della fase proliferativa per selezionare gli osteoprogenitori ed infine l'aggiunta di β GP per la mineralizzazione in presenza di multistrati cellulari, che creano l'ambiente tridimensionale, evento necessario a questo punto del processo di commissionamento.

Processo di rimodellamento osseo

Il tessuto osseo è dinamico e complesso, caratterizzato dalla presenza di una matrice extracellulare mineralizzata e dalla capacità di adattarsi alle richieste funzionali dell'organismo e di riparare se stesso con un vero e proprio meccanismo di rigenerazione.

A livello macroscopico possiamo distinguere due tipi di osso: l'osso spugnoso e l'osso compatto. L'osso spugnoso si trova principalmente a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe. Il nome deriva dalla sua particolare struttura che lo fa apparire simile a una spugna. È caratterizzato dalla presenza di trabecole variamente orientate e intersecate tra loro e delimitanti cavità, dette cavità midollari, ripiene di midollo osseo ematopoietico. L'osso compatto, al contrario, è privo di cavità macroscopicamente evidenti e deve il suo nome alla rigidità che lo caratterizza. Si trova nella diafisi delle ossa lunghe e riveste il tessuto spugnoso delle ossa brevi e delle ossa piatte. La sua unità principale, l'osteone, è costituita da diverse lamelle concentriche, che si formano dall'ordinata deposizione di fibre di collagene di tipo I intorno al canale di Havers, che contiene i vasi sanguigni. Disposti trasversalmente, vi sono altri canali più piccoli, detti canali laterali. Nel loro insieme, canali laterali e haversiani formano un sistema continuo di cavità che permette lo scambio di ossigeno e nutrienti tra il sangue e le cellule ossee. Anche il tessuto osseo spugnoso è costituito da lamelle che, in questo caso, si anastomizzano in una rete tridimensionale nelle cui maglie (cavità midollari) si trova il midollo osseo. Il tessuto osseo compatto e quello spugnoso sono formati dagli stessi elementi cellulari e dalle stesse proteine della matrice ma svolgono compiti molto diversi: l'osso compatto, calcificato per l'80-90%, svolge prevalentemente una funzione meccanica, mentre l'osso spugnoso, essendolo solo per il 5-25%, svolge la funzione metabolica¹³⁶.

Le funzioni del tessuto osseo sono molteplici: esso garantisce supporto meccanico, fornisce protezione agli organi vitali ed al midollo osseo, costituisce un sito di attacco per i muscoli necessario alla locomozione e rappresenta una riserva di ioni, specialmente calcio e fosfato^{137,138,139}. Gli ioni sono rilasciati attraverso un processo che avviene costantemente nel corso della vita ed è definito rimodellamento osseo. Il rimodellamento osseo è un processo finemente regolato che assicura il processo di riparazione in seguito a microlesioni e comporta la sostituzione del tessuto osseo

vecchio con osso neosintetizzato attraverso l'azione continuata e coordinata di osteoclasti ed osteoblasti¹⁴⁰. Gli osteoclasti sono cellule multinucleate che derivano dalla linea monocito-macrofagica la cui funzione è quella di degradare il tessuto osseo calcificato attraverso un processo proteolitico^{141, 142}. Gli osteoblasti sono cellule di origine mesodermica la cui principale funzione è quella di secernere una matrice cellulare ricca in collagene di tipo I che verrà in seguito mineralizzata¹⁴³. In condizioni fisiologiche il processo di rimodellamento è garantito dal fenomeno del riassorbimento immediatamente seguito dal processo di formazione di nuovo tessuto osseo. Il mantenimento dell'equilibrio tra l'azione di osteoclasti ed osteoblasti è indispensabile per l'omeostasi ossea e la distruzione di tale equilibrio può determinare una diminuzione della massa ossea e dell'integrità della microstruttura del tessuto osseo stesso, risultando, come è evidente nei casi di osteoporosi, in un aumento della suscettibilità alle fratture¹⁴⁴. Il processo di rimodellamento osseo è un processo finemente controllato da fattori ormonali, ad azione autocrina e paracrina, nonché da stress meccanici in grado di attivare vie di trasduzione del segnale che agiscono su osteoclasti ed osteoblasti a diversi stadi di differenziamento^{145, 135}.

Il rimodellamento osseo avviene in strutture vascolari specializzate definite *Bone Remodelling Compartment (BRC)*. I BRC sono composti da *bone lining cells*, capaci di secernere le principali citochine e fattori di crescita osteotropi¹³⁹. Il meccanismo di rimodellamento differisce nelle due tipologie di osso. Nell'osso spugnoso il ciclo di rimodellamento osseo avviene sulla superficie delle trabecole ossee ed ha inizio con l'attività di riassorbimento degli osteoclasti, che creano una lacuna di riassorbimento, profonda 40 -60 µm. Il periodo di riassorbimento ha una durata media di 30-40 giorni ed è seguito da un periodo di deposizione di nuovo osso che può durare fino a 150 giorni^{146, 147}. Nell'osso compatto il rimodellamento procede attraverso la formazione di tunnel, formati dall'attività degli osteoclasti, che formano i cosiddetti "*cutting cones*" allo scopo di rimuovere l'osso danneggiato. Tale processo è immediatamente seguito dall'attività degli osteoblasti che formano i "*closing cones*" allo scopo di colmare la lacuna. Ciascun ciclo di rimodellamento ha una durata media di 120 giorni.

In condizioni fisiologiche la lacuna di riassorbimento è completamente riempita da osso di nuova formazione. In condizioni patologiche, come ad esempio nel caso dell'osteoporosi, gli osteoblasti non sono capaci di colmare la lacuna ossea portando ad una perdita di tessuto osseo ad ogni evento di rimodellamento¹⁴⁸. Inoltre il sito di

rimodellamento dell'osso spugnoso è più vicino anatomicamente al midollo osseo rosso, noto per contenere cellule osteoprogenitrici, al contrario, quello dell'osso corticale è distante dalla cavità midollare. Questa differenza fa ipotizzare l'esistenza di meccanismi di rimodellamento osseo diversi nell'osso spugnoso ed in quello compatto (corticale): le cellule deputate al rimodellamento dell'osso spugnoso si spostano dal midollo osseo rosso alla superficie dell'osso spugnoso direttamente, mentre raggiungono il sito di rimodellamento dell'osso corticale attraverso i vasi, dal circolo sanguigno¹⁴⁹.

Ruolo del sistema nervoso nel controllo dell'omeostasi ossea

La regolazione del processo di rimodellamento osseo è convenzionalmente attribuita all'intervento di ormoni, in grado di agire sia in modo autocrino che paracrino, ed alla capacità del sistema scheletrico stesso di rispondere alle variazioni degli stress di carico a cui è costantemente sottoposto. Negli ultimi anni, tuttavia, sempre maggiori evidenze sembrano sostenere il coinvolgimento del sistema nervoso nella regolazione del rimodellamento osseo grazie alla presenza di connessioni neurali efferenti¹⁵⁰.

Diversi autori hanno infatti descritto come la denervazione chimica o chirurgica si manifesti con una diminuzione della massa ossea, anche nelle ossa non direttamente soggette a sollecitazioni di carico. Ciò dimostra che la risposta alle diverse richieste funzionali non è il solo stimolo implicato nella regolazione del processo di rimodellamento osseo. Inoltre, analisi immunoistochimiche hanno dimostrato che lo scheletro è riccamente innervato e che le fibre nervose in esso presenti sono positive per l'espressione di diversi neuropeptidi e molecole segnale appartenenti a vie di trasduzione neuronali. La presenza di fibre nervose è stata dimostrata nel periostio, nell'osso compatto e nel midollo osseo e risulta particolarmente abbondante a livello delle cartilagini di accrescimento e nelle metafisi delle ossa lunghe, in prossimità delle quali si vengono a formare delle reti di fibre nervose che decorrono parallele ai vasi sanguigni a livello delle trabecole ossee¹⁵¹. Allo stesso modo, fibre nervose di nuova formazione sono state trovate in prossimità del sito di danno durante il processo di guarigione di una frattura¹⁵².

A livello molecolare, una prova del coinvolgimento del sistema nervoso nel rimodellamento osseo è la presenza, sulla membrana plasmatica di osteoblasti ed osteoclasti, di recettori funzionali per molte delle molecole segnale coinvolte nelle vie di trasduzione neuronali. Ad esempio è stata dimostrata la presenza di diversi sottotipi

di recettori adrenergici e recettori per i diversi neuropeptidi^{153, 154}. Come accennato in precedenza, diversi studi istologici hanno rivelato la presenza, a livello del tessuto osseo, di fibre nervose di origine sensoriale e simpatica, suggerendo l'esistenza di un legame tra il sistema nervoso ed il tessuto osseo. Tuttavia la prima evidenza sperimentale che ha supportato questo concetto è stata la scoperta che topi *knockout* per la leptina mostravano una elevata massa ossea. La leptina è un ormone prodotto dal tessuto adiposo che si trova in circolo in concentrazione proporzionale alle riserve lipidiche ed agisce come un importante segnale nella regolazione del bilancio energetico¹⁵⁵. Dal momento che non è stato possibile dimostrare la presenza dei recettori per la leptina sugli osteoblasti ma è noto che i recettori (ObRb) per questo ormone sono presenti a livello dell'ipotalamo, si ipotizza che la leptina controlli l'attività degli osteoblasti attraverso l'intervento del sistema nervoso centrale. Infatti, infusioni di leptina a livello dei ventricoli cerebrali ripristinano una normale massa ossea determinata dall'inibizione dell'attività degli osteoblasti. Il meccanismo attraverso il quale la leptina agisce sulla formazione di tessuto osseo è stato studiato e diverse vie di trasduzione del segnale sono state identificate. Quello maggiormente caratterizzato è mediato dal legame della leptina ai suoi recettori presenti a livello dei neuroni nell'ipotalamo ventromediale con attivazione delle fibre nervose simpatiche responsabili del rilascio di noradrenalina a livello del tessuto osseo. La noradrenalina, a sua volta, agisce legandosi ai recettori β -adrenergici presenti sugli osteoblasti, inibendoli¹⁵⁶. Le fibre nervose sensoriali presenti a livello del tessuto osseo sono responsabili della trasmissione di segnali nocicettivi che si manifestano in seguito a traumi. Tuttavia i neuroni sensoriali presenti a livello scheletrico sono responsabili della produzione di numerosi neurotrasmettitori quali sostanza P, CGRP e somatostatina. Tali neuropeptidi sono rilasciati in seguito alla stimolazione delle fibre nervose periferiche ma quale sia il meccanismo attraverso il quale queste fibre siano attivate, determinando il rilascio dei neurotrasmettitori, e regolate in condizioni patologiche come osteoporosi, osteoartrite, artrite reumatoide, cancro e fratture non è ancora del tutto compreso¹⁵³.

Valutazione dell'effetto della sostanza P sulla modulazione del differenziamento osteogenico

Obiettivo dello studio

La sostanza P è un membro della famiglia delle tachichinine, neuropeptidi presenti a livello del sistema nervoso centrale e periferico capaci di svolgere la funzione di neurotrasmettitori e neuromodulatori. Cinque peptidi costituiscono la famiglia delle tachichinine: sostanza P, neurochinina A, neurochinina B, neuropeptide K e neuropeptide γ . Le tachichinine sono associate a diverse azioni biologiche, come ad esempio la trasmissione del dolore, l'infiammazione neurogenica, la contrazione della muscolatura liscia e la vasodilatazione, mediate da tre diversi sottotipi di recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G: *Neurokinin 1 receptor* (NK1-r), *Neurokinin 2 receptor* (NK2-r) e *Neurokinin 3 receptor* (NK3-r)¹⁵⁷. Le azioni biologiche associate alla sostanza P sono mediate dal suo legame con il recettore a più alta affinità, *neurokinin 1 receptor* (NK1-r). Il gene che codifica per NK1-r nell'uomo si trova sul cromosoma 2 ed ha una struttura caratterizzata dalla presenza di sette domini transmembrana, con il dominio ammino-terminale extracellulare e quello carbossi-terminale intracellulare. In seguito al legame della sostanza P con NK1-r si attiva la cascata del segnale che determina l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio e la successiva fosforilazione di ERK 1/2, proteina membro della superfamiglia delle proteina MAPK, via di segnalazione coinvolta nella regolazione del differenziamento di MSC in osteoblasti¹⁵⁸. La sostanza P è una proteina costituita da 11 residui amminoacidici, localizzata principalmente a livello periferico in fibre nervose c non mielinizzate ed è sintetizzata nei gangli dorsali della radice in seguito a stimolazione delle terminazioni libere periferiche con *Nerve Growth Factor* (NGF)¹⁵⁹. Come sostenuto in precedenza, è noto che la sostanza P sia implicata in numerosi processi fisiologici e patofisiologici. Tuttavia, studi pubblicati negli ultimi anni su modelli animali, sembrano supportare un coinvolgimento di tale neuropeptide nel processo di rimodellamento osseo¹⁶⁰. In modelli animali sottoposti a simpatectomia guanidina-indotta, è stato osservato un aumento del fenomeno di riassorbimento osseo associato ad un aumento delle concentrazioni periferiche di sostanza P. Il fenomeno potrebbe essere spiegato come effetto della rimozione, mediata

da guanidina, delle terminazioni simpatiche: la simpatectomia, infatti, determina la diminuzione dell'assorbimento di *Nerve Growth Factor* (NGF) da parte delle terminazioni simpatiche danneggiate o eliminate mediante l'utilizzo della guanidina, determinando un aumento dell'assorbimento dello stesso fattore da parte delle fibre nervose sensoriali presenti nelle vicinanze del tessuto osseo. L'aumento dell'assorbimento di NGF da parte delle terminazioni sensoriali determina, a sua volta, una maggiore sintesi del trascritto che codifica per la sostanza P a livello dei gangli dorsali della radice, risultando in una elevata concentrazione locale di sostanza P.

Allo stesso modo, animali trattati con capsaicina hanno mostrato una diminuzione della massa ossea, associata ad un aumento del riassorbimento osseo e ad una diminuzione del tasso di formazione di osso di nuova sintesi. La capsaicina è una neurotossina responsabile della distruzione delle terminazioni sensoriali non mielinizzate contenenti sostanza P e *Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP)*, risultando in una diminuzione della concentrazione locale di sostanza P¹⁶¹. L'effetto di elevate concentrazioni locali di sostanza P, così come pure una generale diminuzione della sua presenza, sembra avere un effetto negativo sul metabolismo osseo: infatti un eccessivo rilascio risulta in un aumento del riassorbimento osseo ed una diminuzione della sua concentrazione sembra addirittura contribuire ad un effetto osteoporotico¹⁶². L'ipotesi è che la sostanza P possa mantenere il giusto equilibrio tra riassorbimento osseo e produzione di tessuto osseo neosintetizzato, suggerendo che diverse concentrazioni di sostanza P agiscono sul metabolismo osseo attraverso meccanismi diversi¹⁶³. L'effetto della SP sugli osteoclasti è stato abbondantemente descritto ed alcuni autori riportano la capacità di tale neuropeptide di potenziare il processo di osteoclastogenesi attraverso l'attivazione di NFκB. Tuttavia senza la precedente attivazione di RANKL, la sostanza P non è capace di indurre questo processo¹⁶⁴. Meno chiarezza vi è attorno all'effetto che la Sostanza P esercita sugli osteoblasti. Shih e Bernard¹⁶⁵ hanno riportato che la sostanza P stimola la proliferazione, l'attività ed il differenziamento di precursori mesenchimali di ratto, determinando un aumento del numero e delle dimensioni delle CFU prodotte da MSC. Al contrario, Adamus e Dabrowski¹⁶⁶ hanno dimostrato che la Sostanza P diminuisce la deposizione di calcio e l'attività dell'ALP in MSC di ratto. Azuma *et al.*¹⁶⁷ hanno descritto l'effetto inibitorio della sostanza P sul differenziamento osteogenico di precursori mesenchimali attraverso la soppressione dell'espressione di Cbfa-1, *Bone Morphogenic Protein* (BMP) ed ALP mentre Goto *et al.*,¹⁶⁸ hanno suggerito che la SP

stimola il differenziamento osteogenico in precursori osteogenici di ratto stimolando l'espressione di Cbfa-1, collagene di tipo I e osteocalcina dopo 14 giorni di coltura¹⁶⁸. Anche rispetto alla presenza di NK1r nelle cellule del tessuto osseo sono stati pubblicati risultati contrastanti. Alla luce delle diverse informazioni ottenute dalla letteratura, scopo di questo studio è la verifica dell'effetto della sostanza P su MSC commissionate in senso osteogenico. Partendo dall'applicazione del protocollo di espansione messo in atto nella prima parte di questa tesi, la sostanza P è stata aggiunta a tale sistema per valutarne il ruolo all'interno di questo modello cellulare. Lo studio si è articolato analizzando i marcatori, genici e biochimici, espressi nel corso del differenziamento in senso osteogenico valutando anche l'espressione del recettore (NK1-r) nelle diverse fasi del differenziamento osteogenico.

MATERIALI E METODO

Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando MSC commerciali (LONZA PT-2501). Le cellule sono state espanse in α -MEM addizionale al 20% FCS e con FGF 8.3 (ng/ml), penicillina 100U/ml e streptomina 0.1mg/ml allo scopo di stimolare la proliferazione cellulare senza indurre il differenziamento osteogenico. La sostanza P (Sigma, S6883) è stata ricostituita alla concentrazione 10^{-3} M in una soluzione di PBS addizionato con acido acetico 0.05M ed 1% BSA al fine garantirne la stabilità. La soluzione così ottenuta è stata aliquotata e mantenuta a -20°C fino al momento dell'utilizzo, ciascuna aliquota è stata utilizzata una sola volta, evitando cicli di congelamento e scongelamento. Al momento dell'uso la sostanza P è stata diluita nella medesima soluzione per ottenere la concentrazione desiderata. Al raggiungimento della prima confluenza (T1), le cellule sono state seminate nelle condizioni di controllo, α -MEM + 10%FCS+ 1%P/S, ed in terreno osteogenico, costituito da α -MEM + 10%FCS+ 1%P/S acido ascorbico 50 mg/L + desametasone 10^{-8} M. I due trattamenti verranno da ora in poi indicati nel testo con le sigle BM (Basal Media) ed OM (Osteogenic Media) rispettivamente. Oltre ai trattamenti di controllo le MSC sono state seminate nei rispettivi trattamenti: BM + sostanza P 10^{-10} M, BM + sostanza P 10^{-8} M e BM + sostanza P 10^{-6} M ed OM + sostanza P 10^{-10} M, OM + sostanza P 10^{-8} M e OM + sostanza P . Le cellule sono state mantenute nelle diverse condizioni di coltura per 7, 14 e 21 giorni, tempi stabiliti per monitorare le diverse fasi del differenziamento osteogenico ed il terreno di coltura è stato sostituito ogni 2 giorni. Agli stessi tempi sono stati effettuati saggi biochimici ed è stato estratto l'RNA totale dalle cellule nelle diverse condizioni di coltura allo scopo di correlare l'acquisizione del fenotipo osteogenico con il caratteristico profilo di espressione genica. Dopo 14 giorni di coltura nei rispettivi trattamenti le cellule sono state seminate e mantenute in coltura in terreno mineralizzante (α -MEM + acido ascorbico 50 mg/L + desametasone 10^{-8} M + DEX + b-glicerofosfato 2,5 g/L) fino al raggiungimento della confluenza allo scopo di valutare la capacità di formare noduli minerali (Figura 15).

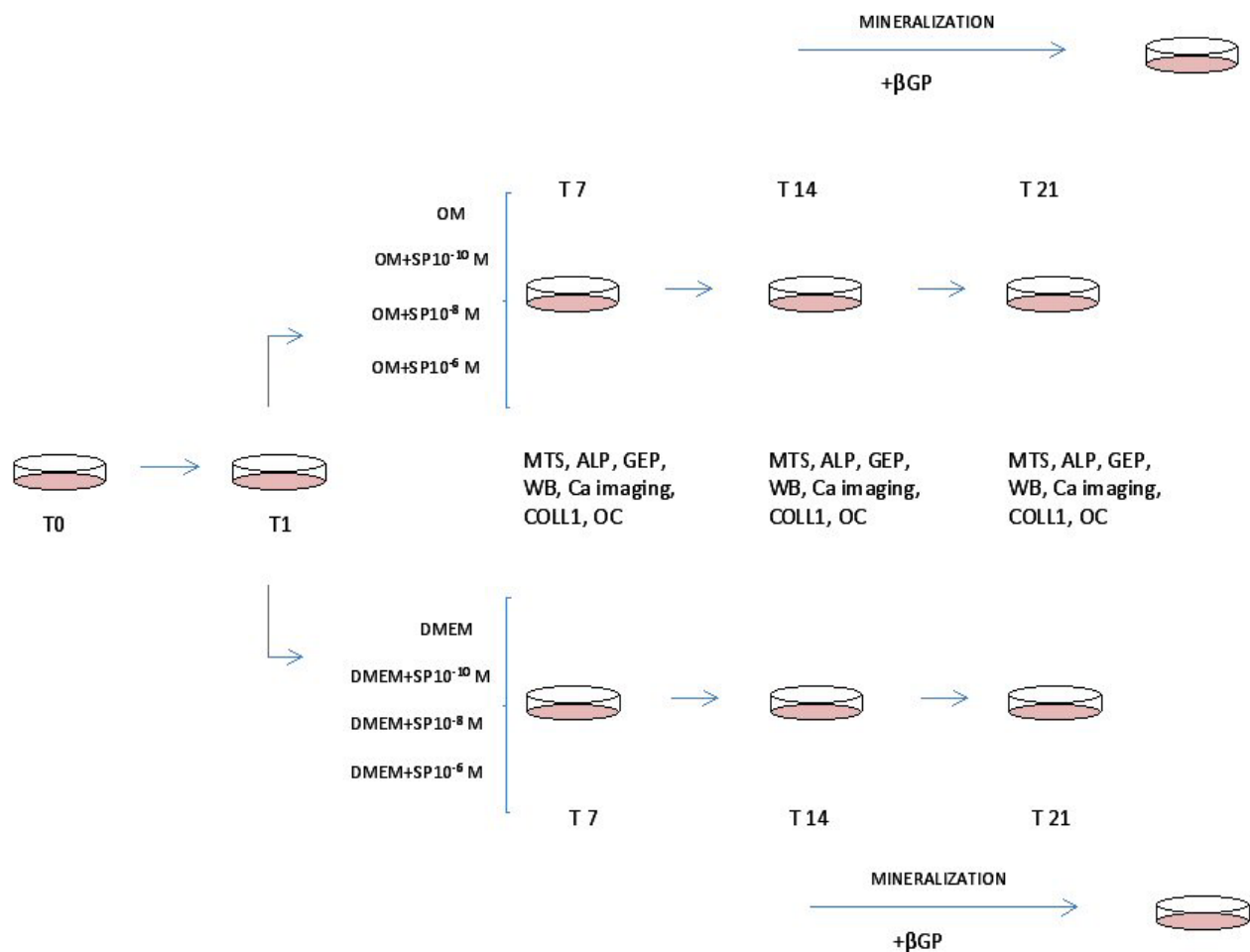


Figura 15: schema sperimentale per la valutazione del differenziamento osteogenico in seguito a trattamento delle MSC con sostanza P. Fino al raggiungimento della prima confluenza (T1) le cellule sono state mantenute in terreno basale addizionale al 20% FCS e con FGF 8.3 (ng/ml). Successivamente sono stati applicati i diversi trattamenti. test eseguiti: MTS (proliferazione); ALP, attività dell'ALP; GEP, profilo di espressione genica; WB, western blot; Ca imaging, valutazione dell'aumento della concentrazione intracellulare di calcio; coll1, quantificazione proteica mediante ELISA; OC, quantificazione proteica di osteocalcina mediante ELISA.

Caratterizzazione delle colture cellulari

Allo scopo di caratterizzare le colture di MSC sono stati effettuati, ai tempi indicati dal, i seguenti test:

- Profilo di espressione genica

- Test immunoenzimatici (ELISA) per la quantificazione della produzione di Collagene di tipo I ed osteocalcina
- Quantificazione dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP)
- Valutazione dell'espressione del recettore per la sostanza P (NK1-r) nel corso del differenziamento ed attivazione della cascata di attivazione del segnale attraverso Western Blot
- Verifica della funzionalità del recettore (Calcium imaging assay)
- Vitalità cellulare (MTS)
- Valutazione della capacità di deporre noduli minerali (Von Kossa staining)

Estrazione RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata al T0, in assenza cioè di trattamento e al raggiungimento della prima e della seconda confluenza, corrispondenti rispettivamente a 1 e 2 settimane di coltura, nelle diverse condizioni. L'estrazione è stata effettuata utilizzando Trizol Reagent (Invotrogen) seguendo il protocollo fornito dalla casa di produzione. L'eluizione è stata effettuata in 30 µL di H₂O DEPC. La concentrazione dell'RNA è stata determinata mediante lettura con lo strumento nanodrop a 260 nm e 280 nm. Una ratio A260/A280 fra 1.7 e 2.0 è indice di RNA sufficientemente puro. Una concentrazione pari ad 1µg di RNA è stato utilizzato per la reazione di retrotrascrizione effettuata mediante kit commerciale Applied Biosystem seguendo il protocollo del produttore. Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per reazioni di real time PCR.

Real time PCR: metodo syber green

La reazione di polimerizzazione a catena in '*real time*' è stata eseguita con Rotor Gene™ 6000 (Corbett Life Science, Cambridgeshire, UK), impiegando SYBR Green come sonda fluorescente (FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Applied Science). La master mix usata per la reazione è composta da: sonda fluorescente, hot-start polymerase, miscela di nucleotidi e buffer di amplificazione contenente MgCl₂ 1m. Il SYBR Green è un colorante fluorescente che si intercala nella doppia elica del DNA, a livello del solco minore. L'entità della fluorescenza aumenta, quindi, esponenzialmente all'aumentare del numero di copie del gene di interesse. La

fluorescenza è inoltre molto stabile, solo il 6% dell'attività viene persa nell'arco di 30 cicli di amplificazione. All'inizio del processo di amplificazione il DNA è denaturato, quindi presente come singola elica. Il colorante, ancora libero in soluzione, produce un minimo segnale di fluorescenza percepito come background e sottratto automaticamente dal software di analisi (LightCycler Software 3.5, Idaho Technology). L'emissione di un segnale più intenso si ha dal momento in cui il colorante si lega al DNA, ossia dopo l'annealing dei primers. Il segnale fluorescente è rilevato al termine di ogni ciclo, quando l'estensione è completata ed una quantità sempre maggiore di SYBR Green si lega al prodotto sintetizzato. La reazione è monitorata in tempo reale e l'inizio della crescita esponenziale del prodotto di amplificazione corrisponde al ciclo soglia, ossia al ciclo in cui diviene possibile rilevare una quantità di fluorescenza relativa (relative fluorescence units = RFU) rispetto al background (baseline). La relazione fra ciclo soglia e concentrazione di templatò è quindi proporzionalmente inversa. L'attendibilità dei dati ottenuti tramite PCR real time è valutata mediante l'analisi della curva di melting. Essa è generata dalla rilevazione dei valori di intensità di fluorescenza acquisiti continuamente durante il ciclo di melting. Il ciclo di melting consiste in incrementi graduali della temperatura, partendo dal valore della T di annealing fino a 95°C. In tale intervallo di temperature si verifica la fusione (melting) del prodotto di amplificazione con la liberazione del fluorocromo in esso intercalato che dà origine al picco di melting (-dF/dT). Ogni prodotto ha una sua specifica temperatura di melting, pertanto la presenza di un singolo picco nella curva di melting indica l'assenza di prodotti aspecifici.

GENE	ID NUMBER	PRIMERS SEQUENCE (5'-3')	
GAPDH	(NM_002046.3)	Sense	gccaaaagggtcatcatctc
		Antisense	ctaagcagttggtggtgcag
Runx2	(NM_001024630.2, NM_004348.3)	Sense	gtgcctaggcgcattca
		Antisense	cacctgcctggtctcttta
ALPL	(NM_000478.3)	Sense	cccttactgccatcctgta
		Antisense	agactgcgctgtagttgt

Tabella 3: lista primers selezionati per l'analisi dell'espressione dei geni coinvolti nel differenziamento osteogenico mediante real time PCR, Syber green

Quantificazione di osteocalcina: test immunoenzimatico (ELISA)

La quantità di osteocalcina è stata rilevata nei surnatante delle MSC, a diversi tempi e trattamenti, utilizzando il metodo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Il saggio MicroVue Osteocalcin è un saggio immunologico competitivo. Il saggio è stato effettuato mediante un kit commerciale (Metra CICP EIA) contenente strisce (stripwell) rivestite con osteocalcina, un anticorpo anti-osteocalcina di topo, un coniugato di fosfatasi alcalina IgG anti-topo e un substrato pNPP per la quantificazione dell'osteocalcina. Standard e campioni sono stati analizzati in doppio e, al termine di ogni incubazione, la piastra è stata sottoposta a tre lavaggi (Multiwash, PBI, Italia) con apposito buffer (300 µl). Sono stati dispensati 100µl in ciascun pozzetto: i campioni non diluiti e gli standard in un range di concentrazione compreso tra da 0 a 30ng/ml, per ottenere una curva di riferimento. La prima incubazione è stata di due ore a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 100µl di anticorpo anti-osteocalcina murino e la miscela è stata incubata per 60 minuti a temperatura ambiente. Per la rivelazione sono stati aggiunti 150µl di coniugato enzimatico costituito da un anticorpo di capra anti-topo con fosfatasi alcalina e la piastra è stata mantenuta a temperatura ambiente per 40 minuti. Infine, 100µl di substrato attivo, a base di paranaftolo, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e lasciati in incubazione per 35 minuti. Al termine di questa fase, la reazione è stata fermata con soluzione bloccante, a base di NaOH 1 N. La piastra è stata poi letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Quantificazione della fosfatasi alcalina intracellulare

La fosfatasi alcalina è stata valutata come marcatore del differenziamento osteogenico. La concentrazione di fosfatasi alcalina cellulare è stata determinata, al T2, sul lisato cellulare. L'attività dell'ALP è stata misurata con un metodo biochimico basato sulla conversione *del p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate* (Sigma-Aldrich) in p-nitrofenolo. Le cellule sono state lisate con SDS allo 0,01% ed il substrato della reazione (p-nitrofenilfosfato) è stato aggiunto in proporzione 1:1 ai lisati cellulari. Dopo un'incubazione di 15 minuti a 37°C, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei campioni a 405 nm, utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre (Spectra III, Tecan, Austria). L'attività della ALP è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza su una curva standard costituita da diluizioni seriali di una soluzione di p-nitrofenolo (range di concentrazione 0-40 mmoli). I risultati sono stati espressi come

nmoli di p-nitrofenolo formato in 1 min e normalizzati per il quantitativo totale di proteine (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL). L'analisi citochimica della ALP è stata effettuata sulle cellule utilizzando un kit commerciale (Sigma-Aldrich).

Western Blot

Espressione di NK1-r

L'espressione del recettore per la sostanza P, *Neurokinin 1 receptor*, (NK1r) è stata valutata a diversi tempi corrispondenti alle diverse fasi del differenziamento osteogenico mediante Western blot. Le cellule sono state lisate in un buffer di lisi (Laemli: 4% SDS, 20% glycerol, 120 mM Tris pH 6.8 e milliQ) ed i lisati proteici sono stati quantificati allo spettrofotometro (assorbanza a 562 nm) mediante Bradford protein assay reagent kit (Pierce), che consente la determinazione della proteina totale presente in ogni campione. Una quantità pari a 30 µg totali di proteina di ogni lisato sono stati mescolati con 5X loading buffer e bolliti per 5'; i campioni sono stati quindi caricati su gel di poliacrilamide al 10% e sottoposti a corsa elettroforetica per 5 minuti a 300 V e quindi 2 ore e 30 minuti a 80 V. Successivamente le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa; dopo aver controllato l'avvenuto trasferimento tramite colorazione con rosso ponceau, la membrana è stata saturata per 2h con PBS tween addizionato al 5% con BSA. La membrana è stata quindi incubata overnight a 4°C in agitazione con anticorpo primario di coniglio anti-NK1r (ab466, ABCAM, Cambridge, UK), diluito 1:1000 in PBS tween addizionato al 2% con BSA. Il filtro è stato poi lavato in TBST 1X (5 volte per 5 minuti) prima di essere incubato con anticorpo secondario anti-coniglio coniugato a perossidasi HRP (Amersham) diluito 1:1000 in latte privo di grassi. Dopo lavaggio in TBST 1X (5 volte per 5 minuti) la membrana è stata trattata con reattivo chemiluminescente ECL (Amersham). Le bande proteiche sono quindi state visualizzate esponendo per 2 minuti alla membrana una lastra fotosensibile successivamente fissata e sviluppata e quantificate mediante un software dedicato per la valutazione densitometrica delle bande (Image J).

Valutazione dell'attivazione del segnale di trasduzione mediato dal legame sostanza P-NK1r (NK1r)

Le MSC sono state seminate alla concentrazione di 5000 cellule/cm² nelle condizioni di controllo: BM ed OM fino al raggiungimento della confluenza. Successivamente le

cellule sono state lavate con PBS 1X e trattate per 30 minuti, 20 minuti, 10 minuti, 5 minuti, 1 minuto e 0 minuti con sostanza P 1 μ M allo scopo di verificare l'attivazione del pathway delle MAPK, attraverso la fosforilazione di ERK1/2 membro di tale famiglia, per azione diretta della sostanza P. Le cellule, dopo i tempi di esposizione sopra descritti, sono state trattate con una soluzione lisante Laemli buffer e disgregate con uno scraper. Il lisato ottenuto è stato bollito per 5', sottoposto a digestione meccanica utilizzando siringhe con ago del diametro di 23 mm. Il campione proteico è stato quantificato con Bradford assay (Pierce) ed è stato riposto a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Il western è stato in seguito eseguito secondo la metodica sopra descritta utilizzando l'anticorpo primario per la rilevazione di ERK1/2 (Ab 4685, cell signaling) .

Valutazione della mobilizzazione delle riserve intracellulari di calcio in colture di MSC.

Per verificare la mobilizzazione delle riserve di calcio in seguito ad esposizione a sostanza P, le MSC sono state seminate su coverslips e coltivate per 24h, 7 e 14 giorni in terreno di base e terreno osteogenico. Le colture sono state mantenute in coltura in atmosfera controllata a 37°C e 5% CO₂. Successivamente le cellule sono state incubate in buffer (Hanks' Balanced Salt Solution with 10mM glucose, 10mM HEPES, pH 7.4) in presenza di Fura-2-AM (2 μ M) and probenecid (1mM) per 60 minuti a 37°C. Le coverslips sono state lavate e montate su una cameretta aperta, alloggiamento per l'esposizione delle sostanze da testare. Le cellule sono state esposte a sostanza P 1 μ M in perfusione continua a 37°C e la risposta cellulare è stata monitorata. La fluorescenza delle cellule è stata misurata a 340nm e 380nm in eccitazione ed a 510 nm di emissione utilizzando un microscopio basato sul sistema di immagine (PTI, Ford, UK). Le cellule sono state esposte a ionomicina 1 μ M, uno ionoforo che stimola il passaggio di calcio attraverso la membrana, per controllare lo stato vitale delle MSC e valutare il caricamento del Fura-2-AM. Le cellule sono state trattate secondo il seguente schema (Figura 16).



Figura 16: lo schema descrive il protocollo sperimentale utilizzato: la fase di lavaggio con Hanks buffered solution (HBBS) è necessario allo scopo di ripristinare l'equilibrio salino cellulare. Le cellule sono state esposte successivamente a SP 10^{-6} M per verificare la presenza nelle cellule in coltura di NK1r e la sua attività. Successivamente le cellule sono state di nuovo esposte ad HBSS per ripristinare l'equilibrio salino ed infine testate con ionomicina per confermare la vitalità cellulare.

MTS assay: Proliferazione cellulare

La vitalità cellulare è stata analizzata tramite CellTiter 96® AQueous (Promega UK, Southampton, United Kingdom), secondo le istruzioni fornite dal produttore. Il cellTiter96 è un saggio non radioattivo basato su un metodo colorimetrico, utilizzato per determinare la proliferazione cellulare. Il kit è composto da una soluzione di tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS) ed phenazine methosulfate, PMS. La conversione dell'MTS in formazano avviene. L'MTS è ridotto dalle cellule in formazano, ad opera delle deidrogenasi, enzimi presenti nelle cellule metabolicamente attive prodotto solubile nel mezzo di coltura. L'assorbimento del formazano è letto a 490nm ed è direttamente proporzionale al numero di cellule vive in coltura. Il mezzo di coltura delle MSC è stato rimosso dai pozzetti e sostituito, in condizioni di sterilità, con terreno fresco contenente un volume di MTS e PMS in proporzioni 1:20, la miscela di coltura così ottenuta è utilizzata in proporzione 1:5 nel terreno di coltura. Un pozzetto privo di cellule, contenente la miscela di reazione è stato utilizzato per la correzione dei valori di fluorescenza rilevati nei campioni (bianco). Le piastre sono state incubate a 37°C, a livelli di CO₂ pari al 5% per 3 ore e 30 minuti. Al termine dell'incubazione il medium è stato trasferito in una nuova piastra; la fluorescenza è stata rilevata con un lettore per micropiastre (Cytofluor™ 2350, Millipore, Bedford, MA) utilizzando una lunghezza d'onda (λ) di eccitazione emissione di 490 nm. I risultati del saggio sono stati espressi come media delle unità di fluorescenza relativa (RFU) rilevate in 3 pozzetti.

RISULTATI

Caratterizzazione delle colture di MSC

Prima di valutare la capacità della sostanza P di indurre il differenziamento in senso osteogenico è stata saggiata l'abilità delle MSC di rispondere agli stimoli osteogenici. A tale scopo le MSC sono state trattate con BM ed OM per 2 settimane ed è stata valutata l'espressione dei marcatori molecolari e funzionali caratteristici del differenziamento osteogenico.

Sono state valutate l'espressione di Runx2, fattore di trascrizione a monte della cascata del segnale responsabile del differenziamento osteogenico, e della ALP, enzima responsabile del trasferimento di gruppi fosfato alla matrice extracellulare allo scopo di mineralizzarla. I dati evidenziano un aumento significativo dei livelli di espressione dei geni presi in esame per le MSC mantenute in coltura con OM; Runx2 e ALP mostrano elevati livelli di espressione già dopo una settimana di coltura e la tendenza è confermata dopo 2 settimane. Al contrario, nessun aumento significativo dei livelli di espressione si evidenzia in cellule mantenute in terreno privo di acido ascorbico e desametasone (BM) (Figura 17A).

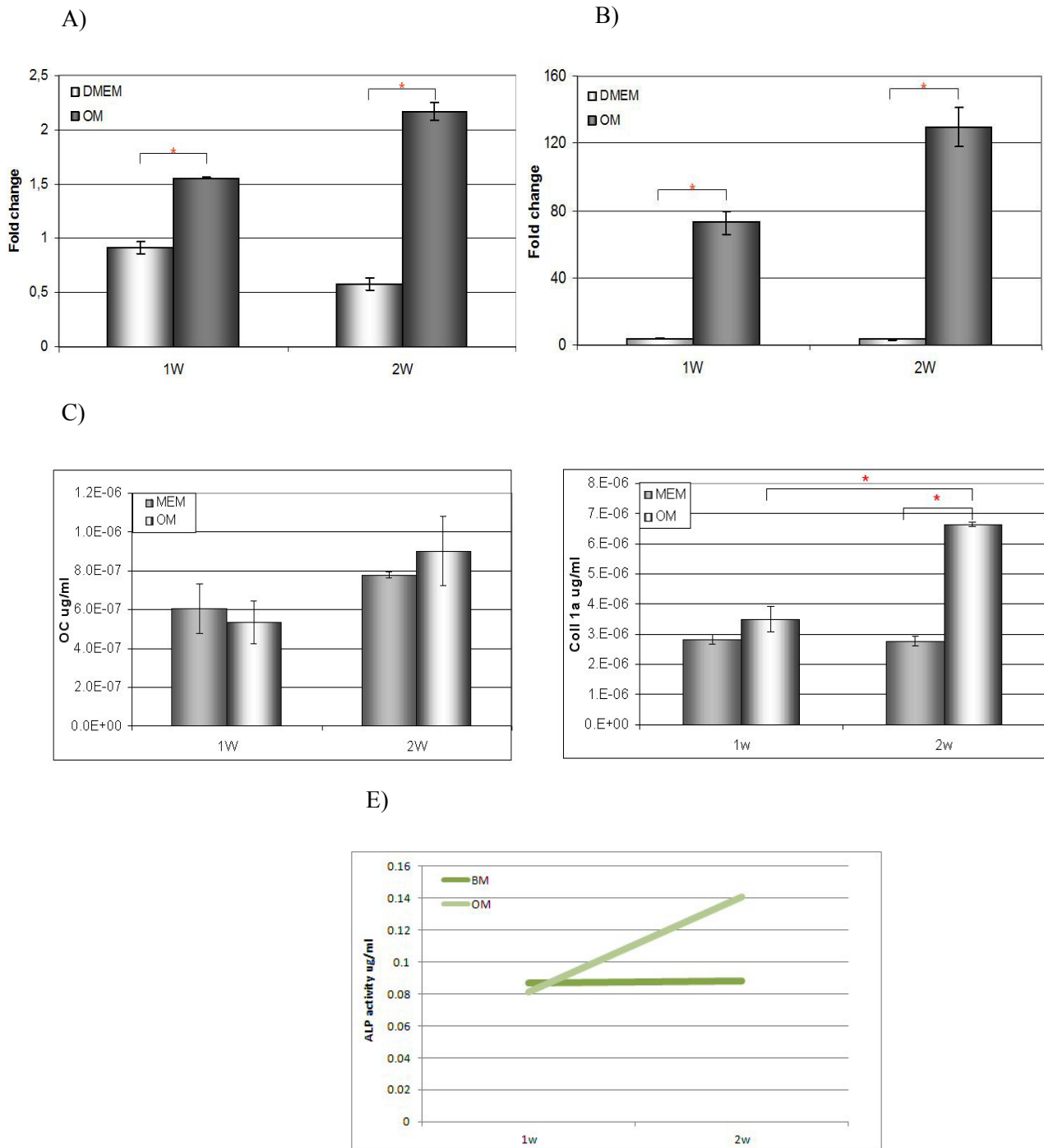


Figura 17 : profilo di espressione genica di *gene bone-related*. Il grafico rappresenta il fold change (FC) nel corso del differenziamento rispetto alla condizione basale e nelle diverse condizioni. A) RUNX2. B) ALP. Determinazione della concentrazione di osteocalcina (C) e collagene di tipo I (D) espressi in $\mu\text{g/ml}$ rilevati con test immunoenzimatico ELISA. I valori sono espressi come media \pm errore standard di 2 esperimenti. E) valutazione dell'attività della ALP. I dati sono espressi come la media dei FC.

Allo scopo di verificare l'effettiva attività della ALP è stato eseguito un test funzionale. In accordo con i dati ottenuti in *realtime* PCR anche l'attività dell'ALP è aumentata in risposta al trattamento con OM. Infine è stata valutata anche la produzione di collagene di tipo I α (Figura 17C), principale proteina prodotta dalle MSC, e di osteocalcina (Figura 17D), la più abbondante proteina non collagenica della matrice extracellulare. I dati confermano la progressione verso un fenotipo osteogenico delle cellule mantenute in coltura in terreno addizionato con ascorbato e desametasone (OM). Presi insieme, questi risultati confermano la capacità degli additivi utilizzati, acido ascorbico e desametasone, di indurre il differenziamento osteogenico (Figura 17B).

Determinazione dell'espressione del recettore, NK-r, in MSC

NK1-r è il recettore con più alta affinità per la sostanza P e la sua presenza a livello della membrana plasmatica è fondamentale affinché le cellule possano essere influenzate da tale peptide. Per tale motivo è importante verificare la presenza del recettore nel modello cellulare preso in esame. La determinazione dell'espressione del recettore è stata valutata in Western blot in cellule mantenute per 2 settimane in BM ed OM (Figura 18). Dal blot è possibile osservare la presenza del recettore indipendentemente dal terreno utilizzato. E' interessante notare come i livelli di espressione del recettore diminuiscano nel corso del tempo in entrambi i trattamenti.

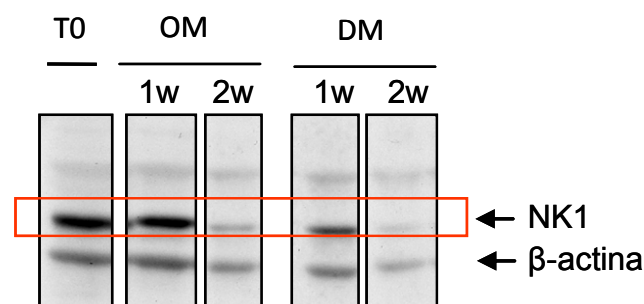


Figura 18: Western blot. La membrana mostra l'espressione del recettore (NK1-r) al T0, e dopo 1 e 2 settimane di trattamento (OM e BM) e l'espressione della proteina di riferimento, β actina.

Determinazione dell'attività di NK1-r

La prima conseguenza del legame tra la sostanza P ed il suo recettore *Neurokinin receptor*, NK1-r, è l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio. Il calcio rappresenta il più comune secondo messaggero coinvolto nella cascata di trasduzione del segnale ed è quindi una delle vie per dimostrare la presenza di recettori funzionali sulla membrana cellulare. L'attività del recettore è stata valutata grazie all'incorporazione da parte delle MSC di Fura-2-am, un colorante fluorescente che si lega selettivamente al calcio libero presente nella cellula. L'utilizzo di un microscopio dotato di monocromatore ha consentito la valutazione della mobilitazione intracellulare di calcio in seguito a stimolazione con sostanza P.

E' evidente che quando la sostanza P è aggiunta alle cellule, come è mostrato dalle frecce, la concentrazione intracellulare di calcio aumenta. Meno cellule sembrano rispondere dopo 2 settimane di trattamento se comparate con 24h e 7 giorni time point.

Questa osservazione è la diretta conseguenza della diminuzione dei livelli proteici di NK1-r, mostrati in western blot, dopo 2 settimane di trattamento in OM E BM.

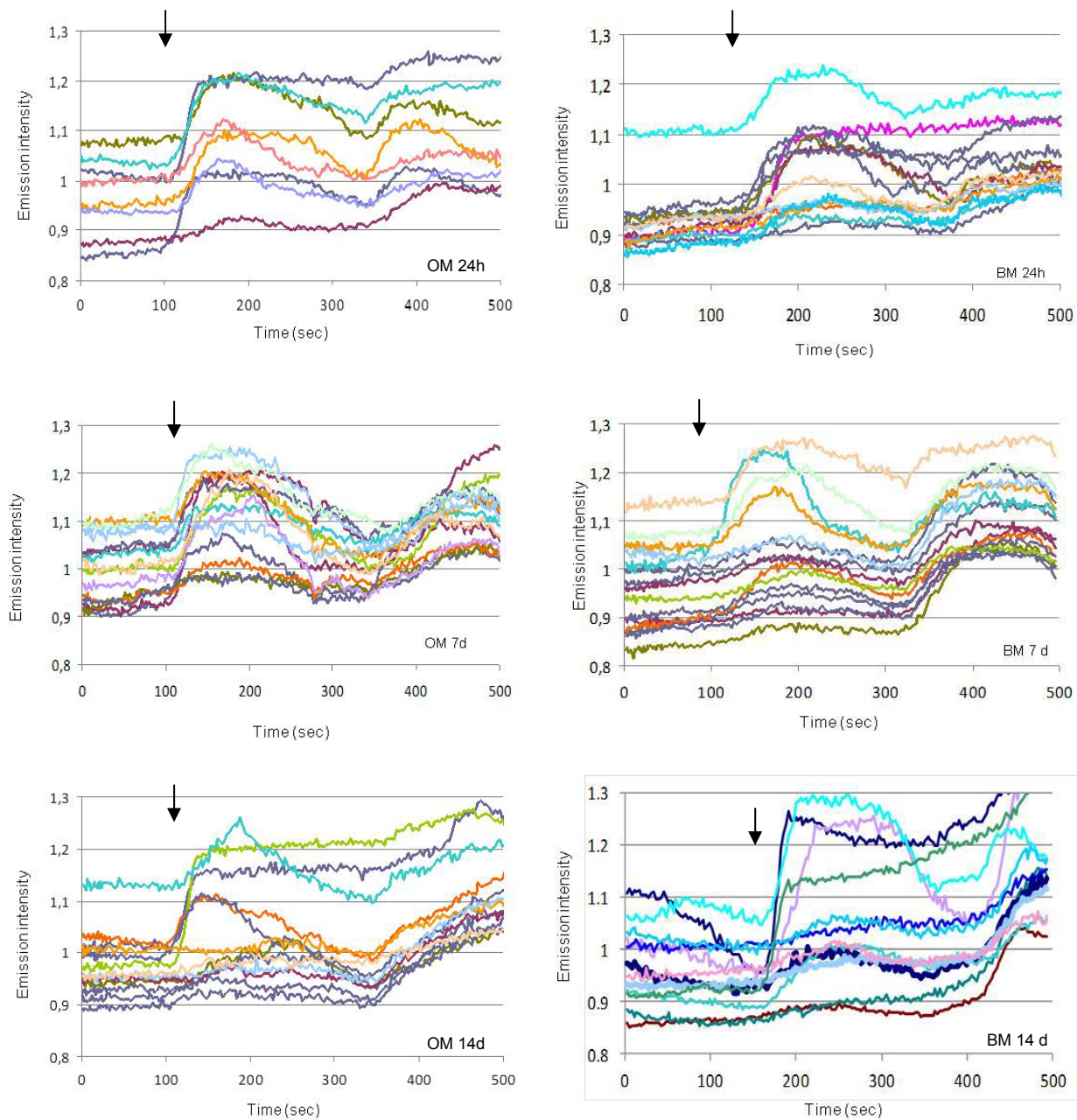


Figura 19: incorporazione Fura-2. Aumento della concentrazione $[Ca^{2+}]_i$. Comportamento rappresentativo di MSC esposte a SP $1\mu M$ dopo 24h, 7 giorni e 14 giorni in OM. Ciascuna linea nei grafici è rappresentativa del comportamento di una singola cellula visibile nel campo del microscopio.

Alla luce di questi risultati è chiaro che sia le cellule in terreno di controllo (BM) sia le cellule in terreno osteogenico (OM) esprimono, nei diversi tempi presi in considerazione, recettori funzionali per la sostanza P.

In seguito all'aumento della concentrazione intracellulare di calcio è stata verificata l'abilità del recettore attivato di stimolare componenti a valle della cascata del segnale. Un evento importante in questa *pathway* è rappresentata dalla fosforilazione di ERK1/2, proteina membro della famiglia delle MAPK. Allo scopo di valutare il proseguimento della cascata del segnale successiva al legame SP-NK1r è stata verificata l'effettiva fosforilazione di ERK1/2 in Western blot in seguito ad esposizione a sostanza P.

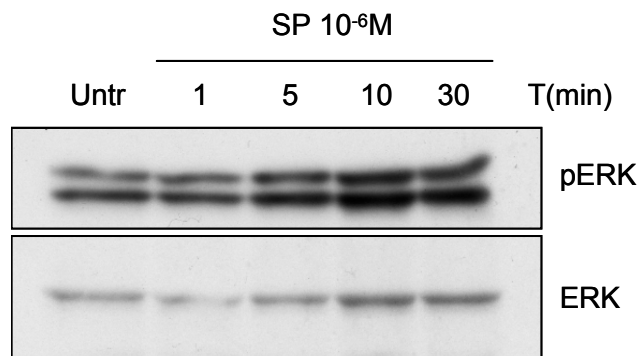


Figura 20: valutazione dell'attivazione del segnale attraverso Western blot. E' stata rilevata la presenza della forma fosforilata di ERK1/2 utilizzando un anticorpo specifico e successivamente è stata determinata la presenza di ERK totale.

Il blot nella figura 20 evidenzia l'aumento del segnale di fosforilazione di ERK in funzione del tempo. Il segnale rimane stabile almeno fino a 30 minuti dall'esposizione, segno evidente ulteriore della funzionalità del recettore.

In conclusione è stato dimostrato che le MSC esprimono NK1r e che, per questo motivo, le cellule sono in grado di rispondere alla presenza di sostanza P. Come conseguenza dell'attivazione del recettore è stata verificata in un primo momento l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio e, proseguendo nel signaling, l'avvenuta fosforilazione di ERK 1/2.

Valutazione dell'effetto della sostanza P sull'induzione del commissionamento osteogenico

Dopo aver valutato la capacità del terreno addizionato con acido ascorbico e desametasone (OM) di indurre il differenziamento osteogenico in colture di MSC, l'effetto della sostanza P sul modello sperimentale appena analizzato è stato valutato aggiungendo tale peptide al BM e OM in tre diverse concentrazioni (10^{-10} M, 10^{-8} M e

10^{-6} M). Allo scopo di determinare il ruolo della sostanza P nel processo di commissione osteogenico, le fasi cruciali del differenziamento, come proliferazione, espressione dei marker osteogenici e mineralizzazione della matrice extracellulare, sono state analizzate.

Valutazione dell'effetto della sostanza P sulla proliferazione cellulare

In questo esperimento è stata valutata la capacità della sostanza P di indurre la proliferazione cellulare. Le MSC sono state trattate con diverse concentrazioni di tale peptide per 10 giorni ed il saggio è stato effettuato, a tempi stabiliti, utilizzando lo MTS assay, un saggio indicatore dell'attività cellulare qui considerato come indice di proliferazione (Figura 21). Le condizioni di controllo, BM ed OM, sono state valutate allo scopo di normalizzare l'effetto della sostanza P ad una condizione basale. La proliferazione cellulare era comparabile tra i diversi trattamenti all'interno dello stesso gruppo, evidenziando una generale tendenza all'aumento della proliferazione in presenza di OM. Analizzando il comportamento delle MSC trattate con OM addizionato con concentrazioni diverse di sostanza P è possibile osservare un aumento significativo ($p < 0,05$) del tasso proliferativo se comparate con le MSC mantenute in BM addizionato con le stesse concentrazioni di SP.

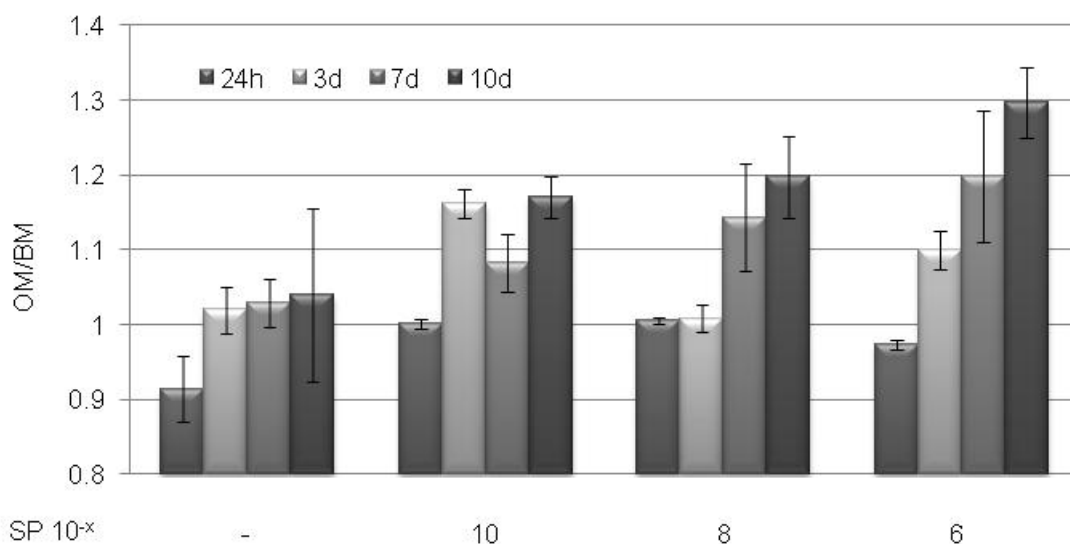


Figura 21: Proliferazione cellulare. Il grafico esprime la ratio (OM/BM) della media \pm l'errore standard delle unità di fluorescenza relativa (RFU).

Le cellule hanno mantenuto, nel corso degli esperimenti, la tipica morfologia *fibroblast-like*. Le immagini in figura 22 sono indicative del diverso tasso di proliferazione osservato dopo 10 giorni di trattamento in BM addizionato con 10^{-6} M SP, a destra ed OM con 10^{-6} M SP, a sinistra.

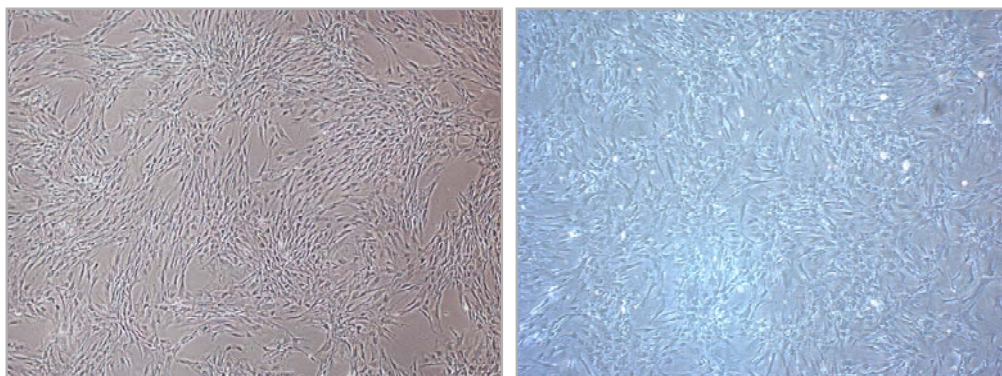


Figura 22: morfologia cellulare. Le immagini rappresentano MSC in BM ed OM dopo 10 giorni di coltura.

A livello molecolare abbiamo precedentemente osservato un aumento significativo dei livelli di espressione di Runx2 ed ALP in MSC trattate per 7 e 14 giorni in OM.

Dal grafico è evidente che lo stesso comportamento è riscontrabile anche in presenza di sostanza P (Figura 23). I livelli di espressione di Runx2 aumentano in modo significativo già dopo una settimana di coltura in OM addizionato con sostanza P se confrontati coi livelli espressi dalle cellule mantenute in coltura con BM addizionato con le stesse concentrazioni di sostanza P. Lo stesso andamento è mantenuto anche dopo 2 settimane di trattamento. Osservando il grafico dei livelli di espressione di ALP (Figura 24) è possibile notare che le cellule mantenute in OM presentano elevati livelli di espressione dopo una settimana di coltura, mentre in presenza di sostanza P è possibile osservare, allo stesso tempo, che i livelli del trascritto rimangono bassi. Tuttavia, dopo 2 settimane di coltura, l'espressione di ALP, raggiunge, anche in presenza di sostanza P, gli stessi livelli del trattamento di controllo (OM) in tutte le condizioni in presenza di sostanza P. E' stato verificato in precedenza che le MSC trattate con BM non mostravano aumenti significativi dei livelli di espressione di Runx2 ed ALP. Allo stesso modo abbiamo osservato che la sostanza P non è in grado di indurre l'espressione di tali geni.

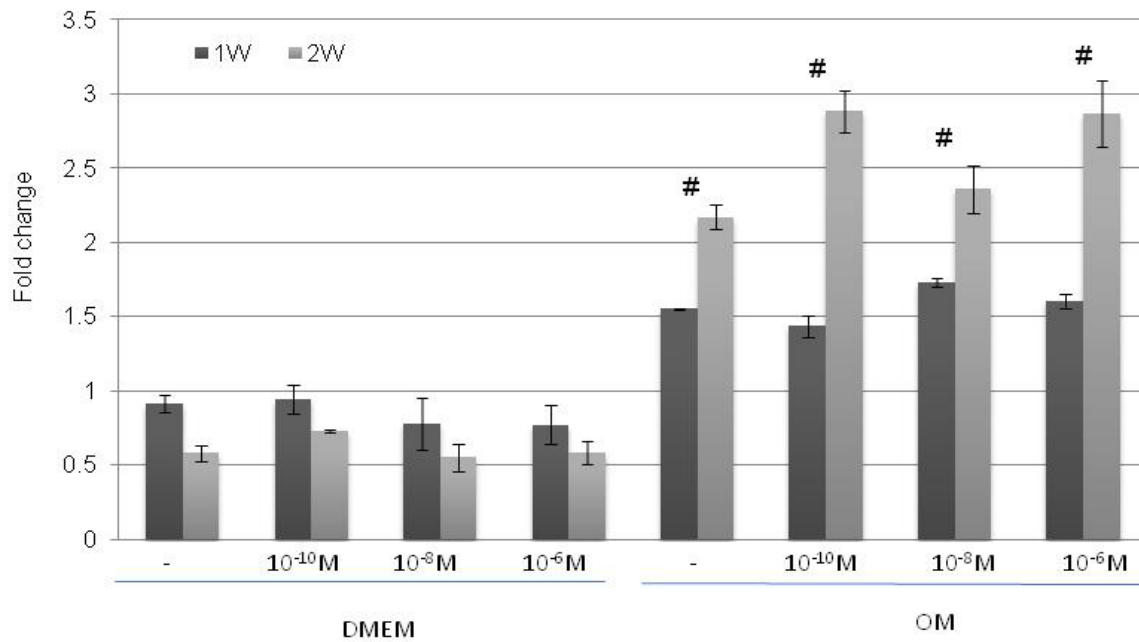


Figura 23: livelli di espressione di Runx2 (mRNA). I valori sono la media \pm l'errore standard del fold change tra il gene di interesse ed il gene di riferimento (GAPDH). #: indica differenza significativa tra OM e BM in tutte le condizioni e per tutti i tempi ($p < 0.05$)

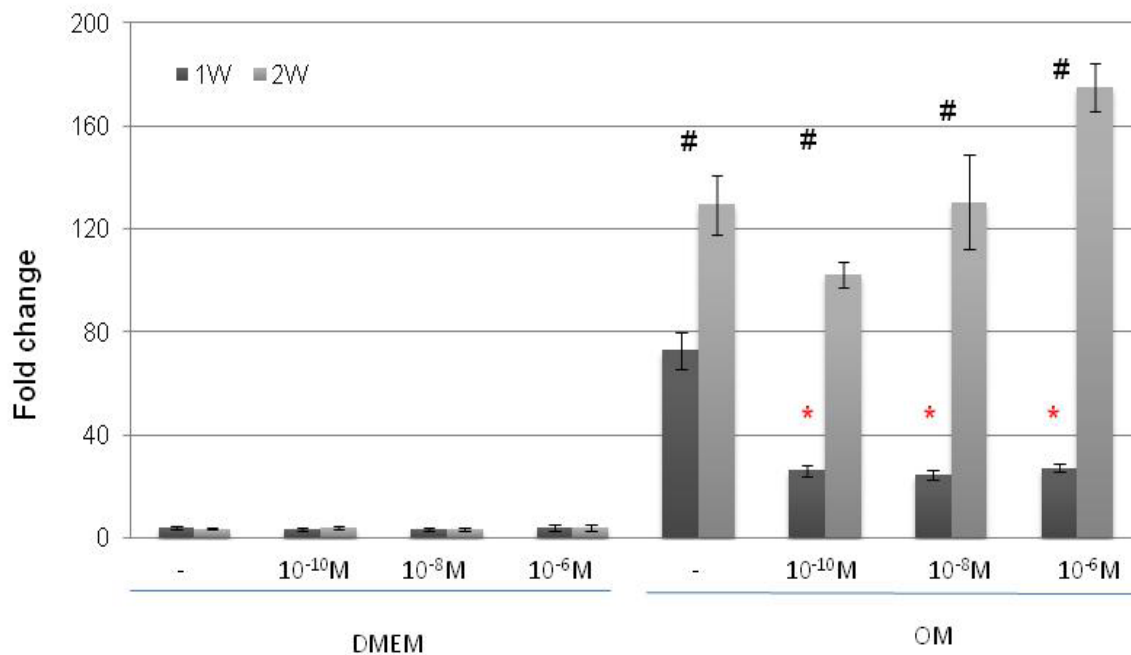


Figura 24: livelli di espressione di ALP (mRNA). I valori sono la media \pm l'errore standard del fold change tra il gene di interesse ed il gene di riferimento (GAPDH). #: indica differenze significative tra OM e BM in tutte le condizioni e per tutti i tempi ($p < 0.05$); *: indica differenza significativa all'interno del gruppo OM ($p < 0.05$).

E' stata in seguito determinata, mediante test immunoenzimatico ELISA, la concentrazione di collagene di tipo I nel supernatante delle cellule mantenute nelle diverse condizioni di coltura.

Dalla figura 25 è possibile osservare che, dopo 2 settimane di coltura in OM i livelli di produzione di collagene di tipo I sono significativamente più elevati se paragonati con il trattamento in OM addizionato con sostanza P. Tuttavia dopo 3 settimane di coltura variazioni significative nella produzione di collagene di tipo I sono state osservate in presenza di sostanza P. E' interessante notare che l'effetto è maggiormente visibile in MSC in seguito ad esposizione a concentrazioni pari a 10^{-8} M. Per concentrazioni superiori (10^{-6} M) o inferiori (10^{-10} M) a tale valore si osserva un comportamento simile a quello osservato nella condizione di controllo, ovvero OM in assenza di sostanza P. Non è infine possibile riscontrare differenze significative nella produzione del collagene di tipo I per tutte le MSC mantenute in BM addizionato con sostanza P.

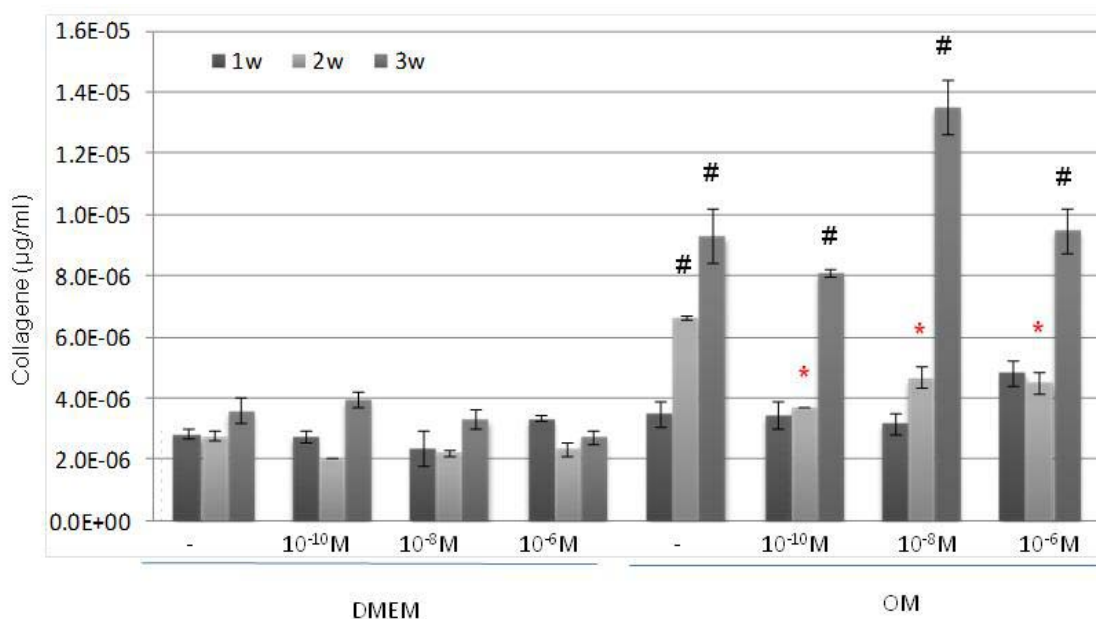


Figura 25: determinazione della quantità di collagene di tipo I prodotta dalle cellule nelle diverse condizioni di coltura. I valori sono espressi in µg/ml.

Valutando la produzione di osteocalcina (Figura 26) è possibile osservare che la presenza di sostanza P in combinazione con OM determina un aumento significativo della produzione della proteina presa in esame. E' interessante notare come, anche nel caso dell'osteocalcina, è evidente una significativa induzione della produzione di tale

proteina alla stessa concentrazione già osservata in precedenza per la produzione del collagene di tipo I. Al contrario, non si osservano variazioni significative in tutte le condizioni mantenute in coltura in presenza di BM addizionato con sostanza P.

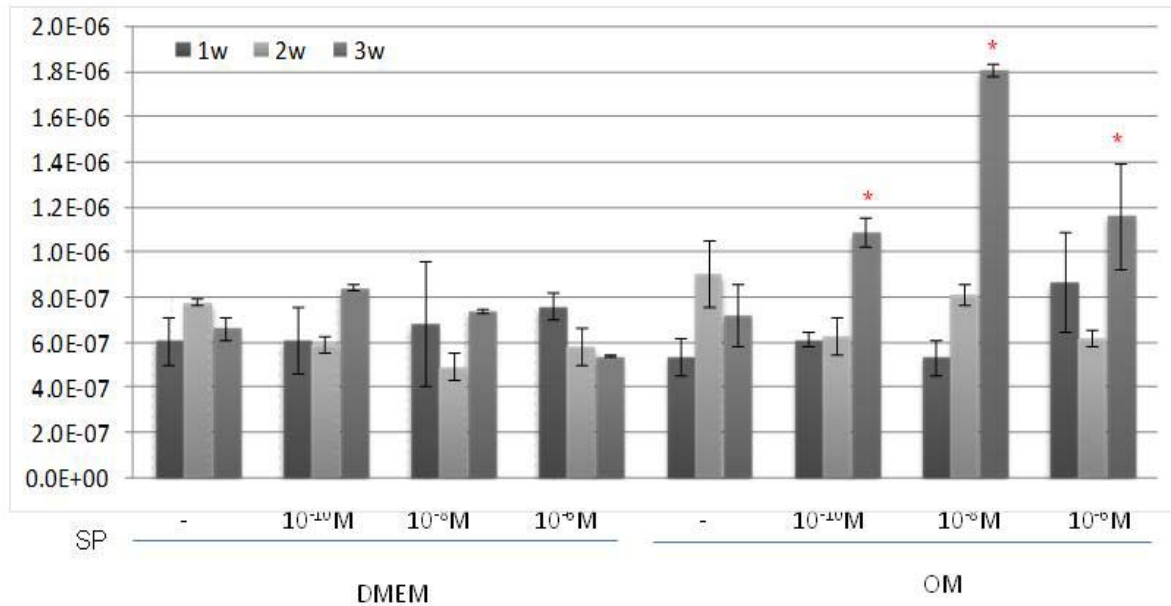


Figura 26: determinazione della quantità di osteocalcina prodotta dalle cellule nelle diverse condizioni di coltura. I valori sono espressi in µg/ml.

Allo scopo di completare la caratterizzazione delle colture di MSC in presenza di sostanza P è stata valutata l'attività dell'ALP in tutte le condizioni di coltura. Dalla figura 27 è possibile osservare un grafico esemplificativo dell'andamento riscontrato. Analizzando il comportamento delle MSC mantenute in coltura con OM addizionato con sostanza P è possibile notare un aumento dell'attività dell'ALP in risposta al tempo. Malgrado le variazioni osservate per i livelli di trascritto del gene che codifica per la fosfatasi alcalina in risposta alla presenza di sostanza P, l'attività dell'ALP non sembra essere condizionata dalla sua presenza. Infatti, dopo 2 settimane di coltura è possibile osservare lo stesso livello di attività enzimatica. Osservando il comportamento delle MSC mantenute in coltura con BM in presenza o assenza di sostanza P non è possibile apprezzare differenze tra i due tempi presi in considerazione. L'attività dell'ALP quindi rimane a valori costanti e non sembra essere influenzata dal tempo, ne tanto meno dal trattamento con sostanza P.

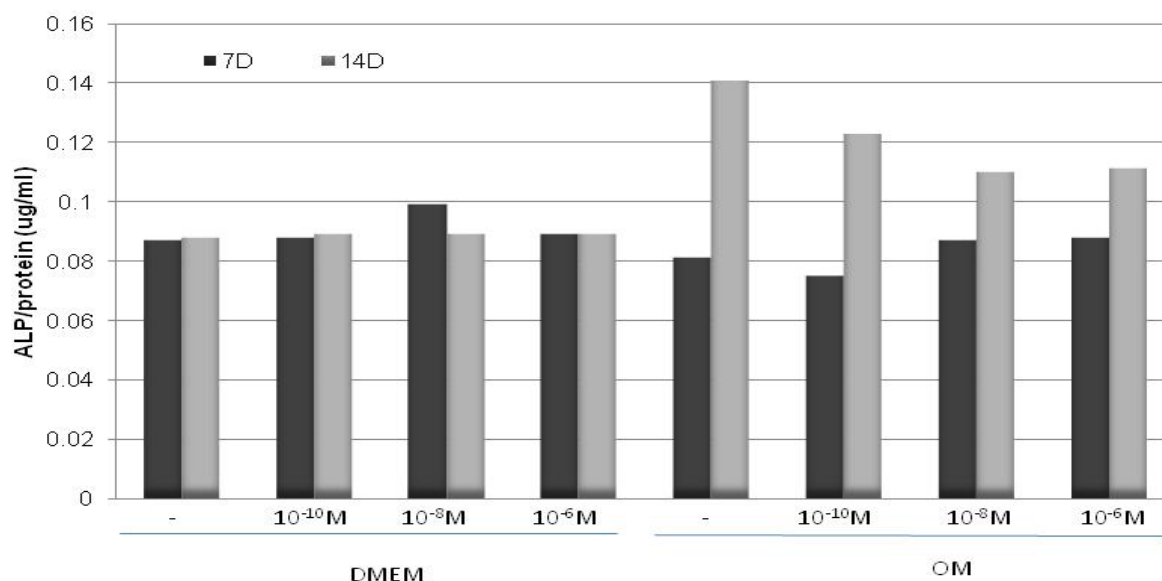


Figura 27: determinazione dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina. Il grafico è esemplificativo del comportamento delle cellule nelle diverse condizioni di coltura. I valori sono espressi in $\mu\text{g/ml}$.

Alla luce dei risultati riportati in questa sezione è possibile concludere che la sostanza P in combinazione con BM non è in grado, da sola, di indurre il differenziamento osteogenico in precursori mesenchimali umani.

L'aggiunta di sostanza P al terreno osteogenico non ha determinato un aumento significativo dei marker caratteristici del differenziamento osteogenico dopo una settimana di coltura. Tuttavia dopo 2 settimane il trattamento con sostanza P sembra bloccare la produzione delle proteine coinvolte nel processo di differenziamento osteogenico. Dopo 3 settimane i livelli di produzione di collagene 1 a ed osteocalcina in presenza di sostanza P sono simili se non leggermente aumentati rispetto alle cellule trattate con solo OM, suggerendo che le MSC procedano verso un fenotipo osteogenico più lentamente.

Valutazione dell'espressione di NK1 r in presenza di sostanza P

E' stata precedentemente confermata la presenza di NK1-r in MSC mantenute in coltura per 2 settimane in BM ed OM. L'attivazione del recettore in seguito a

stimolazione con sostanza P ha determinato l'attivazione della cascata del segnale provocando l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio e la successiva fosforilazione di ERK 1/2 . Le MSC sono state trattate per 2 settimane con diverse concentrazioni di sostanza P in combinazione con BM ed OM allo scopo di verificare l'effetto di tale peptide sull'espressione del recettore nel corso del differenziamento. L'espressione di NK1r, è stata valutata a diversi tempi e per i diversi trattamenti. (Figura 28).

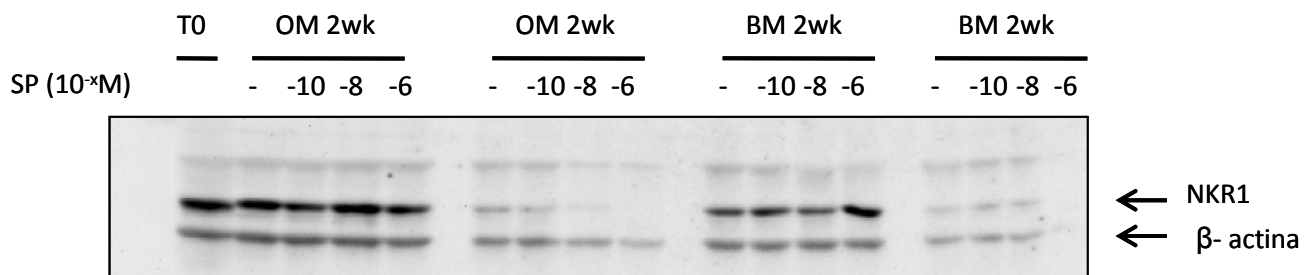


Figura 28: Western blot. La membrana mostra i livelli di espressione di NK1r nel corso del differenziamento, per tutte le condizioni di coltura e proteina di riferimento, β actina.

E' possibile osservare dalla figura che, dopo una settimana di coltura, l'espressione del recettore sembra essere mantenuta indipendentemente dal trattamento. Nella seconda settimana risulta evidente una diminuzione dei livelli di espressione in risposta a dosi crescenti di sostanza P, in entrambe i trattamenti, BM ed OM. Questo dato è in accordo con i dati ottenuti dai test funzionali sul recettore (concentrazione intracellulare di calcio e fosforilazione di ERK).

Mineralizzazione

Dopo 2 settimane di trattamento nelle specifiche condizioni è stata valutata la capacità di deporre noduli minerali. Le MSC sono state seminate e mantenute per 10 giorni in terreno mineralizzante.

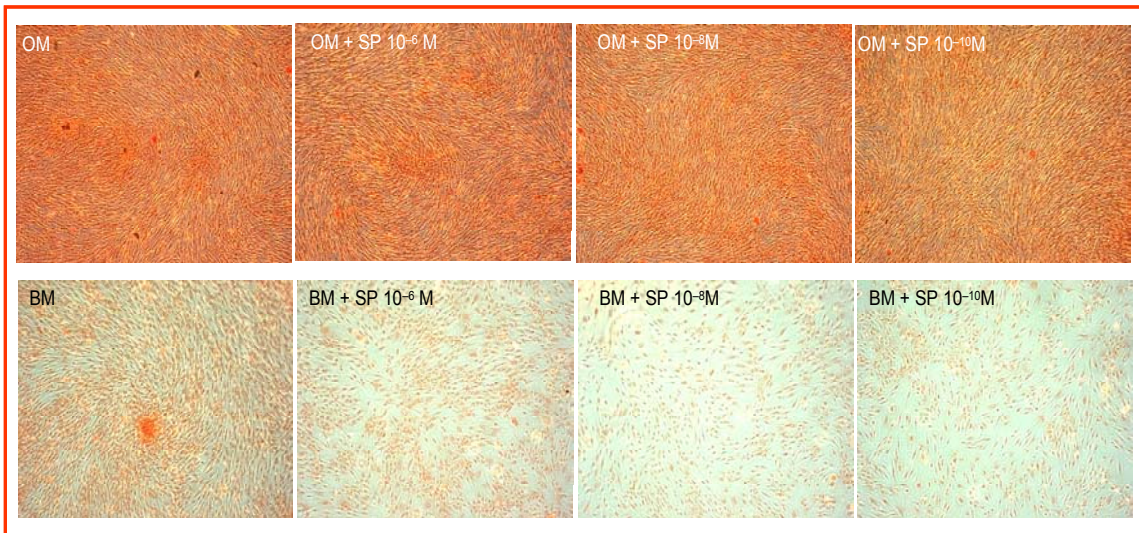


Figura 29: Mineralizzazione evidenziata mediante colorazione di Von Kossa. Le immagini sono esplicitate dei diversi trattamenti di coltura.

Il pannello in figura 29 mostra, mediante colorazione di Von Kossa, l'abilità delle MSC, mantenute in coltura in OM, di deporre ioni calcio e fosfato nella matrice extracellulare, determinandone la mineralizzazione. Osservando le immagini relative alle cellule mantenute in OM addizionato con sostanza P è interessante notare che l'abilità di formare noduli minerali sembra compromessa proprio dalla presenza di sostanza P. Allo stesso modo è possibile osservare che le MSC mantenute in coltura con BM, in presenza ed assenza di sostanza P, non siano in grado di mineralizzare la matrice, confermando la loro non induzione verso un fenotipo osteogenico.

Discussione

La presenza di fibre nervose di origine sensoriale e simpatica è stata la prima indicazione a suggerire l'esistenza di un coinvolgimento del sistema nervoso nel mantenimento dell'omeostasi ossea. Il concetto è stato descritto per la prima volta negli anni '80 ma solo recentemente alcuni meccanismi sono stati descritti a livello molecolare ed è stata svelata l'esistenza di un asse che lega il sistema nervoso ed il tessuto osseo attraverso l'ipotalamo.

E' noto che gli osteoblasti ed i loro precursori presenti a livello del midollo osseo possono essere esposti, *in vivo*, a concentrazione relativamente elevate di sostanza P, rilasciata da terminazioni nervose periferiche afferenti¹⁶⁹, dalle cellule endoteliali¹⁷⁰ e dai macrofagi¹⁷¹. Tuttavia il ruolo della sostanza P a livello del tessuto osseo non è ancora esattamente conosciuto.

In modelli animali, la sostanza P è stata associata tanto al riassorbimento quanto alla deposizione di tessuto osseo neosintetizzato e nonostante ci sia un generale accordo^{172, 173, 159} sull'effetto che la sostanza P ha sugli osteoclasti, l'azione che tale neuropeptide svolge sugli osteoblasti è assai controversa.

Infatti l'effetto della sostanza P su cellule stromali mesenchimali murine è stato studiato, a livello molecolare e funzionale, analizzando le fasi di proliferazione e di differenziamento caratteristiche del fenotipo osteogenico ma i risultati pubblicati sono contraddittori e non sono riusciti a descrivere in modo univoco l'effetto della sostanza P sugli osteoblasti e sui loro precursori. Inoltre sono stati pubblicati dati contrastanti anche riguardo la presenza di NK1-r funzionale a livello della membrana plasmatica degli osteoblasti e sul ruolo da esso svolto nel processo di commissionamento osteogenico.

E' interessante notare che i dati fino a questo momento pubblicati non sono relativi a precursori mesenchimali umani.

Pertanto MSC umane sono state trattate, in presenza di sostanza P, al fine di monitorare l'espressione di marker fenotipici che caratterizzano le diverse fasi del differenziamento osteogenico e parallelamente l'espressione di NK1-r e la sua attivazione nel corso del commissionamento osteogenico è stata valutata.

Nella prima parte del lavoro è stata valutata l'abilità del modello cellulare di rispondere agli stimoli osteogenici. Dall'analisi dei marcatori molecolari e funzionali caratteristici del differenziamento osteogenico è stata osservata un'induzione dei livelli di espressione di Runx2 già dopo una settimana di coltura in OM rispetto ai livelli riscontrati in MSC coltivate in BM. Lo stesso andamento è stato riscontrato anche per i livelli di espressione di ALP, sia a livello molecolare che dall'analisi dell'attività enzimatica. Inoltre un aumento significativo dei livelli di espressione a livello proteico di collagene di tipo I è stato osservato in MSC stimulate con OM rispetto ai livelli mostrati dalle cellule in BM. I livelli di osteocalcina mostrano la stessa tendenza ad aumentare in presenza di OM (Figura 17).

Questi dati dimostrano che la presenza di acido ascorbico e desametasone nel terreno di coltura è in grado di indurre il differenziamento in senso osteogenico di precursori mesenchimali umani. I nostri dati sono in accordo con quanto riportato in letteratura. Diversi autori, infatti, riportano l'azione di questi additivi (acido ascorbico e desametasone) nell'induzione dell'espressione dei marcatori osteogenici ¹¹⁴.

Gli esperimenti condotti in questo lavoro hanno avuto lo scopo di caratterizzare l'effetto della sostanza P sulla proliferazione ed il differenziamento osteogenico di MSC umane. A questo scopo abbiamo utilizzato il modello cellulare appena verificato che ci ha permesso di monitorare il differenziamento osteogenico a diversi livelli, partendo dall'analisi dell'espressione genica dei marcatori fino all'abilità di deporre noduli minerali.

Dopo aver confermato la capacità di acido ascorbico e desametasone di indurre il fenotipo osteogenico in MSC, la sostanza P è stata aggiunta al BM ed al OM allo scopo di verificare l'effetto di questo neuropeptide in un sistema cellulare già verificato.

La sostanza P è stata aggiunta a concentrazioni ricavate dalla letteratura (10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M) ed il suo effetto su MSC è stato saggiato, a diversi tempi, attraverso l'analisi dei marcatori del fenotipo osteogenico e l'espressione di NK1-r. Infine è stata valutata la capacità delle MSC di deporre noduli minerali.

Analizzando l'effetto della sostanza P in combinazione con OM abbiamo osservato, a livello molecolare, un aumento dei livelli di espressione di Runx2, dopo 2 settimane di coltura .

I livelli di espressione genica di ALP diminuiscono dopo una settimana di coltura con sostanza P rispetto a quanto osservato nel controllo (OM). Tuttavia, dopo 2 settimane di trattamento i livelli del trascritto aumentavano e raggiungevano quelli espressi dalle cellule trattate con OM. A livello proteico è stata valutata la produzione di collagene tipo I ed osteocalcina.

In accordo coi risultati ottenuti per l'attività dell'ALP, dopo 2 settimane di coltura in OM le MSC mostravano un aumento della produzione di collagene tipo I. In presenza di sostanza P, allo stesso tempo, si osservava invece una diminuzione dei livelli di produzione della proteina mentre dopo 3 settimane di trattamento si osservava un aumento significativo. Lo stesso andamento è stato verificato per l'osteocalcina.

Questi risultati confermano la tendenza delle MSC a proseguire verso il commissionamento osteogenico, ma il livello di attività enzimatica di ALP (Figura 27) associato alla produzione di collagene sembra rallentare il processo di commissionamento osteogenico. (Figura 23 e 24).

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto precedentemente pubblicato da Wang et al., che hanno dimostrato la capacità della sostanza P di indurre un aumento dell'espressione di Runx2 ed ALP su cellule mesenchimali di topo¹⁷⁴. Lo stesso fenomeno è stato documentato anche da Goto et al.¹⁶⁸ che hanno dimostrato che la presenza di sostanza P determina l'aumento dell'espressione di Runx2 ed ALP dopo 2 settimane di coltura su osteoblasti isolati da calvaria di topo.

Risultati contrastanti sono stati pubblicati rispetto alla produzione di collagene tipo I ed osteocalcina in presenza di sostanza P. In uno studio Goto et al.,¹⁶⁸ hanno dimostrato un effetto positivo della sostanza P nella produzione di collagene dopo 2 settimane di coltura.

Nel nostro modello abbiamo invece osservato, allo stesso tempo preso in esame da Goto et al., un effetto di inibizione temporale per l'espressione, a livello proteico, di collagene ed osteocalcina, così come per l'attività enzimatica dell'ALP. Differenze significative sono state apprezzate dopo 3 settimane di trattamento con sostanza P, riscontrando un aumento nella produzione di tali proteine (Figura 25 e 26).

L'espressione del recettore con più alta affinità per la sostanza P (NK1-r) su precursori mesenchimali è dibattuta. Goto et al.,¹⁵⁹ hanno dimostrato la presenza del recettore sulla membrana plasmatica degli osteoblasti di ratto con tecniche di immunocistochemica, mentre Togari et al.,¹⁵⁴ hanno dimostrato, attraverso PCR, che osteoblasti derivati da periostio umano, Saos-2 ed MG63, non esprimono il trascritto per NK1r. In questo lavoro abbiamo dimostrato, attraverso Western blot, la presenza del recettore su MSC già in assenza di stimoli specifici (T0). I livelli si mantenevano nel corso della prima settimana di coltura negli specifici trattamenti. E' interessante notare che dopo 2 settimane di coltura si osservava invece una generale diminuzione dei livelli di espressione per tutte le condizioni considerate (Figura 18 e 28). Il pattern temporale di espressione del recettore fa supporre che la sostanza P svolga la sua funzione soprattutto nelle fasi precoci del differenziamento osteogenico. In accordo con questo dato, anche la sensibilità delle cellule alla presenza della sostanza P sembra diminuire nel corso del tempo. Analizzando infatti i tracciati registrati grazie all'incorporazione di Fura-2 dalle MSC si è osservato che, mentre a 24 h e 7 giorni di trattamento un numero considerevole di cellule sembra rispondere all'esposizione alla sostanza P, dopo 2 settimane un numero minore di cellule risulta sensibile alla stimolazione con il neuropeptide (Figura 19). Questo dato è in accordo con i risultati ottenuti attraverso Western blot. Inoltre abbiamo dimostrato l'attività del recettore controllando l'innescò della cascata del segnale, testimoniata dall'aumento della concentrazione intracellulare di calcio e, a valle, dalla fosforilazione di ERK1/2 (Figura 20). Questa proteina è un membro della famiglia delle MAPK, via di segnalazione capace di agire, attraverso meccanismi diversi, sia nella proliferazione cellulare che nel differenziamento osteogenico¹⁷⁵. E' possibile osservare come i livelli di espressione della forma fosforilata della proteina aumenti in modo graduale, nel tempo, in seguito ad esposizione alla sostanza P.

Il saggio per la valutazione dell'attività metabolica cellulare (Figura 21) ha mostrato una generale tendenza delle cellule mantenute in coltura con OM in combinazione con diverse concentrazioni di sostanza P ad essere maggiormente proliferative. Questo risultato dimostra un effetto della sostanza P nell'induzione della proliferazione cellulare, coadiuvando l'effetto dell'acido ascorbico. E' noto in letteratura¹¹², ed è stato confermato dai nostri risultati riportati nella prima parte di questa tesi, l'effetto positivo dell'ascorbato nell'induzione della proliferazione cellulare, legato all'aumento della

deposizione di collagene tipo I. Inoltre l'effetto mitogeno della sostanza P è noto ed è stata dimostrata la sua capacità di indurre la proliferazione in diversi citotipi, come ad esempio in cellule endoteliali ¹⁷⁶, e nei fibroblasti. ¹⁷⁷.

Il test per la valutazione della capacità delle MSC di deporre noduli minerali mostra che l'esposizione alla sostanza P in presenza di OM determina una inibizione del processo di mineralizzazione (Figura 29). Infatti, MSC coltivate in sola presenza di OM mostrano la capacità di utilizzare la fonte di fosfato fornito con il terreno mineralizzante, mentre lo stesso fenomeno non si evidenzia in presenza di sostanza P. Questo risultato supporta la nostra teoria riguardo l'effetto di inibizione temporale della sostanza P sul processo di commissionamento osteogenico a favore della proliferazione cellulare.

Conclusioni

Alla luce dei risultati riportati in questo lavoro possiamo sostenere la presenza di recettori funzionali per la sostanza P su MSC e che la cascata attivata dal legame NK1r-ligando agisca nella regolazione del differenziamento osteogenico attraverso due meccanismi distinti, uno diretto ed uno indiretto.

La sostanza P può agire direttamente sull'abilità delle MSC di indurre l'espressione dei geni coinvolti nel differenziamento osteogenico. Dalla valutazione dei risultati è possibile osservare che, in seguito al trattamento con sostanza P, a livello molecolare, l'espressione di Runx2 ed ALP mostra un andamento crescente rispetto al controllo. Osservando, però, i livelli di attività enzimatica dell'ALP si osservano livelli paragonabili al controllo e non influenzati dal trattamento con sostanza P. Infine la produzione delle proteine che caratterizzano gli stadi tardivi del differenziamento subisce un ritardo nel raggiungimento del picco di espressione, suggerendo un rallentamento nel processo di differenziamento.

Inoltre, l'effetto della sostanza P sulla proliferazione cellulare ci permette di ipotizzare un suo ruolo indiretto nel processo di differenziamento; infatti, l'attivazione di vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione cellulare potrebbe determinare una inibizione temporale dei processi coinvolti nel differenziamento osteogenico. A conferma di ciò, la capacità di depositare noduli minerali risulta inibita dalla presenza di sostanza P.

Questi risultati potrebbero anche fornire una spiegazione delle conseguenze della denervazione: l'abilità della sostanza P di stimolare la proliferazione di precursori mesenchimali capaci di differenziarsi in osteoblasti maturi è fondamentale nel processo di guarigione di una frattura, ecco perché in modelli animali denervati, in cui si verifica una generale diminuzione della concentrazione locale di sostanza P, si osserva una perdita di massa ossea associata a maggiore suscettibilità alle fratture.

Questi risultati possono inoltre essere utili per migliorare la resa di precursori mesenchimali per applicazioni di ingegneria tissutale. E' noto infatti che uno dei limiti di utilizzo delle MSC è la necessità di avere un numero importante di precursori da poter espandere *in vitro*. Nella prima parte di questo lavoro è stata confermata la capacità clonogenica dell'acido ascorbico e successivamente è stato verificato l'effetto coadiuvante che la sostanza P è in grado di svolgere nel processo di proliferazione cellulare.

Bibliografia

- ¹ Lee NJ., Herzog H. NPY regulation of bone remodeling. *Neuropeptides* 43 (2009) 457–463
- ² Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005; 36:1392-404.
- ³ Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultra-structural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg* 1991; 73A:832-47.
- ⁴ Kon T, Cho T, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001; 16:1004-14.
- ⁵ Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1272-81.
- ⁶ Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld L. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 2003; 90:1112-27.
- ⁷ Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, Sugioka Y. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair. Detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res* 1997; 12:96-102.
- ⁸ Nakagawa Y, Shimizu K, Hamamoto T, Suzuki K, Ueda R, Yamamuro T. Calcium-dependent neutral protease (Calpain) in fracture healing in rats. *J Orthop Res* 1994; 12:58-69.
- ⁹ Deckers MM, Van Beek ER, Van Der Pluijm G, Wetterwald A, Van Der Wee-Pals L, Cecchini MG, Papapoulos SE, Löwik CW. Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J Bone Miner Res* 2002;17:998-1007.
- ¹⁰ Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 1998; 16:144-50.

- ¹¹ Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen KJ, Einhorn TA. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem* 2006; 54:1215-28.
- ¹² Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res* 2007; 22:1-6.
- ¹³ Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* 2001; 16:1575-82.
- ¹⁴ 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.
- ¹⁵ 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.
- ¹⁶ 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.
- ¹⁷ Giordano A, Galderisi U, Marino I. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An update on Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Physiol* 2007; 211:27-35.
- ¹⁸ Myers TJ, Granero-Molto F, Longobardi L, Li T, Yan Y, Spagnoli A. Mesenchymal stemcells at the intersectionof the cell and gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther* 2010; 10(12):1663-1679
- ¹⁹ Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang BQ, Zhang W, He BC, Chen L, Zuo GW, Luo Q, Shi Q, Wagner ER, Huang E, Gao Y, Gao JL, Kim SC, Zhou JZ, Bi Y, Su Y, Zhu G, Luo J, Luo XJ, Qin J, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, Deng ZL, He TC. Mesenchymal stem cells: Molecular Characteristics and clinical application. *World Journal of Stem Cells* 2010, August 26; 2(4):67-80.
- ²⁰ Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006; 24:150-4.

- ²¹Roufousse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:585-97.
- ²² Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *New Engl J Med* 2005; 352:1959-66.
- ²³ Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007; 137:491-502.
- ²⁴ Collett GDM, Calfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005; 96:930-8.
- ²⁵ Popp FC, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. Therapeutic potential of bone marrow cells for liver diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006; 1: 411-8.
- ²⁶ Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126:677-89.
- ²⁷ Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, Singh VK, Tripathi RP. Mesenchymal Stem Cell: molecular target targets for Tissue Engineering; *Stem cells and development* 16:7-23 (2007)
- ²⁸ Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 2002;277:30177-82.
- ²⁹ Li X, Quigg RJ, Zhou J, Ryaby JT, Wang H. Early signals for fracture healing. *J Cell Biochem.* 2005;95:189-205.
- ³⁰ Li X, Wang H, Touma E, Rousseau E, Quigg RJ, Ryaby JT. Genetic network and pathway analysis of differentially expressed proteins during critical cellular events in fracture repair. *J Cell Biochem* 2007;100:527-43.
- ³¹ Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001;10:E1.
- ³² Augello A, De Bari C. The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Human Gene Therapy* 21: 1226-1238 (October 2010).
- ³³ Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin independent Wnt signaling. *Dev Cell* 2003;5:367-77.
- ³⁴ Westendorf, J.J., Kahler, R.A., and Schroeder, T.M. (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341, 19–39.
- ³⁵ Jackson A, Vayssiere B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S, Rawadi G. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* 2005;36:585-98.

- ³⁶ Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;8:739-50.
- ³⁷ Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004;22:233- 41.
- ³⁸ Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:651-7.
- ³⁹ Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:689- 94.
- ⁴⁰ Lai CF, Cheng SL. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002;277;15514-22.
- ⁴¹ Jacob AL, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteochondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol* 2006; 296:315-28.
- ⁴² Chau JF, Leong WF, Li B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol*. 2009; 24: 1593-606.
- ⁴³ Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, Chen Y, Wang L, Zheng H, Sutton RE, Boyce BF, Lee B. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med*. 2008; 14: 299-305.
- ⁴⁴ Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001;410: 37-40.
- ⁴⁵ Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14:1-41.
- ⁴⁶ Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, R. R. Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108;7-29.
- ⁴⁷ Lieberman JR, Dalulski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical applications*. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A: 1032-44.
- ⁴⁸ Malizos KM, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum. *Molecular aspects*. *Injury* 2005;36S: S13-S19.

- ⁴⁹ Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355S:S7- S21.
- ⁵⁰ Chubinskaya S, Merrihew C, Cs-Szabo G, Mollenhauer J, McCartney J, Rueger DC, Kuettner KE. Human articular chondrocytes express osteogenic protein-1. *J Histochem Cytochem* 2000;48: 239-50.
- ⁵¹ Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2002;109: 2384–97.
- ⁵² Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop* 1998;335 (Suppl): S116-S123.
- ⁵³ Nakase T, Yoshikawa H. Potential role of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab* 2006;24:425-33.
- ⁵⁴ Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513-20.
- ⁵⁵ Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 2002;110:751-9.
- ⁵⁶ Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem* 2003;278:34387-94.
- ⁵⁷ Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg* 2003, 85-A: 1544-52.
- ⁵⁸ Chhabra A, Zijerdi D, Zhang J, Kline A, Balian G, Hurwitz S. BMP-14 deficiency inhibits long bone fracture healing: a biochemical, histologic, and radiographic assessment. *J Orthop Trauma* 2005;19:629-34.
- ⁵⁹ Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J,

Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-4.

⁶⁰ Kan L, Hu M, Gomes WA, Kessler JA. Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressive (FOP)-like phenotype. *Am J Pathol* 2004;165:1107-1015.

⁶¹ Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002; 143:1545-53.

⁶² Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, Kumegawa M, Chihara K. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoblast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res* 1995;10:1681-90.

⁶³ Barnes GL, Kostenuik LC, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-15.

⁶⁴ Sandberg MM, Hannu TA, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993; 289:292-312

⁶⁵ Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn FW, Kawai S, Galléa S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* 2001;29:323-30.

⁶⁶ Tsiridis E, Upadhyay N, P Giannoudis. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules ? *Injury* 2007; 38S:S11-S25.

⁶⁷ Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derinck R. Osteoblastic responses to TGF- β during bone remodeling. *Mol Biol Cell* 1998;9:1903-18.

⁶⁸ Quinn J M W, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin T J, Gillespie MT. Transforming growth factor β affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res* 2001;16:1787-94.

⁶⁹ Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y. Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998; 273:27091-6.

- ⁷⁰ Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990;8:364-71.
- ⁷¹ Zhang X, Sobue T, Hurley MM. FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:526-31.
- ⁷² Xiao G, Jiang D, Gopolkrishnan R, Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem* 2002;277:36181-7.
- ⁷³ Pitaru S, Kotev-Emeth S, Noff D, Kaffuler S, Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res* 1993;8:919-29.
- ⁷⁴ Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 2003;316, 23-32.
- ⁷⁵ Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* 2000;149:1297-308.
- ⁷⁶ Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, Nemoto K, Itabashi A, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K, Kawaguchi H. Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42 MAP kinase. *J Biol Chem* 2000;275:31444-50.
- ⁷⁷ Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 2002;17:1859-71.
- ⁷⁸ Canalis E, Rydziel S. Platelet-derived growth factor and the skeleton. In: JP Bilezikian, LG Raisz, GA Rodan eds. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA 1996, pp 619-26.

- ⁷⁹ Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:529-35.
- ⁸⁰ Mitlak B H, Finkelman R D, Hill E L, Li J, Martin B, Smith T, D'Andrea M, Antoniades H N, Lynch S E. The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J Bone Miner Res* 1996;11:238-47.
- ⁸¹ Filvaroff EH. VEGF and bone. *J Musculoskel Neuron Interact* 2003;3:304-7.
- ⁸² Gerber HP Vu TH, Ryan AM. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5:623-8.
- ⁸³ Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, Mähönen AJ, Ahonen M, Rutanen J, Kosma VM, Mahonen A, Kröger H, Ylä-Herttuala S. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. *FASEB J* 2003;17:1147-9.
- ⁸⁴ Yao S, Dawen L, Pan F, Wise GE. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclasts precursors and on osteoclastogenesis. *Arch Oral Biol* 2006;51:596-602.
- ⁸⁵ Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D. Insulin-like growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int* 1993;53:97-102.
- ⁸⁶ Manduca P, Palermo C, Caruso C, Brizzolara A, Sanguineti C, Filanti C, Zicca A. Rat tibial osteoblasts III: propagation in vitro is accompanied by enhancement of osteoblast phenotype. *Bone* 1997;21:31-9.
- ⁸⁷ Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser U, Dony C, Lang K, Baylink DJ. Studies on the mechanism by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* 1995;270:20424-31.
- ⁸⁸ Prisell PT, Edwall D, Lindblad JB et al. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcif Tissue Int* 1993;53:201-5.
- ⁸⁹ Rosen CJ. Insulin-like growth factor I and bone mineral density: experience from animal models and human observational studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004;18:423-35.
- ⁹⁰ Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N (2008) Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Engineer Regener Med* 2:169-183.

- ⁹¹ Egermann M, Baltzer AW, Adamaszek S, Evans C, Robbins P, Schneider E, Lill CA. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther.* 2006; 17(5):507-17.
- ⁹² Ishihara A, Shields KM, Litsky AS, Mattoon JS, Weisbrode SE, Bartlett JS, Bertone AL. Osteogenic gene regulation and relative acceleration of healing by adenoviral-mediated transfer of human BMP-2 or -6 in equine osteotomy and ostectomy models. *J Orthop Res.* 2008; 26(6):764-71.
- ⁹³ Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. *Injury, Int. J. Care Injured* 42 (2011) 562-568.
- ⁹⁴ Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6 to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 2007 May;13(5):947-55.
- ⁹⁵ Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8932-7.
- ⁹⁶ Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999 Mar;5(3):309-13.
- ⁹⁷ Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Jun;86-A(6):1153-60.
- ⁹⁸ Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Dec;(405):14-23.
- ⁹⁹ Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater.* 2008 May 2;15:100-14. Review.
- ¹⁰⁰ Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res.* 2002 Sep;20(5):1060-9.

- ¹⁰¹ Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci.* 2010 Jan 11;10(1):12-27. Review.
- ¹⁰² Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. Controversial issue: Is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp Gerontol.* 2008;43(11):1018-1023.
- ¹⁰³ Di Girolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Brit J Haematol.* 1999;107(2):275-281.
- ¹⁰⁴ Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003;33(6):919-926.
- ¹⁰⁵ Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(3):163–173.
- ¹⁰⁶ Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage *in vitro*. *J Bone Miner Res.* 2004;19(9):1379-1394.
- ¹⁰⁷ Brinckmann JE. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *J Neurol Sci.* 2008 Feb 15;265(1-2):127-30. Epub 2007 Jun 8. Review.
- ¹⁰⁸ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284 (5411):143-147.
- ¹⁰⁹ Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Haematol.* 2004;32:414-425.
- ¹¹⁰ Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL. Extracellular matrix made by bone marrow facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Mineral Res.* 2007;22:1943-1956.
- ¹¹¹ Song IH, Caplan AI, Dennis JE. *In vitro* dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells *in vivo*. *J Orthop Res.* 2009;27(7):216-221.

- ¹¹² Choi KM, Seo YK, Yoon HH, *et al.* Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng.* 2008;105:586-594.
- ¹¹³ Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 2003;90:13-22.
- ¹¹⁴ Jorgensen NR, Henriksen Z, Sorensen OH, Civitelli R. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an *in vitro* model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids.*2004;69:219-226.
- ¹¹⁵ Fromiguè O, Marie PJ, Lomri A. Differential effects of Transforming Growth Factor β 2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells. *Cytokine.*1997;9:613-623.
- ¹¹⁶ Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue-engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):787-802.
- ¹¹⁷ Bianco P, Robey PG. Marrow stromal cells. *J Clin Invest.* 2000;105 (12):1663-1668.
- ¹¹⁸ Franceschi RT (2005) Biological Approaches to Bone Regeneration by Gene Therapy. *J Dent Res* 84:1093-1103.
- ¹¹⁹ Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT (2008) Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg* 90(Suppl 1):36-42.
- ¹²⁰ Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG (2001) Integrin mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28:174-181.
- ¹²¹ Datta N, Holtorf HL, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG (2005) Effect of bone extracellular matrix synthesized *in vitro* on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *Biomaterials* 26:971-977.
- ¹²² Pytlik R, Stehlik D, Soukup T, Kalbacova M, Rypacek F, Trc T, Mulinkova K, Michnova P, Kideryova L, Zivny J, Klener P Jr, Vesela R, Trneny M, Klener P (2009) The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. *Biomaterials* 30:3415-3427.

- ¹²³ Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M (2006) Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 24:1409-1410.
- ¹²⁴ Tonti GA, Mannello F (2008) From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol* 52:1023-1032.
- ¹²⁵ Lapi S, Nocchi F, Lamanna R, Passeri S, Iorio M, Paolicchi A, Urciuoli P, Coli A, Abramo F, Miragliotta V, Giannesi E, Stornelli MR, Vanacore R, Stampacchia G, Pisani G, Borghetti L, Scatena F (2008) Different media and supplements modulate the clonogenic and expansion properties of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes* 1:53.
- ¹²⁶ Bonab M, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biology* 7:7-14.
- ¹²⁷ Ishikawa S, Isawaki K, Komaki M, Ishikawa I (2004) Role of ascorbic acid in periodontal ligament cell differentiation. *J Periodont* 75:709-716.
- ¹²⁸ Schecroun N, Delloye CH (2003) Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. *Bone* 32:252-260.
- ¹²⁹ Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Both S, Oner FC, Van Blitterswijk CA, De Bruijn JD (2004) Relation between *in vitro* and *in vivo* osteogenic potential of cultured human bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med* 15(10):1123-1128.
- ¹³⁰ Chang PL, Blair HC, Zhao Z, Chien Y, Chen DT, Tilden AB, Chang Z, Cao X, Faye-Petersen OM, Hicks P (2006) Comparison of Fetal and Adult Marrow Stromal Cells in Osteogenesis with and without Glucocorticoids. *Connect Tissue Res* 47: 67-76.
- ¹³¹ Oshina H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Sugata Y, Maehara H, Marukawa E, Omura K, Shinomiya K (2007) Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Bone* 41(4):575-583.
- ¹³² Song IH, Caplan AI, Dennis JE (2009) Dexamethasone Inhibition of Confluence-Induced Apoptosis in Human Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res* 27(7):916-921.
- ¹³³ Beck GR, Zerler B, Moran E (2000) Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression *PNAS* 97:8352-8357.

- ¹³⁴ Lund AW, Yener B, Stegemann JP, Plopper GE (2009) The natural and engineered 3D microenvironment as a regulatory cue during stem cell fate. *Tissue Eng part B* 15:371-380.
- ¹³⁵ Winer JP, Janmey PA, McCormick ME, Funaki M (2009) Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng* 15:147-154.
- ¹³⁶ Baron, R.,. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus, M.F. (Ed.), *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, fourth ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 1999; pp. 3–10.
- ¹³⁷ Marks SC, Odgren PR. Structure and development of the skeleton. in: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, GA. Rodan (Eds.), *Principles of Bone Biology* (second ed.), Academic Press, San Diedo, CA, 2002; pp. 3–15
- ¹³⁸ Rodan GA. The development and function of the skeleton and bone metastases. *Cancer*. Feb 2003; 1;97 (3 Suppl):726-32.
- ¹³⁹ Erik Fink Eriksen. Cellular mechanism of bone remodelling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010; 11:219-227
- ¹⁴⁰ Suda T., Udagawa N. and Takahashi N., Cells of bone: osteoclast generation. In: *Principles of bone biology*, 1996; 87 -102.
- ¹⁴¹ Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, Academic Press, San Diego. Teitelbaum S. L. Bone resorption by osteoclast. *Science* 2000 289. 1504 1508.
- ¹⁴² Manolagas SC. Birth and death of bone cell: basic regulatory mechanism and implicationfor the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 2000; 21 (2): 115 137
- ¹⁴³ Osteoporosis. Sambrook P, Cooper C. *Lancet*. 2006 Jun 17;367(9527):2010-8. Review. Erratum in: *Lancet*. 2006 Jul 1;368(9529):28.
- ¹⁴⁴ Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999 13(23):3027-3051
- ¹⁴⁵ Mundy GR., Boyce B., Yoneda T., Bonewald L. F. and Roodman G. D. Cytokines and bone remodelling. In: *Oseoporosis*, 1996. vol 1, 302313, Marcus R., Feldman D. and Kelsey J. (eds), Academic Prwss, San Diego.
- ¹⁴⁶ Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1984;5:243–52. 4.

- ¹⁴⁷ Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1984;5(5):235-42. Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals.
- ¹⁴⁸ Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res*. 1990; 5:311-9
- ¹⁴⁹ Burkhardt R. In: Arlet J, Ficat RP, Hungerford DS, editors. *The structural relationship of bone forming and endothelial cells of the bone marrow*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984. p. 2-14.
- ¹⁵⁰ Wong IP, Zengin A, Herzog H, Baldock PA. Central regulation of bone mass. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Oct;19(5):452-8. Epub 2008 Aug 7.
- ¹⁵¹ Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone*. 1999 Dec;25(6):623-9.
- ¹⁵² Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S, Paavolainen P, Gu XH, Terenghi G, Polak JM. Rapid proliferation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves during healing of rat tibial fracture suggests neural involvement in bone growth and remodelling. *Neuroscience*. 1993 Jun;54(4):969-79.
- ¹⁵³ Lerner UH, Persson E. Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008 Apr-Jun;8(2):154-65. Review.
- ¹⁵⁴ Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc Res Tech*. 2002 Jul 15;58(2):77-84.
- ¹⁵⁵ Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Sep;81(9):3419-23.)
- ¹⁵⁶ Franquinho F, Liz MA, Nunes AF, Neto E, Lamghari M, Sousa MM. Neuropeptide Y and osteoblast differentiation--the balance between the neuro-osteogenic network and local control. *FEBS J*. 2010 Sep;277(18):3664-74.
- ¹⁵⁷ Cascieri MA, Huang RR, Fong TM, Cheung AH, Sadowski S, Ber E, Strader CD. Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol*. 1992 Jun;41(6):1096-9.

- ¹⁵⁸ Lai JP, Lai S, Tuluc F, Tansky MF, Kilpatrick LE, Leeman SE, Douglas SD. Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 26;105(34):12605-10. Epub 2008 Aug 19.
- ¹⁵⁹ Goto T, Tanaka T. Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microsc Res Tech*. 2002 Jul 15;58(2):91-7.
- ¹⁶⁰ Lembeck F., Holzer P., 1979 Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 310, 175-183
- ¹⁶¹ Offley SC, Guo TZ, Wei T, Clark JD, Vogel H, Lindsey DP, Jacobs CR, Yao W, Lane NE, Kingery WS. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *J Bone Miner Res*. 2005 Feb;20(2):257-67. Epub 2004 Nov 16.
- ¹⁶² Kingery WS, Offley SC, Guo TZ, Davies MF, Clark JD, Jacobs CR. A substance P receptor (NK1) antagonist enhances the widespread osteoporotic effects of sciatic nerve section. *Bone*. 2003 Dec;33(6):927-36.
- ¹⁶³ Liu D, Jiang LS, Dai LY. Substance P and its receptors in bone metabolism. *Neuropeptides*. 2007 Oct;41(5):271-83. Epub 2007 Jul 25.
- ¹⁶⁴ Sohn SJ. Substance P upregulates osteoclastogenesis by activating nuclear factor kappa B in osteoclast precursors. *Acta Otolaryngol*. 2005 Feb;125(2):130-3.
- ¹⁶⁵ Shih C, Bernard GW. Calcitonin gene related peptide enhances bone colony development in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 1997 Jan;(334):335-44.
- ¹⁶⁶ Adamus MA, Dabrowski ZJ. Effect of the neuropeptide substance P on the rat bone marrow-derived osteogenic cells in vitro. *J Cell Biochem*. 2001;81(3):499-506.
- ¹⁶⁷ Azuma H, Kido J, Ikedo D, Kataoka M, Nagata T. Substance P enhances the inhibition of osteoblastic cell differentiation induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2004 Jul;75(7):974-81.
- ¹⁶⁸ Goto T, Nakao K, Gunjigake KK, Kido MA, Kobayashi S, Tanaka T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides*. 2007 Feb;41(1):25-31. Epub 2007 Jan 3.
- ¹⁶⁹ Hukkannen M, Konttinen YT, Rees RG, Gibson SJ, Santavirta S, Polak JM. Innervation of bone from healthy and arthritic rats by substance p and calcitonin gene related peptide containing sensory fiber. *Jrheumatol*. 1992; 19:1252-1259

- ¹⁷⁰ Ralevic V, Milner P, Hudlicka O, Kristek F, Burnstock G. Substance P is released from the endothelium of normal and capsaicin-treated rat hind-limb vasculature, in vivo, by increased flow. *Circ Res*. 1990 May;66(5):1178-83.
- ¹⁷¹ Pasqual DW, Bost KL. Substance P production by P388D1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology*. 1990; 71:52-58
- ¹⁷² Sherman BE, Chole RA. A mechanism for sympathectomy-induced bone resorption in the middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Nov;113(5):569-81.
- ¹⁷³ Mori T, Ogata T, Okumura H, Shibata T, Nakamura Y, Kataoka K. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 27;262(2):418-22.
- ¹⁷⁴ Wang L, Zhao R, Shi X, Wei T, Halloran BP, Clark DJ, Jacobs CR, Kingery WS. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro. *Bone*. 2009 Aug;45(2):309-20. Epub 2009 Apr 18.
- ¹⁷⁵ Schindeler A, Little DG. Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: friend or foe? *J Bone Miner Res*. 2006 Sep;21(9):1331-8.
- ¹⁷⁶ Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*. 1990 Sep;40(2):264-78.
- ¹⁷⁷ Nilsson G, Pernow B, Fischer GH, Folkers K. Presence of substance P-like immunoreactivity in plasma from man and dog. *Acta Physiol Scand*. 1975 Aug;94(4):542-4.