

Università degli Studi di Milano



Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato di Ricerca in
SCIENZE FISIOPATOLOGICHE, NEUROPSICOBIOLOGICHE E
ASSISTENZIALI DEL CICLO DELLA VITA (LOR)
Ciclo XXVI

**NUOVE FRONTIERE PER LE CELLULE STAMINALI:
METODOLOGIA DI BANCAGGIO E CRIOPRESERVAZIONE
DELLA POLPA DENTALE**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Roberto L. WEINSTEIN

Correlatore:

Chiar.mo Prof. Aldo Bruno GIANNI'

TESI di:
Silvia GIOVENTU'
Matr. R09105

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: Cellule staminali

- 1.1 Introduzione
- 1.2 Definizione e caratteristiche
- 1.3 Caratterizzazione e differenziamento
- 1.4 Le cellule staminali embrionali (ESC)
- 1.5 Le cellule staminali adulte (ASC)
- 1.6 Plasticità differenziativa

CAPITOLO 2: Cellule staminali mesenchimali (MSC)

- 2.1 Definizione e caratteristiche
- 2.2 Caratterizzazione fenotipica
- 2.3 Cellule staminali mesenchimali nel sangue del cordone ombelicale
- 2.4 Cellule staminali mesenchimali nel liquido amniotico e nei villi coriali
- 2.5 Cellule staminali mesenchimali nel midollo osseo
- 2.6 Cellule staminali mesenchimali nella polpa dentale

CAPITOLO 3: Potenzialità delle cellule staminali

- 3.1 Biologia di base delle cellule staminali
- 3.2 Trattamento di malattie genetiche o degenerative
- 3.3 Terapia cellulare
- 3.4 Rigenerazione ossea e cartilaginea
- 3.5 Rigenerazione muscolare cardiaca e muscolo scheletrica
- 3.6 Rigenerazione dei tessuti nervosi

CAPITOLO 4: Potenzialità delle cellule staminali mesenchimali nel cavo orale

- 4.1 Introduzione
- 4.2 Ingegneria tissutale
- 4.3 Rigenerazione a livello craniofacciale e del disco articolare
- 4.4 Rigenerazione del complesso dento-pulpare
- 4.5 Rigenerazione parodontale

SCOPO DELLA RICERCA

CAPITOLO 5: Il laser

- 5.1 Introduzione
- 5.2 Struttura di un laser
- 5.3 Proprietà della luce laser
- 5.4 Propagazione della luce nei tessuti
- 5.5 Il laser in medicina
- 5.6 Classificazione dei laser ad uso medicale
- 5.7 Applicazioni chirurgiche e terapeutiche
- 5.8 Terapie laser a bassa potenza
- 5.9 Laser in odontoiatria

MATERIALI E METODI

- 1- Introduzione
- 2- Selezione dei donatori
- 3- Estrazione e preparazione degli elementi dentali
- 4- Individuazione e caratteristiche del laser utilizzato
- 5- Metodologia di trasporto e bancaggio dentale
- 6- Estrazione, isolamento e differenziazione di cellule staminali dentali

RISULTATI

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

Gli studi riguardanti le cellule staminali stanno vivendo un rapido sviluppo. Si tratta di un ambito di ricerca di grande interesse, non solo dal punto di vista scientifico e medico. Si percepisce ottimismo circa il potenziale impatto di queste cellule nello studio e nel trattamento di numerose condizioni patologiche: esso deriva dalla consapevolezza, propria non solo del clinico e del ricercatore ma anche del paziente e del grande pubblico, che terapie basate su cellule staminali si sono già dimostrate valide in clinica. Pratiche quali il trapianto di cellule staminali emopoietiche, epidermiche e corneali sono realtà rivoluzionarie.

La mole di risultati conseguiti, dalla ricerca di base sino al letto del paziente, è imponente. Altrettanto grande è lo sforzo che resta da fare per rendere le cellule staminali degli strumenti robusti per comprendere ed aggredire le patologie degenerative.

La capacità, da parte dell'organismo umano, di sostituire cellule danneggiate, al fine di conservare la sua integrità, è affidata ad un pool di cellule indifferenziate (presenti in ogni tessuto), definite "staminali", che possiedono la proprietà di differenziarsi in citotipi diversi, oltre a quello del tessuto da cui provengono, potendo essere prelevate sia da organismi allo stato embrionale che adulti.

Cellule staminali totipotenti possono essere isolate dalla massa cellulare interna di un embrione: queste cellule staminali embrionali (ES) sono caratterizzate da una potenzialità replicativa praticamente illimitata e dalla capacità di dare origine a tutti i lineages cellulari dell'organismo. Inoltre, date le difficoltà della ricerca a lavorare su cellule embrionali e considerato l'intenso dibattito etico che,

soprattutto in Italia, caratterizza l'argomento, la possibilità di ricavare staminali dalla cavità orale è un'alternativa allettante e confortante.

Le cellule staminali adulte sono una fonte inesauribile di cellule multipotenti (hanno una potenzialità differenziativa minore rispetto alle cellule di origine embrionale), le quali sono in grado di differenziarsi in diverse linee cellulari, presentando interessanti prospettive di utilizzo terapeutico nella medicina rigenerativa. La fonte principale di cellule staminali da organismi adulti è, al momento, il midollo osseo in quanto dal suo stroma si possono ottenere cellule staminali mesenchimali (BMSC, Bone Marrow Stromal Cells). Un'altra fonte di cellule staminali si trova nei diversi tessuti periferici, che però non sono facilmente isolabili da un individuo, senza ledere il tessuto di origine.

Una fonte particolarmente ricca di cellule staminali mesenchimali è costituita anche, dalle cellule staminali isolabili dalla polpa dentale.

Le cellule staminali derivate dalla polpa dentale di soggetti adulti (dental pulp stem cells – DPSC) e quelle derivate in seguito all'esfoliazione di un dente deciduo (stem cells of human exfoliated deciduous teeth- SHED), sono facilmente ricavabili, e presentano un'elevata capacità proliferativa ed una importante plasticità cellulare, caratteristiche assai rilevanti per possibili applicazioni terapeutiche future.

E' stato dimostrato che dalla polpa dentale di denti decidui è possibile isolare cellule staminali multipotenti, di cui è stata dimostrata o suggerita la differenziazione in senso neuronale, adipocitico e odontoblastico.

Alla luce delle potenzialità delle cellule staminali di derivazione pulpare sopra descritte, ci si è posti il problema di come conservare e "bancare" tali cellule in vista di possibili futuri utilizzi terapeutici.

Gli elementi dentali utilizzati per questa ricerca sono considerati nella quotidiana attività odontoiatrica, materiale di "scarto", denti che vengono chirurgicamente avulsi, ad esempio, per problematiche di malocclusione. In particolare gli elementi dentali selezionati sono i denti decidui che conservino la quasi totalità della struttura, e i germi dei terzi molari (non ancora formati completamente e ritenuti all'interno delle ossa mascellari).

In alternativa a diverse metodiche di crioconservazione delle cellule staminali estratte dal dente, che richiedono l'utilizzo di onerose procedure di purificazione ed espansione cellulare, sono state utilizzate procedure in cui denti intatti, estratti dalla loro sede, vengono sottoposti direttamente a crioconservazione e bancaggio. Scopo di tali procedure è recuperare la polpa e le cellule staminali in essa contenute in una fase successiva, solo nel momento di un'eventuale necessità terapeutica. Benché tali metodiche presentino il vantaggio di essere più veloci e meno dispendiose rispetto alle metodiche che prevedono la purificazione cellulare prima del congelamento, la crioconservazione di un dente intatto non assicura una vitalità cellulare ottimale dopo scongelamento perché il crioprotettore non raggiunge facilmente la polpa dentale a causa dell'isolamento esercitato dalla dentina e dallo smalto.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di isolare una popolazione di cellule staminali dalla polpa dentale con caratteristiche mesenchimali.

Una volta verificata *in vitro* la loro capacità di differenziare in cellule di origine mesenchimale, è stata testata la loro capacità di differenziarsi senza utilizzare terreni contenenti fattori di crescita.

Lo studio ha portato alla creazione del brevetto no. MI2010A000839, nel quale è stata messa a punto una nuova metodica di crioconservazione del dente in toto subito dopo l'estrazione, che assicuri un'ottimale conservazione della polpa dentale preservando la staminalità delle cellule in essa contenute. La metodica comporta l'utilizzo di un laser che permette di effettuare sul dente alcuni fori affinché la polpa possa venire in contatto con l'agente crioconservante. L'impiego del laser consente di rimuovere, in modo estremamente preciso e selettivo, porzioni di smalto dentale e dentina, senza il rischio di asportare, lacerare o surriscaldare la polpa dentale e preservandone la vitalità cellulare.

CAPITOLO 1: CELLULE STAMINALI

1.1 Introduzione

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

Il pionieristico lavoro di Till e McCullough (1961) sulle cellule staminali emopoietiche del topo ha costituito senza dubbio la base di partenza per tutte le successive strategie di ricerca sulle cellule staminali. Questo lavoro, infatti, indicò i paradigmi concettuali che ancora oggi la comunità scientifica impiega per progettare ricerche ed applicazioni cliniche. Si deve quindi alla grande tradizione degli studi ematologici (Little e Storb, 2002) l'aver indicato la strada che ha portato all'attuale enorme interesse per un possibile impiego terapeutico delle cellule staminali nella cura di un vasto spettro di patologie sulla base delle straordinarie potenzialità differenziative delle cellule staminali (Henningson et al., 2003) isolate da adulto, da cordone ombelicale, da feto, da gonadi fetali (cellule embrionali germinali, EG) e dall'embrione preimpianto (cellule staminali embrionali, ES). Le cellule staminali somatiche (non embrionali) già assicurano alcune importanti applicazioni per il trattamento di leucemie, dei grandi ustionati e della degenerazione della retina.

Attraverso una divisione cellulare asimmetrica definita "mitosi bivalente", la cellula staminale dà origine a due cellule figlie, di cui una identica a se stessa, scarsa-

mente proliferante ed in grado di mantenere invariato il *pool* di cellule staminali di quel tessuto, l'altra con capacità proliferativa e di maturazione progressiva verso cellule fenotipicamente e funzionalmente sempre più specializzate. Con questa divisione asimmetrica viene mantenuto inalterato il numero di cellule staminali, mentre le cellule maggiormente commissionate, dividendosi ulteriormente, daranno origine ad un numero rilevante di cellule mature che compongono i tessuti.

Saggi biologici rigorosi furono dunque sviluppati per valutare il potenziale di cellule candidate al ruolo di staminali.

Per definire una cellula come staminale sono utilizzati quattro criteri:

- la cellula deve poter andare incontro a molteplici e sequenziali divisioni cellulari di auto-mantenimento, un prerequisito per sostenere una popolazione cellulare.
- le cellule figlie derivate da una singola cellula staminale devono poter differenziare in almeno un diverso tipo cellulare rispetto a quello della staminale.
- capacità delle cellule di ripopolare il tessuto di origine se trapiantate in un sito ricevente danneggiato.
- le cellule devono essere in grado di contribuire con una progenie differenziata *in vivo* anche in assenza di danni tissutali

Sono state individuate e descritte cellule con caratteristiche di staminalità in tessuti embrionali, fetali, ed adulti.

1.2 Definizione e caratteristiche

L'embriogenesi è il processo durante il quale da un singolo ovocita fecondato derivano differenti tipi cellulari che, proliferando, danno origine ad organi e tessuti. Alla fine di tale processo quindi si avrà un organismo multicellulare le cui cellule e tessuti differenziati sono destinati a svolgere specifiche funzioni in diversi organi del corpo.

Molti degli organi e dei tessuti che costituiscono un organismo adulto vanno incontro ad un processo conosciuto come omeostasi, durante il quale nuove cellule sostituiscono quelle che muoiono per morte naturale o in seguito ad un danno.

Nei mammiferi possiamo ritrovare questa capacità solamente in alcuni organi come ad esempio nel fegato che può rigenerare in parte in seguito ad una lesione non troppo grave, o nell'epidermide che può riparare in seguito ad una ferita o ancora nei capelli che possono ricrescere dopo essere stati tagliati. Inoltre l'epidermide, i capelli, il piccolo intestino e il sistema ematopoietico sono tutti esempi di tessuti adulti con un alto turn-over cellulare: anche in assenza di un danno in questi tessuti originano continuamente nuove cellule, capaci di dividersi, differenziarsi e poi morire.

La capacità di un embrione di dare origine a tutti i tessuti dell'organismo adulto e la capacità di alcuni tessuti adulti di rigenerare durante tutta la vita è dovuta alla presenza di una particolare popolazione cellulare: le cellule staminali.

Una cellula staminale viene definita come una cellula non specializzata che ha la capacità di moltiplicarsi indefinitamente mediante divisioni cellulari e che, se sottoposta ad appropriati stimoli, è in grado di differenziarsi in cellule mature con specifiche funzioni. Inoltre, ogni singola cellula staminale deve essere in grado di dividersi in maniera asimmetrica generando così oltre che una cellula che andrà incontro a differenziamento anche ad una linea cellulare geneticamente uguale a se stessa, chiamata clone.

L'unica cellula totipotente, in grado di dare origine a tutti i tessuti embrionali ed extraembrionali, è lo zigote, originato dalla fusione del gamete maschile con il gamete femminile. Dopo diversi cicli di divisioni cellulari, le cellule che derivano dallo zigote, all'inizio tutte uguali, differenziano nel trofoblasto, da cui origineranno placenta e tessuti extraembrionali, e nella massa cellulare interna, che formerà l'embrione. Le cellule della massa cellulare interna sono definite come pluripotenti, cioè in grado di differenziare in cellule appartenenti a tutti i tessuti dell'organismo, quindi di derivazione mesodermica, endodermica e ectodermica, fatta eccezione per i tessuti extraembrionali.

Vengono invece definite multipotenti perché capaci di dare origine ad un numero

limitato di cellule differenziate, le cellule staminali presenti negli organi, quindi in tessuti adulti, che garantiscono all'organo un elevato potenziale rigenerativo anche in seguito ad un danno. In alcuni tessuti adulti sottoposti a continuo rinnovamento, quali ad esempio gli epiteli, sono presenti anche cellule staminali definite unipotenti, che possiedono cioè capacità di dare origine ad un solo tipo cellulare appartenente al tessuto di residenza [*Stocum DL, 2001; Report NHI, 2001*].

Le cellule staminali possono anche essere suddivise a seconda del tipo di tessuto di derivazione in due categorie: le cellule staminali embrionali che vengono isolate dalla massa cellulare interna della blastocisti prima dell'impianto in utero e le cellule staminali adulte ottenute da qualsiasi tessuto di un organismo dopo la nascita.

L'elevato potenziale differenziativo *in vitro*, necessario per l'ottenimento di un numero di cellule sufficienti per una eventuale terapia e soprattutto le prospettive sul differenziamento verso linee cellulari diverse, fanno delle cellule staminali un interessante candidato per il trattamento di un vasto spettro di patologie per cui gli approcci tradizionali sono inefficaci.

In base alle loro potenzialità differenziative, le cellule staminali sono classicamente suddivise in:

⚡ **Cellule Staminali Totipotenti:** cellule staminali in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale. Queste cellule derivano da embrioni allo stadio di 4-8 cellule, dopo 1-3 giorni dalla fecondazione;

⚡ **Cellule Staminali Pluripotenti:** cellule embrionali allo stadio di blastocisti, dopo 4-14 giorni dalla fecondazione. Queste cellule sono capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre diversi foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma);

⚡ **Cellule Staminali Germinali:** sono cellule staminali pluripotenti (cellule riproduttive progenitrici). Nell'embrione post-impianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se difficile è il loro isolamento.

Queste cellule rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi e compaiono nell'embrione umano, alla 3° settimana di sviluppo. Se isolate, queste cellule sono in grado, come le cellule staminali embrionali, di replicarsi illimitatamente in vitro mantenendo capacità differenziative pluripotenti.

⚡ **Cellule Staminali Multipotenti:** sono cellule che hanno la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in coltura, ma non quella di rinnovarsi in modo illimitato. Differenziano in tessuti diversi ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale. Appartengono a tale categoria le cellule staminali adulte.

⚡ **Cellule Staminali Unipotenti:** presenti nei tessuti adulti, potenzialmente più limitate nonché organo-specifiche, sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento.

La multipotenzialità dei compartimenti rigenerativi intratissutali viene conservata nell'individuo adulto dalle cellule staminali adulte con un potenziale di staminalità che assicura il rinnovamento dei vari tessuti specializzati.

Tra le cellule staminali adulte, già da lungo tempo sono state identificate le cellule staminali emopoietiche (HSC) da cui originano tutte le cellule emopoietiche, più di recente sono state scoperte cellule staminali nervose (NSC) da cui differenziano neuroni, astrociti ed oligodendrociti, cellule miosatelliti del muscolo scheletrico, condroblasti pericondrali della cartilagine, cellule ovali del fegato, cellule staminali dello strato basale dell' epidermide, cellule staminali della cornea. Più di recente sono state le cellule staminali mesenchimali (MSC) a catalizzare l'interesse dei ricercatori.

Le cellule staminali embrionali (ESC), ottenute a partire dalla massa interna della blastocisti, rispondono a tutti i criteri di staminalità, esse possono essere espanse in stato indifferenziato indefinitamente, sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari adulti se iniettate in una blastocisti ricevente in sviluppo.

Le ESC possono differenziare funzionalmente in cellule di tutti i tessuti adulti.

1.3 Caratterizzazione e differenziamento

I criteri di staminalità sono stati ampiamente validati con le cellule staminali emopoietiche (HSC). Una singola HSC può andare incontro a divisioni di auto-mantenimento generando un clone che può dare origine a tutti gli elementi del sangue, può ricostituire il sistema emopoietico in un trapianto in riceventi letalmente irradiati, può attecchire e differenziare anche se il ricevente non è stato irradiato. Le HSC possono essere purificate, grazie alla separazione cellulare attivata da fluorescenza (FACS). La maggior parte delle HSC umane sono presenti nella frazione CD34+ del midollo osseo (BM), del sangue periferico (PB) e cordonale (UCB).

Solidi sono i dati ottenuti mediante una tecnica di marcatura retrovirale. Siccome i retrovirus si integrano in regioni casuali del DNA della cellula ospite, le sequenze fiancheggianti l'integrante virale sono cellula-specifiche e possono essere sfruttate per seguire la progenie di singole cellule *in vitro* ed *in vivo*. Questo approccio è stato sfruttato per dimostrare che una singola cellula umana può dare origine a molteplici cellule di progenie. Inoltre questa tecnica ha permesso la dimostrazione che singole HSC vanno incontro a divisioni di auto-mantenimento e che le molteplici cellule figlie hanno potenziale differenziativo in più *lineage*.

Di recente questi criteri sono stati applicati per identificare altre cellule staminali adulte. Per esempio le cellule staminali nervose (NSC) possono essere purificate dal cervello umano usando una combinazione di anticorpi contro CD133 e CD24. Le cellule CD133+ CD24- generano aggregati (neurosfere) che possono essere ulteriormente coltivati dando origine ad astrociti, oligodendrociti e neuroni.

A differenza delle cellule staminali embrionali (ESC), le cellule staminali adulte hanno una minore capacità di automantenimento, in parte a causa di una carenza di alti livelli di attività delle telomerasi, livelli comunque molto superiori a quelli medi delle cellule somatiche.

1.4 Le cellule staminali embrionali (ESC)

Le cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC) derivano dalla massa cellulare interna (MCI) della blastocisti, allo stadio di sviluppo embrionale che precede l'impianto *in utero*. La blastocisti si presenta come una sfera suddivisibile in una parte chiamata trofoblasto, che costituisce lo strato esterno, una porzione interna cava e riempita di fluido, chiamata blastocele, e in una terza parte detta MCI le cui cellule sono in grado di proliferare indefinitamente senza andare incontro a processi di differenziazione e mantenendo un cariotipo normale e diploide. Individualmente queste cellule sono in grado di dare origine a cellule germinali e a tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma), sia *in vivo* che *in vitro* mediante appropriate condizioni di coltura.

Le ESC sono state ottenute dal topo la prima volta nel 1981 [Evans MJ *et al.*, 1981] poi sono state isolate dai primati non umani [Thomson JA *et al.*, 1995, 1996] e nel 1998 dall'uomo [Thomson JA *et al.*, 1998].

Le colture di ESC umane vengono ottenute da blastocisti originate in seguito a pratiche di fecondazione assistita, inutilizzate e congelate, oppure da cellule germinali primordiali provenienti da embrioni di 5-9 settimane [Thomson *et al.*, 1998; Shamblott *et al.*, 1998]. La metodologia di isolamento delle ESC è rimasta pressoché invariata dai primi anni in cui venivano condotti questi studi e consiste nella rimozione del trofoblasto esterno della blastocisti che lascia scoperta la massa cellulare interna poi piastrata su un feeder layer di cellule mitoticamente inattive.

Le ESC presentano un distintivo profilo antigenico caratterizzato da elevati livelli di espressione di antigeni embrionali, quali SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 [Henderson *et al.*, 2002] fosfatasi alcalina oltre che presentare elevati livelli di telomerasi, una ribonucleoproteina responsabile del mantenimento della lunghezza delle sequenze telomeriche durante le divisioni cellulari e quindi dell'elevata

capacità proliferativa di queste cellule [Thomson *et al.*, 1998]. Infatti mentre le linee cellulari somatiche diploidi che non esprimono questo enzima a livelli abbastanza elevati entrano in senescenza replicativa dopo circa 50/80 population doublings, le ESC possono essere coltivate *in vitro* per lunghi periodi di tempo anche oltre 2 anni superando 300-450 population doublings.

L'utilizzo delle ESC risulta essere di fondamentale interesse per la comprensione dei geni coinvolti durante lo sviluppo embrionale: tramite il loro impiego si possono identificare gli eventi genetici, molecolari e cellulari che stanno alla base di molte patologie congenite e malformazioni placentari che causano aborti spontanei. Tuttavia poiché non è ancora chiaro il rischio di cancerosità indotto dal trapianto di tali cellule e soprattutto poiché il processo di estrazione di queste cellule necessita della distruzione dell'embrione, in Italia come in molti altri Paesi, motivi di ordine etico e legislativo (*Legge del 19 febbraio 2004, n°40 Art. 13*) impediscono la sperimentazione di embrioni umani. Per questo motivo è stato necessario ricercare una sorgente di cellule staminali alternativa, come sono le cellule staminali del tessuto adulto.

1.5 Le cellule staminali adulte (ASC)

Le cellule staminali adulte (Adult Stem Cell, ASC) a differenza delle staminali embrionali, sono poche, solitamente raggruppate e localizzate in “nicchie” e difficili da isolare in gran numero da un organo [Spradling *et al.*, 2001]. Vengono isolate da tessuti ed organi specializzati e sono tradizionalmente classificate come cellule staminali multipotenti: sono cioè in grado di differenziare in un numero limitato di tipi cellulari adulti. Esse, infatti, danno principalmente origine a nuove cellule proprie del tessuto dove risiedono, mantenendo, così, il normale ricambio cellulare e l'omeostasi dell'organo. In caso di danno possono anche contribuire alla rigenerazione tissutale con cellule di nuova formazione. Ciascun tessuto per-

tanto sembra possedere una popolazione staminale residente che contribuisce al mantenimento del tessuto [Fortier et al., 2005].

Questo tipo cellulare è l'unico ad essere fino ad ora usato a scopo terapeutico. Il loro studio comincia dopo la II guerra mondiale, osservando gli effetti che l'irradiazione aveva provocato sui residenti di Hiroshima e Nagasaki. Quella parte di cittadini che non era deceduta immediatamente per l'esposizione all'irradiazione, moriva lentamente per l'insorgenza di infezioni e disturbi coagulativi provocati dall'insufficienza midollare.

Nel 1956 il primo trapianto di midollo osseo nel topo irradiato ha dimostrato che nel midollo sono contenute cellule staminali [Thomas, E. D et al., 1957]. L'individuazione di tali cellule risale al 1961 [Till, J. E. et al., 1961] e fino ad oggi l'utilizzo di queste cellule con il trapianto midollare rappresenta l'unica cura definitiva di numerose malattie ematopoietiche.

Nel corso degli anni sono stati individuati diversi tipi di cellule staminali adulte nei numerosi tessuti. Oggi si considera che queste cellule si possono trovare nel midollo osseo, sangue periferico, cervello, fegato, milza, cute, muscolo scheletrico, tratto gastrointestinale, pancreas, occhio, polpa dentale, tessuto adiposo, placenta, cordone ombelicale e sangue cordonale [Markov et al., 2007] e, secondo quanto recentemente scoperto, anche nel liquido amniotico [De Coppi et al., 2007].

Le cellule staminali adulte si dividono in cellule staminali derivanti da:

- tessuti di origine *mesodermica*: cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che hanno la capacità di ricostruire l'intero sistema ematopoietico in quanto da esse derivano tutti gli elementi corpuscolari del sangue: eritrociti, piastrine, granulociti, monociti e linfociti (B; T; NK). Le HSC sono state riconosciute come cellule staminali più di 50 anni fa [Till JE et al., 1961] e sono utilizzate ormai da anni nel trattamento di numerosi disordini ematologici. Possono venire isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal sangue del cordone ombelicale.

Di origine mesodermica sono anche le cellule staminali del muscolo scheletrico, dette cellule satellite. Scoperte da Katz e Mauro nel 1961, sono cellule miogeniche, multinucleate e quiescenti localizzate sulla superficie delle fibre muscolari differenziate in modo terminale, tra il sarcolemma e la membrana basale. Tali cellule normalmente non si dividono ma fungono da popolazione cellulare di riserva che in seguito a danno muscolare, è in grado di proliferare e ricapitolare il programma di differenziazione muscolare fino a differenziarsi in miofibre [Hansen-Smith FM et al., 1979; Jones PH, 1982].

- tessuti di origine *ectodermica ed endodermica*: sono state identificate nel sistema nervoso, nell'epidermide, nei follicoli dei capelli, nella cornea, nell'epitelio respiratorio e in quello del canale digerente, nel pancreas e nel fegato. Queste cellule rivestono sia superfici interne che esterne e svolgono varie funzioni come la secrezione, l'assorbimento e il mantenimento dell'integrità delle superfici.

L'epidermide ad esempio, contiene, a livello della regione basale, cellule staminali (Epithelial Stem Cells, EpSC) che differenziano in cheratinociti mentre si muovono verso gli strati più esterni della pelle [Jensen UB et al., 1999]; anche le cellule presenti nell'epitelio dell'intestino si rinnovano continuamente grazie alla proliferazione ed al differenziamento di cellule staminali (Intestinal Stem Cells, ISC) individuate nelle cripte di Lieberkuhn.

Anche a livello del tessuto nervoso ritenuto fino a poco tempo fa incapace di rigenerarsi, sono state identificate cellule staminali (Neural Stem Cells, NSC). Le NSC nei mammiferi sono state isolate dalla zona subventricolare dell'encefalo [Reynolds BA et al., 1992] e nel giro dentato dell'ippocampo [Palmer TD et al., 1997]. *In vitro*, oltre che formare neurosfere, sono in grado di differenziarsi sia in neuroni che in cellule della glia (astrociti e oligodendrociti).

Nel fegato le cellule staminali residenti sono le cellule ovali (Liver Progenitor Cells, LPC) che si trovano localizzate nell'epitelio dei canali di Hering. Tali cel-

lule sono bipotenti in quanto possono differenziarsi in epatociti e colangiociti, cellule epiteliali del dotto biliare.

1.6 Plasticità differenziativa

Durante gli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi articoli che suggeriscono che le ipotesi di tessuto-specificità per le cellule staminali adulte potrebbero essere troppo stringenti. La capacità di cellule staminali di acquisire il destino di tipi cellulari diversi da quelli del tessuto di origine è stata definita “plasticità” delle cellule staminali adulte. Questi studi hanno generato un interesse notevole, ma hanno anche incontrato un importante scetticismo e rimangono ampiamente controversi: la maggior parte degli studi attende tutt’ora conferme indipendenti, la cosiddetta infedeltà di *lineage* compare a bassissima frequenza, non si dimostra che la plasticità è il risultato del differenziamento a livello di singola cellula in più *lineage* funzionalmente caratterizzati e, non da ultimo, queste infedeltà di *lineage* negano principi consolidati della biologia dello sviluppo.

La maggior parte degli studi ha mostrato la plasticità utilizzando cellule derivate da midollo osseo.

Gli studi di Friedenstein ed altri hanno dimostrato in maniera solida che MSC umane da midollo possiedono multipotenzialità a livello di singola cellula verso i commissionamenti di osteoblasti, adipociti, condrociti, fibroblasti e cellule reticolari avventiziali, vanno di conseguenza consolidandosi le conoscenze sui fattori necessari per l’induzione in tali *lineage*, e sulle vie di segnalazione che sottintendono a tali processi.

E’ stata messa in evidenza la potenzialità differenziativa *in vitro* verso *lineage* di muscolo striato, liscio e cardiaco, con l’espressione di proteine muscolo-specifiche quali myoD, miogenina, desmina, alfa-actinina sarcomerica, etc; verso *lineage* endoteliali, caratterizzati dall’espressione di proteine quali il fattore di Von

Willebrand e dalla capacità funzionale di creare strutture simili ai capillari su matrice della membrana basale (Matrigel); verso *lineage* neurali, con l'espressione di alti livelli di proteine specifiche e con l'adozione delle morfologie caratteristiche delle cellule neuronali; verso lineage epatocitari, con le caratteristiche funzionali -captazione di Di- Ac-LDL, rilascio di albumina- nonché morfologiche delle cellule epatiche.

Numerosi studi hanno mostrato la presenza nei vari tessuti del ricevente, benchè a bassissima frequenza, di cellule derivate da donatore differenziate in *lineage* mesodermici diversi dall'ematopoietico. I tessuti in cui è stato osservato contributo da donatore includono il muscolo scheletrico, l'endotelio e il muscolo cardiaco. Sono ancora più sorprendenti gli studi che suggeriscono che le cellule di midollo osseo possano differenziare *in vivo* in cellule di tessuti di diversi foglietti embrionali.

Numerosi studi suggeriscono che cellule di midollo osseo potrebbero differenziare *in vivo* in cellule con morfologia e fenotipo neuroectodermico.

Questi studi suggeriscono che nel midollo osseo, e possibilmente in altri tessuti, esistano cellule di natura multipotente, dotate di una notevole "plasticità".

Numerosi meccanismi potrebbero sottostare a questa apparente plasticità: cellule staminali tessuto-specifiche potrebbero essere presenti in molteplici organi differenti; la plasticità potrebbe essere il risultato della fusione delle cellule del donatore con le cellule residenti in un organo; le cellule potrebbero andare incontro a dedifferenziamento e ridifferenziamento; oppure vere e proprie cellule staminali potrebbero persistere nella vita post-natale.

Esistono dati a supporto di ciascuno dei quattro modelli e la questione è tutt'ora abbondantemente dibattuta.

Non esiste una definizione "ufficiale" di plasticità delle cellule staminali.

Una definizione possibile è che *cellule staminali adulte tessutospecifiche, teoricamente commissionate verso un dato lineage cellulare, possono in particolari condizioni di microambiente acquisire l'abilità di differenziare in cellule di un tessuto differente.*

Questa definizione implica che:

- 1) differenti *lineage* cellulari devono poter derivare da una singola cellula iniziale
- 2) i tipi cellulari differenziati devono mostrare funzionalità *in vitro* ed *in vivo*
- 3) l'attecchimento deve risultare robusto e persistente in presenza (ed in assenza) di danno tessutale.

Questi criteri possono essere utilizzati per valutare gli studi che descrivono la plasticità delle cellule staminali.

La maggioranza degli studi è stata compiuta in modelli animali roditori mentre un numero minore discute della plasticità negli umani.

Tuttavia è da sottolineare la presenza di limiti nelle metodologie di rilevamento delle cellule del donatore utilizzando ciascuno dei precedenti sistemi.

CAPITOLO 2: CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

2.1 Definizione e caratteristiche

Le cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) sono una popolazione con elevata capacità proliferativa e con potenziale di differenziazione multilineare; rappresentano, quindi, delle buone candidate per la terapia cellulare e la medicina rigenerativa.

Sono una popolazione di cellule staminali adulte non ematopoietiche, self-renewal, con caratteristiche di multipotenzialità, presenti in maggior percentuale nello stroma del midollo osseo e differenziabili in vari tipi di cellule di origine mesodermica quali condrociti, osteoblasti, adipociti e mioblasti [Dominici *et al.*, 2006].

Le MSCs derivano dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio da cui originano i tessuti connettivi di tutto l'organismo, che si differenzia intorno al terzo mese di gestazione. Il mesenchima differisce notevolmente dagli altri foglietti embrionali, costituiti quasi esclusivamente di cellule, in quanto è composto da un'abbondante matrice extracellulare in cui sono immerse le cellule mesenchimali. Il tessuto mesenchimale si ritrova in tutti gli organi, per garantire supporto strutturale e per regolare il traffico di cellule attraverso i tessuti. Le MSCs, derivano principalmente dal mesoderma, ma possono originare anche da alcune porzioni degli altri due foglietti embrionali: l'ectoderma della cresta neurale e l'endoderma della placca precordale. Tuttavia non si conosce molto sul loro sviluppo durante la vita fetale e post-natale.

Questa popolazione cellulare abbastanza omogenea, consiste di uno strato di cellule stipate, in gruppi, rotondeggianti, situate nel mesenchima, esprimono varie proteine della matrice extracellulare, in grado di supportare l'emopoiesi sia embrionale sia adulta.

Una quota cospicua di cellule analoghe per fenotipo e caratteristiche colturali alle MSCs midollari adulte, ma con potenzialità differenziative più grandi, è stata poi riscontrata nel sangue circolante di feto umano fino alla 7^o settimana di gestazione, dopo la quale queste cellule iniziano a diminuire di numero, persistendo fino alla 12^o settimana. Si può quindi supporre che durante lo sviluppo embrio-fetale ci siano cellule che si distribuiscono ai vari distretti corporei e persistono nell'adulto come riserva per la riparazione e la rigenerazione tissutale.

Le MSCs sono in grado di differenziare non solo in tessuti di origine mesenchimale, tra cui stroma midollare, tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo e muscolare scheletrico, mesoderma viscerale e cellule endoteliali, ma anche in cellule di origine non mesodermica quali neuroni, cellule epiteliali di cute e tubo digerente, fegato e polmone. Le MSCs si distinguono da almeno altri due tipi cellulari. Il primo è costituito dalle *multipotent adult progenitor cells* (MAPC), elementi in grado di differenziare *in vitro* in cellule endoteliali, epiteliali, neuronali, e verosimilmente rappresentano il precursore comune multipotente da cui originano sia le cellule staminali emopoietiche che quelle mesenchimali. Il secondo tipo cellulare è costituito dalle genericamente dette *marrow stromal cells* o, come è stato suggerito recentemente, *multipotent mesenchymal stromal cells*, che hanno capacità differenziativa multilineare limitata ai soli tessuti di origine mesodermica (tessuto adiposo, osso, cartilagine, muscolo).

Alcuni fattori tissutali, inoltre, come il *basic fibroblast growth factor* (bFGF) o l'*heparin-binding growth factor-like growth factor* (hb-EGF), sembrano in grado non solo di incrementare la proliferazione, ma anche d'interferire con la capacità differenziativa delle MSCs, mantenendole nello stato di multipotenzialità.

Le MSC poste in coltura sono facilmente identificabili in quanto formano colonie di cellule aderenti caratterizzate dalla tipica morfologia fibroblastoide.

In laboratorio possono essere isolate, espanse (in quanto possiedono elevato potenziale proliferativo) e indotte a differenziare mediante l'utilizzo di terreni specifici [Ippokratis et al., 2005] non solo in cellule di origine mesodermica ma anche in cellule neuronali [Kim et al., 2006] ed epatociti [Lee et al., 2004] *in vitro* e *in vivo*, aspetto che le rende una interessante risorsa utilizzabile in una vasta gamma di applicazioni cliniche nel contesto della terapia cellulare e genica ed in medicina rigenerativa.

Le MSC hanno quindi attirato l'attenzione per sviluppare future terapie cellulari e geniche per diversi motivi:

- 1) sono facilmente ottenibili da tessuti adulti e quindi il loro utilizzo non presenta problematiche di carattere etico, a differenza delle staminali embrionali;
- 2) possono essere rapidamente espanse, senza perdere il fenotipo o la capacità differenziativa;
- 3) sono in possesso di un fenotipo superficiale scarsamente riconosciuto da cellule di tipo T [Gotherstrom et al., 2004].

La loro natura ipo-immunogenica consente il trapianto allogenico [Ryan et al., 2005; Caplan, 2007] che viene ben tollerato [Liechty et al., 2000; Grinnemo et al., 2004; Mansilla et al., 2005]. Inoltre la plasticità mostrata da tali cellule può essere sfruttata nell'ambito della medicina rigenerativa per lo sviluppo di protocolli clinici applicativi di terapia cellulare e in particolare per la completa rigenerazione di tessuti danneggiati.

Negli anni sono stati indagati quattro diversi metodi di utilizzo delle MSC per una potenziale applicazione clinica delle stesse cellule:

- l'impianto delle MSC direttamente in sede di danno
- la somministrazione sistemica
- la combinazione della terapia cellulare con la terapia genica
- l'utilizzo delle MSC in protocolli di ingegneria tissutale

Alcuni studi effettuati sugli animali hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo delle MSC nel trattamento di difetti dell'osso [Bruder *et al.*, 1994; Ohgushi *et al.*, 1989].

Questi risultati sono stati confermati anche nell'uomo in trial clinici dove sono state iniettate con successo in sede di danno MSC autologhe espanse *ex vivo* in pazienti affetti da patologie ossee [Quarto *et al.*, 2001].

Il potenziale terapeutico delle MSC somministrate per via sistemica è stato dimostrato in pazienti affetti da sindrome di Hurler [Koc *et al.*, 2002] e in bambini affetti da *osteogenesis imperfecta* [Horwitz *et al.*, 1999; 2001; 2002]. Questi studi hanno evidenziato non solo la capacità di engraftment delle MSC a livello delle ossa ma anche la loro capacità di differenziare in osteoblasti attivi. Inoltre nei bambini trattati è stato constatato un aumento dell'altezza e della densità minerale totale delle ossa. Purtroppo però il numero delle cellule che è riuscito a colonizzare il tessuto osseo non è stato molto e i pazienti hanno quindi dovuto ricevere anche delle altre terapie che hanno così reso difficile la determinazione del reale contributo delle MSC al positivo esito clinico.

Le MSC sono state anche somministrate in combinazione con le HSC per aumentare la capacità di homing di queste ultime nel midollo osseo [Koc *et al.*, 2000].

La combinazione della terapia genica con la terapia cellulare utilizzando le MSC costituisce un'attraente alternativa all'utilizzo delle cellule somatiche in quanto le MSC hanno un maggiore potenziale replicativo e una sopravvivenza superiore. Le MSC possono quindi essere utilizzate come trasportatori di geni o proteine all'interno di organi e tessuti che necessitano di una particolare terapia genica. Infine l'ingegneria tissutale potrebbe rappresentare un ulteriore campo di applicazione delle MSC per ottenere tessuti ed organi utili per il trapianto data la scarsa disponibilità di organi e i limiti dovuti alle reazioni di rigetto. Con le tecniche di ingegneria tissutale infatti le cellule stesse del paziente, una volta prelevate, potrebbero essere seminate su uno scaffold biodegradabile per formare un particolare tessuto [Stock *et al.*, 2001].

Nonostante la crescente e variegata quantità di informazioni riguardante le MSC, i

meccanismi che governano la loro capacità di rigenerarsi (self-renewal) e di differenziarsi in diverse linee cellulari non sono ancora ben noti, così come resta da chiarire l'esatta natura e localizzazione delle MSC *in vivo*.

Per convenzione si ritiene che tale tipo cellulare si trovi nel tessuto connettivo in formazione durante lo sviluppo dell'organismo e durante la sua rigenerazione o riparazione lungo la crescita post-natale.

Anche se il midollo osseo è stato considerato la fonte più accessibile e ricca di cellule staminali mesenchimali [Tuli *et al.*, 2003], queste sono state isolate a partire da numerosi tessuti quali cartilagine, periostio, liquido sinoviale, muscolo e tendine. E' stata inoltre riportata la presenza di popolazioni cellulari con caratteristiche sovrapponibili a quelle mesenchimali nei tessuti fetali, placenta, sangue cordonale e tessuto adiposo [In't Anker *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2003; In't Anker *et al.*, 2004; Dicker *et al.*, 2005].

Sin dal lavoro di Castro-Malaspina e colleghi del 1980 [Castro-Malaspina H *et al.*, 1980] molti ricercatori hanno impiegato diversi metodi per isolare MSC e hanno sviluppato nuovi approcci per la loro purificazione.

Tuttavia manca una definizione unica di MSC e le diverse metodologie usate per coltivare e caratterizzare tipi cellulari riconducibili alle MSC hanno portato alla conoscenza di diversi marcatori di superficie che caratterizzano le MSC.

2.2 Caratterizzazione fenotipica

Le MSCs possono essere facilmente isolate grazie alla loro capacità di aderire su plastica.

Le cellule possono essere seminate in piastre o fiasche di coltura a diverse concentrazioni, con terreni di coltura addizionati di siero animale o umano al 10-20% ed antibiotici, e coltivate in appropriate condizioni. Dopo alcune ore, le cellule aderiscono alla superficie della fiasca, mentre quelle non aderenti vengono rimosse con un cambio di terreno, generalmente dopo 48 o 72 ore.

Già dopo alcuni giorni si formano dei foci di proliferazione cellulare, *fibroblast-*

colonyforming units (CFU-F), costituite da aggregati di almeno 50 cellule, che vengono contate dopo 14 giorni e rapportate alla popolazione cellulare di partenza, in modo da quantificarne la capacità clonogenica. I foci di cellule aderenti crescono molto rapidamente e tendono alla confluenza reciproca, che porta all'arresto della proliferazione ed alla differenziazione spontanea in pre-adipociti. Pertanto, quando il monostrato cellulare diventa semi-confluente (il 70-80% della superficie della fiasca coperta dalle cellule), le cellule vengono tripsinizzate, lavate e nuovamente seminate in fiasche con superficie maggiore per l'ulteriore espansione. Una popolazione cellulare omogenea si ottiene in genere dopo 3-5 settimane di coltura e questa è capace di proliferare senza differenziare spontaneamente fino a 40 generazioni. Le MSCs possono essere isolate ed espanse *in vitro* senza apparente modificazione del fenotipo e/o perdita di funzione.

La caratterizzazione fenotipica delle MSCs rimane ancora un campo di approfondimento data la mancanza di un marcatore specifico per l'analisi e l'isolamento delle MSCs.

Infatti, le MSCs sono prive di *markers* distintivi unici, così vengono individuate attraverso l'analisi di un complesso immunofenotipo, che comprende la mancanza di antigeni tipici delle cellule staminali emopoietiche, come il CD45, il CD34 ed il CD14, e l'espressione di una serie di molecole di superficie, come il CD90, chiamato anche Thy-1, il CD105 o endoglina; il CD29 o subunità β del recettore per la fibronectina, il CD44 o recettore-III della matrice extracellulare ed il CD73 o SH3-SH4. Le MSCs, anche dopo espansione *in vitro*, mantengono l'espressione di antigeni di superficie come il CD105, CD90, CD73 e CD44. Questi marcatori sono risultati uniformemente e fortemente espressi sulle MSCs isolati da tessuti di diversa origine. Nonostante la maggior parte dei dati pubblicati si riferiscono a colture cellulari ottenute da midollo osseo, si sta raccogliendo un sempre maggior numero di informazioni sulle MSCs ottenute da fonti alternative come il tessuto adiposo, il sangue periferico, il cordone ombelicale ed i tessuti fetali. Queste cellule condividono, *in vitro*, molte delle caratteristiche delle MSCs da midollo osseo: l'aderenza alla plastica, la morfologia fibroblastoide, la formazione di

CFU-F, alcuni markers superficiali ed il potenziale differenziativo in senso osteogenico, adipogenico e condrogenico in seguito ad appropriati stimoli.

In seguito a numerose ricerche che prevedevano lo studio di diversi antigeni di superficie si è riusciti a determinare quali marcatori non vengono espressi dalle MSC. Non è stato invece raggiunto un consenso generale per quanto riguarda la determinazione di un marcatore positivo che possa essere impiegato per identificarle in maniera inequivocabile.

E' generalmente accettato che nell' uomo adulto tali cellule esprimono i marcatori stromali quali: CD29, CD44, CD71 (recettore per la Transferrina), CD73 (SH3/4, 5' nucleotidasi), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2, endoglin), CD106 (VCAM-1, molecola di adesione per cellule Vascolari) e CD166 (ALCAM, molecola di adesione per leucociti) [*Chamberlain et al.*, 2007].

Avere una precisa caratterizzazione delle MSC è complicato anche dal fatto che questo stesso tipo cellulare proveniente da specie diverse può esprimere antigeni diversi . Inoltre molti marcatori presentano una grande variabilità di espressione a seconda del tessuto e dal metodo di isolamento delle MSC: è stato riportato che Stro-1 è positivo nelle MSC stromali, mentre non risulta essere espresso nelle MSC del sangue periferico [*Kuznetsov et al.*, 2001].

2.3 Cellule staminali mesenchimali nel sangue del cordone ombelicale

Il sangue del cordone si è rivelato un'eccellente risorsa di cellule staminali emopoietiche per il trapianto allogenico. Presenta una ottimale quantità di cellule CD34+ CD38-, suggerendo che nel sangue neonatale possano essere presenti progenitori dotati di potenziale proliferativo e differenziativo. Alcuni ricercatori hanno quindi ipotizzato che nel cordone potessero essere presenti anche progenitori mesenchimali. Diversi autori hanno escluso tale possibilità, ma nel 2004 Bieback e collaboratori hanno dimostrato che rispettando determinati parametri, quali un ridotto tempo di conservazione dei campioni e la disponibilità

di almeno 1×10^8 cellule mononucleate, è possibile isolare elementi simili alle MSCs (*MSC-like cells*) dal sangue di cordone con un'efficienza maggiore del 60%. Tali cellule hanno una frequenza molto più bassa nel cordone rispetto che nel midollo ma mostrano una maggiore capacità proliferativa.

Sono inoltre in grado di differenziare in senso osteogenico e condrogenico, come quelle ottenute da midollo, mentre necessitano di particolari condizioni di coltura per originare cellule del tessuto adiposo (coltura in terreno di induzione per il differenziamento adipogenico per almeno 5 settimane).

2.4 Cellule staminali mesenchimali nel liquido amniotico e nei villi coriali

L'amnios, insieme al corion, al sacco vitellino ed all'allantoide, costituiscono gli annessi embrionali o fetali che garantiscono il nutrimento e la protezione del feto. Questi, attraverso il corion prendono contatto con la placenta, una struttura discoidale formata da una parte fetale (la placca coriale) e da una parte materna (decidua basale). L'amnios si genera dalla cavità amniotica primaria rivestita da un foglietto ectodermico, che più tardi riceve l'apporto di una lamina somatopleurica esterna diventando l'amnios definitivo. E' all'interno della cavità amniotica, completamente chiusa, che si sviluppa l'embrione protetto e immerso nel liquido amniotico. Questo liquido, costituito da acqua, molecole di vario tipo, contiene cellule di sfaldamento dell'embrione. Si ritiene che il liquido amniotico sia ingerito dal feto e poi eliminato attraverso la circolazione fetale.

La quantità di liquido amniotico e la sua componente cellulare varia con l'età gestazionale.

Nella prima metà del periodo di gestazione la maggior parte del liquido amniotico è il risultato del trasporto attivo di sodio e cloro attorno alla membrana amniotica e alla cute fetale con un concomitante movimento passivo di acqua.

Nella seconda metà del periodo di gestazione, invece, il liquido amniotico deriva

per la maggior parte dalla minzione fetale e dalle secrezioni del tratto respiratorio e in quantità minori dalle escrezioni provenienti dal tratto gastrointestinale e dalla deglutizione.

Come risultato di tali dinamiche, si possono ritrovare nella cavità amniotica cellule derivanti dal tratto urinario, respiratorio e gastrointestinale.

È stato visto che approssimativamente l'1% delle cellule in coltura derivate dalle amniocentesi hanno caratteristiche di cellule staminali (*amniotic fluid stem cell*, *AFS*): esse mostrano un elevato potenziale di *self-renewal* ed esprimono il fattore trascrizionale Oct4, che testimonia che il loro stadio, è intermedio tra quello delle cellule embrionali ed adulte.

Differenti aspetti morfologici, biochimici e caratteristiche di crescita, portano a classificare le cellule del liquido amniotico aderenti in tre gruppi principali:

- le cellule di *tipo E*, epiteloidi (compaiono all'inizio della coltura, e successivamente mostrano un significativo decremento; derivano dalla cute fetale e dall'urina)
- le cellule di *tipo AF*, specifiche del liquido amniotico (compaiono all'inizio della coltura, persistono durante la coltura; derivano dalle membrane fetali e dal trofoblasto e producono ormoni (estrogeni, gonadotropina corionica umana e progesterone) che fanno presumere la loro origine dal tessuto trofoblastico placentare)
- le cellule di *tipo F*, fibroblastico (compaiono durante gli stadi tardivi della coltura; derivano dal tessuto fibroso connettivo e dai fibroblasti del derma; Anche se le cellule F non producono ormoni, esse sembrano originare dal tessuto mesenchimale)

Secondo uno studio del 1981 di Virtanen I. le cellule di origine epiteliale sono le più abbondanti mentre quelle fibroblastoidi si trovano occasionalmente. De Coppi P. ha dimostrato che un solo clone di cellule amnionitiche c-kit+ può generare cellule adipogeniche, osteogeniche, miogeniche, endoteliali, neurogeniche ed epatiche.

Diversi gruppi hanno osservato che le cellule ottenute da liquido amniotico hanno un *pattern* di espressione antigenica caratteristico di cellule staminali mesenchimali: sono infatti risultate positive alle molecole di superficie CD73, CD105, CD29, CD90 e MHC I.

Cellule simili sono state ottenute anche da placenta raccolta dopo il termine della gravidanza o da campioni di villi coriali raccolti tramite villocentesi.

La placenta si definisce strutturalmente nella quarta settimana di gestazione. Essa si forma mediante l'unione di una parte del corion con quella parte della mucosa uterina, con la quale il corion fa strette connessioni. Il suo processo di formazione viene chiamato *placentazione* e prevede:

- 1- l'impianto dell'embrione alla parete uterina;
- 2- la creazione di connessioni vascolari per la rimozione di cataboliti fetali attraverso il sangue materno per lo scambio di gas e nutrienti.

La placenta è costituita da cellule specializzate che tendono a formarsi precocemente (servono per ancorare l'embrione all'utero, formando connessioni vascolari che trasportano i nutrienti all'embrione) e attraverso funzioni endocrine, immunitarie e metaboliche, garantiscono la sopravvivenza dell'embrione.

I villi coriali sono strutture che si formano tra i 12 ed i 18 giorni dopo la fecondazione, quando il corion prende contatto con la mucosa uterina sulla sua superficie si formano delle estroflessioni, la cui parete è costituita da trofoblasto, che presenta all'interno un asse di mesenchima che circonda l'ansa capillare. L'asse di mesenchima e l'ansa capillare derivano dalla somatopleura e sono perciò di origine mesodermica.

Come le cellule ottenute da liquido amniotico e da midollo, tali cellule mostrano caratteristiche immunofenotipiche simili alle MSCs; esprimono, infatti geni marcatori di staminalità, come Oct4, Rex1 e GATA4, presentano buone capacità proliferative in vitro e possiedono la capacità differenziativa nelle linee osteogenica, condrogenica e neurogenica e scarsa nella linea adipogenica.

Le cellule dei villi coriali e quelle del liquido amniotico hanno un'origine diversa.

Entrambi questi tipi di cellule rappresentano una importante risorsa di cellule staminali nel prossimo futuro, risolvendo i problemi legati all'uso delle cellule staminali adulte ed i problemi etici e applicativi che si incontrano con le staminali embrionali.

2.5 Cellule staminali mesenchimali nel midollo osseo

Le cellule staminali mesenchimali furono descritte per la prima volta come progenitori derivati dalla frazione stromale di midollo osseo di ratto da parte di Friedenstein e Petrakova nel 1966 e successivamente Friedenstein divenne il pioniere delle metodiche di coltura *in vitro* per l'isolamento e la differenziazione delle MSCs.

Nella metà degli anni '70, le ricerche effettuate portarono all'evidenza definitiva della presenza nel midollo osseo adulto di cellule aderenti in grado di crescere in forma di fibroblasti e di differenziare in vari elementi mesenchimali.

Campioni di midollo osseo intero vennero seminati in piastre di coltura in plastica ed a distanza di quattro ore vennero rimosse tutte le cellule non aderenti. I pochi elementi aderenti presentavano un aspetto fusato o "simil-fibroblastico" e formavano CFU-F. Dopo diversi passaggi in coltura, le cellule che sopravvivevano divenivano omogenee e conservavano la capacità di replicarsi e di dare origine a cellule della cartilagine e della struttura ossea, confermando la multipotenzialità di queste cellule.

In presenza di adeguati stimoli, esse differenziano in adipociti, osteoblasti (con deposizione di cristalli di idrossiapatite), condrociti (con sintesi di matrice cartilaginea), e cellule muscolari (ricche in miotubuli).

Le recenti ricerche hanno dimostrato che le MSCs sono cellule relativamente rare nel midollo osseo (1/10⁵ delle cellule nucleate), dotate di elevata capacità proliferativa senza trasformazione neoplastica, conservando le proprietà staminali. Sono in grado di esprimere geni di origine embrionale, di sintetizzare molecole di contatto cellula-cellula e componenti della matrice extra-cellulare come il collagene e la fibronectina, di secernere citochine quali interleuchina (IL)-7, IL-8,

IL-11, *stem cell factor* (SCF) e *stromal-derivedfactor-1* (SDF-1), attraverso cui viene regolata la mobilizzazione dal midollo delle cellule staminali emopoietiche.

Per questa ragione le MSCs svolgono il ruolo essenziale di compartimento omeostatico delle cellule stromali midollari, rinnovando continuamente il microambiente necessario per l'emopoiesi. Infatti, tali cellule sono in grado di supportare in vitro le colture emopoietiche a lungo termine ed è stato dimostrato che la co-infusione di MSCs e cellule staminali emopoietiche consente un più rapido recupero ematologico dopo trattamento chemioterapico ad alte dosi rispetto alla sola infusione di cellule staminali emopoietiche.

Inoltre, data la loro derivazione dal mesoderma intra-embriionario, le MSCs sono in grado di differenziare in numerosi altri tessuti oltre a quelli delle linee osteogenica, adipogenica, condrogenica e muscolare, come cellule di origine endodermica (epatociti, pneumoniti) ed ectodermica (cellule nervose, cellule gliali). Le cellule staminali mesenchimali midollari infatti esprimono già basalmente marcatori neuronali a bassa intensità ed è descritta in letteratura la capacità delle MSCs midollari di differenziare in senso neurale

In seguito a stimoli appropriati. Tale pluripotenzialità è tuttavia progressivamente persa a seguito del processo di senescenza.

2.6 Cellule staminali mesenchimali nella polpa dentale

Negli ultimi anni diverse ricerche hanno dimostrato la presenza di cellule con caratteristiche di MSC residenti nella polpa dentale - una struttura stromale, fibrosa, altamente vascolarizzata, situata nella zona più interna del dente.

I progenitori mesenchimali della polpa nell'individuo adulto, DP-MS (Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells), hanno una derivazione, nel corso

dell'odontogenesi, ecto-mesenchimale, che avviene durante lo sviluppo embrionale e prosegue dopo la nascita fino all'età adulta.

Le staminali adulte sono capaci di fornire la rigenerazione dei tessuti del dente nell'adulto, quali lo smalto e la dentina, soggetti ad insulti ed abrasione.

I primi processi di differenziamento irreversibile, che porteranno alla formazione dei tessuti maturi del dente, cominciano nella

papilla dentale: è qui che le cellule differenziano in odontoblasti deputati alla formazione della dentina primaria.

La riparazione della dentina è caratterizzata dall'attivazione, proliferazione e maturazione degli odontoblasti con deposizione di nuovo tessuto matriciale. I fattori di crescita e le molecole coinvolti nell'attivazione di questi precursori sono gli stessi che guidano la dentinogenesi in condizioni fisiologiche. Lo stesso tessuto lesionato è responsabile della liberazione di componenti di deposito presenti nella matrice quali: DSP (dental sialo protein) e fattori di crescita (TGF- β , BMP-7); inoltre ne stimola la secrezione attiva da parte delle cellule circostanti la zona lesionata.

In caso di lesioni patologiche, che causano la morte degli stessi odontoblasti e l'apertura di cavità erosive fino alla polpa, è stata dimostrata la parziale rigenerazione attraverso l'attivazione di progenitori mesenchimali, presenti nella polpa del dente, capaci di differenziare e specializzarsi in odontoblasti.

Le staminali, in presenza di una segnalazione di necrosi nella dentina, proliferano, migrano nella zona e generano nuove cellule simil-odontoblastiche che secernono il nuovo strato riparatore, costituito da matrice mineralizzata, scarsamente organizzata, che funge da barriera protettiva per la polpa dentale.

Le DP-MSK umane sono state isolate in coltura dalla polpa dentale di denti molari e rivelano molte caratteristiche in comune con le mesenchimali del midollo osseo.

CAPITOLO 3: POTENZIALITA' DELLE CELLULE STAMINALI

3.1 Biologia di base delle cellule staminali

Le cellule staminali adulte rappresentano uno strumento molto potente per lo studio dell' autorinnovamento e del differenziamento. Anche nell'era precedente a quella della plasticità delle cellule staminali gli studiosi hanno utilizzato le cellule staminali e le cellule della loro progenie progressivamente commissionate per valutare gli effetti dei fattori di crescita e di altri segnali richiesti sul loro sviluppo. Con le conoscenze sul genoma e con le tecniche di analisi sul trascrittoma, le cellule staminali e la loro progenie commissionata possono essere utilizzate per definire quali programmi genetici hanno bisogno di essere attivati o inattivati per portare al differenziamento cellulare.

Poiché alcune plasticità potrebbero essere causate da processi di sdifferenziamento e ridifferenziamento, gli studi mirati alla comprensione dei meccanismi genetici che sono alla base di questi processi potrebbero dare risultati importanti, anche nel campo dello studio del cancro.

L'analisi comparativa del profilo di espressione genica e proteica, delle richieste di fattori di crescita ed altri segnali cellulari delle cellule staminali commissionate ad un tessuto (come le HSC o le NSC), delle cellule staminali più primitive (come le MSC) e delle cellule pluripotenti (le cellule ES) hanno già apportato informazioni importantissime rispetto ai fattori per la pluripotenza ed il

commissionamento.

3.2 Trattamento di malattie genetiche o degenerative

Le HSC sono usate già da molte decadi per il trattamento di disordini ematologici o per curare quei pazienti con tumori maligni che subiscono chemioterapie o radioterapie intensive. E' immaginabile che con il progresso ottenuto nella caratterizzazione delle popolazioni di cellule staminali per altri tessuti -come le cellule staminali dei cheratinociti e le cellule staminali della cornea- la terapia con cellule staminali potrebbe diventare fondamentale per il trattamento di difetti ereditari o acquisiti in tali tessuti.

Con l'individuazione di varie tipologie di staminali tessuto-specifiche, o di staminali adulte dotate di vasto potenziale differenziativo, si potrebbe giungere ad approcci terapeutici per disordini genetici o degenerativi di molti più organi. Oltre alle indagini sulle identità e sulle potenzialità differenziative delle cellule staminali, saranno necessari vasti studi per determinare come tali cellule potrebbero essere usate nella pratica clinica, e se esistano problematiche legate alla biologia o alla manipolazione delle cellule staminali trapiantate (ad esempio tumorigenicità, stabilità del differenziamento).

Si dovrà investigare inoltre se i segnali *in vivo* possono essere sufficienti per indurre differenziamenti organo- e tessuto-specifici a livelli sufficienti per riparare l'organo bersaglio, o se sia necessario predifferenziamento *in vitro*.

Sappiamo molto poco riguardo all' "homing" delle cellule staminali adulte verso microambienti non ematopoietici, sarà dunque necessario determinare se le cellule indifferenziate debbano essere infuse per endovena oppure localmente per ottenere livelli di attecchimento sufficienti per sostituire un tessuto non-emopoietico danneggiato. Inoltre, siccome potrebbe essere possibile che le richieste locali non siano sufficientemente forti da mediare efficientemente uno

“switch” di *lineage*, sarà necessario testare se le cellule staminali debbano essere predifferenziate *in vitro* prima dell’infusione in forma di cellule progenitrici commissionate oppure completamente mature.

Altre questioni riguarderanno il tipo di trapianto. Le cellule staminali adulte potrebbero essere infatti utilizzate in contesti autologhi o allogenici.

Per malattie acute, quali ad esempio l'infarto o l'ictus, o per malattie con basi immunologiche come il diabete o le malattie infiammatorie croniche intestinali, il trapianto allogenico potrebbe essere necessario.

Già oggi disponiamo di alcuni dati derivanti da trials clinici per l’utilizzo di MSC sull’uomo: tali cellule si sono già dimostrate utili nella cura dell’osteogenesi imperfetta e, cotrapiantate con le HSC, nel trattamento della graft-versus-host disease (GvHD).

3.3 Terapia cellulare

Negli ultimi anni è diventato chiaro che le MSCs posseggono spiccate proprietà immunoregolatorie. Le cellule staminali mesenchimali sono capaci di sopprimere reazioni immuni sia *in vitro* che *in vivo* in modo indipendente dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). E’ stato dimostrato un effetto immunosoppressivo delle MSCs attraverso un meccanismo che coinvolge l’inibizione paracrina della proliferazione delle cellule T e B. La capacità immunosoppressiva delle MSCs risulta presente in diverse specie animali, anche se con meccanismi solo parzialmente chiariti.

Inoltre, è stato dimostrato *in vivo* che le MSCs riducono nell’uomo l’incidenza di GvHD quando co-trapiantate assieme alle cellule staminali emopoietiche; determinano la remissione completa delle manifestazioni cliniche della GvHD di grado IV refrattaria alla terapia immunosoppressiva, pur essendo aploidistiche

quando infuse in pazienti pediatrici sottoposti a trapianto di midollo per leucemia. La presenza di un'immunoregolazione così multiforme e complessa ha consentito di dimostrare che l'effetto inibitorio delle MSCs interessa praticamente tutte le popolazioni cellulari coinvolte nella risposta immunitaria, dai linfociti T, ai linfociti B, alle cellule NK ed alle cellule dendritiche di origine monocitaria. L'effetto immunoregolatorio è espresso non solo dalle MSCs, ma anche dalle cellule di derivazione mesenchimale più differenziate quali adipociti ed osteoblasti.

Ad oggi l'esatto meccanismo responsabile dell'effetto immunoregolatorio delle MSCs rimane ancora sconosciuto.

3.4 Rigenerazione ossea e cartilaginea

Studi in vitro hanno dimostrato la capacità differenziativa in senso osseo delle MSCs, quindi sono stati fatti diversi tentativi di espandere le MSCs al fine di riparare in vivo alcuni difetti tissutali. MSCs di origine midollare sono state seminate su matrici extracellulari, come idrossiapatite, ed impiantate in vivo in topi immunodeficienti, ottenendo la formazione di tessuto osseo.

Il passo successivo è stato nell'uomo: infuse in bambini con osteogenesi imperfecta, queste cellule non solo hanno attecchito senza dare effetti indesiderati, ma hanno anche determinato a tre mesi di distanza un aumento della componente osteoblastica, la formazione di nuovo osso lamellare ed un miglioramento complessivo del contenuto minerale totale. Tutto ciò si è accompagnato ad una riduzione della frequenza delle fratture patologiche e ad un accrescimento corporeo misurabile.

Altri studi nell'animale hanno dimostrato che l'iniezione in situ o l'impianto diretto rappresentano la via più efficace di somministrazione delle MSCs per indurre rigenerazione e riparazione locale di tessuti ossei, cartilaginei o tendinei

A partire dal 1994 sono state messe a punto delle strategie di ingegneria tissutale basate sull'utilizzo di MSCs per indurre la differenziazione locale in cartilagine di precursori mesenchimali.

Da vari studi è stata dimostrata l'applicabilità, l'innocuità e la potenziale efficacia locale delle MSCs per la riparazione cartilaginea.

3.5 Rigenerazione muscolare cardiaca e muscolo scheletrica

È stata studiata anche la possibilità d'indurre la differenziazione delle MSCs in tessuti connettivi diversi dall'osso e dalla cartilagine, come tendini e legamenti, nell'ottica della terapia cellulare rigenerativa. Sono stati condotti diversi studi nell'animale e *trials* clinici nell'uomo per valutare l'efficienza in termini di riparazione tendinea dell'inoculo locale di MSCs.

Le MSCs, inoltre, possono differenziare in cellule muscolari striate scheletriche, striate cardiache e lisce. La maggior parte degli studi si sono focalizzati sul potenziale di differenziazione cardiomiocellulare delle MSCs per le potenzialità applicative rigenerative dopo infarto miocardico. A seguito dell'osservazione che MSCs umane impiantate nel miocardio di topo potevano differenziare in cardiomiociti ed indurre angiogenesi, alcuni gruppi hanno utilizzato MSCs autologhe per trattare infarti miocardici in modelli animali, dimostrando attecchimento, differenziazione e miglioramento della funzione cardiaca, suggerendo così che questo approccio potesse essere utile per rigenerare cardiomiociti e ridurre le complicanze dell'infarto nell'uomo.

3.6 Rigenerazione dei tessuti nervosi

Numerosi studi hanno dimostrato la potenziale utilità della somministrazione di MSCs in malattie del sistema nervoso. E' stato osservato come l'impianto diretto delle MSCs nel muscolo striato di ratti anziani con deficit motori e cognitivi porti ad un miglioramento dell'attività motoria, mentre in modelli animali di morbo di Parkinson, di danno neurale ipoischemico e danno retinico è stato dimostrato un recupero funzionale dopo trapianto in vivo di cellule staminali nella sede della lesione.

Inoltre, la possibilità di modificare geneticamente le MSCs prima dell'inoculazione apre nuove prospettive per il loro uso come vettori cellulari di terapia genica in caso di deficit neurologici, danni da ischemia e gliomi cerebrali. Attraverso procedure di terapia genica, le MSCs possono essere utilizzate come veicoli per l'espressione di geni codificanti per proteine deficitarie nell'individuo per cause genetiche o acquisite, o per molecole con attività terapeutica.

CAPITOLO 4: POTENZIALITÀ DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NEL CAVO ORALE

4.1 Introduzione

L'attuale panorama scientifico sta aprendo nuove frontiere alla ricerca, fornendo informazioni per comprendere il potenziale ruolo delle informazioni genetiche nella diagnosi e nello sviluppo delle malattie. In quest'ottica prende sempre più piede un nuovo paradigma scientifico nella medicina e in odontostomatologia: *soluzioni biologiche a problemi biologici*. E' pertanto fondamentale l'interdisciplinarietà tra medicina, odontoiatria, genetica umana, biologia molecolare e dello sviluppo, biotecnologie e bioingegneria. All'apice della interdisciplinarietà si ritrova l'opportunità offerta dall'ingegneria tissutale di rigenerare numerosi tessuti tra cui quello parodontale e dentale. Il ripristino delle funzioni lese mediante sostituzione di tessuti od organi danneggiati rappresenta il principale obiettivo di ricerca della medicina contemporanea.

L'utilizzo di tecniche di trapianto o sostituzione con materiali sintetici risulta fortemente condizionato da molti fattori come la risposta del soggetto ricevente, la scarsa disponibilità di tessuto od organi utilizzabili.

L'ingegneria tissutale è un'area di ricerca multidisciplinare che ha come primario obiettivo il ripristino della funzionalità degli organi (mediante trapianto di cellule coltivate in vitro o la stimolazione cellulare in matrici sintetiche) e la rigenerazione dei tessuti lesi.

I principi base prevedono la combinazione di cellule vitali con una matrice

naturale o sintetica, al fine di creare tessuti vitali che possano essere identici, immunologicamente, funzionalmente e strutturalmente, al tessuto d'origine.

Scopo ultimo dell'ingegneria, è pertanto la *restitutio ad integrum* del tessuto o organo leso, in modo stabile e duraturo nel tempo, utilizzando materiali di elevata qualità e avendo affidabili fonti di cellule (cellule mature già differenziate, cellule staminali adulte e mesenchimali embrionali).

Si sta consolidando l'idea che le cellule mature, nonostante la buona disponibilità e l'assenza di reazioni immunitarie avverse, non rappresentino la fonte ideale per l'ingegneria tissutale, in quanto l'alto grado di differenziazione implica una minor capacità proliferativa e di conseguenza restringe lo spettro dei possibili campi di utilizzo al fenotipo cellulare specifico del tessuto da cui vengono prelevate.

Dal momento che le implicazioni etiche limitano la ricerca sulle cellule staminali pluripotenti, le cellule staminali mesenchimali adulte sono diventate notevolmente produttive.

Studi recenti indicano che le cellule staminali derivate dalla polpa dentale e dal legamento parodontale sono, insieme alle cellule staminali del midollo osseo, le risorse più promettenti per l'ingegneria dei tessuti craniofacciali. L'attuazione di questo progetto richiede l'integrazione delle cellule staminali, degli scaffolds e dei segnali morfogenetici induttivi.

4.2 Ingegneria tissutale

L'osteogenesi e la dentinogenesi da parte di cellule staminali in coltura, non procede nell'organismo donatore senza un veicolo che le sostenga come un "impalcatura" (scaffold), nel corso della vascolarizzazione di queste cellule, sostenendole, in seguito, durante le fasi di differenziazione [Bianco e Robey, 2001]. E' pertanto necessaria una struttura organizzata tridimensionale alla quale le cellule staminali possano aderire e proliferare inizialmente *in vitro* e che le

sostenga *in vivo* a lungo, al fine di assicurare la differenziazione e quindi l'osteogenesi.

Sebbene markers specifici per le cellule staminali da polpa dentale non siano ancora stati ben caratterizzati, le cellule pulpari in coltura esprimono l'mRNA di BMP 2,4,6 e 7 (proteine morfogenetiche ossee) e dei loro recettori in modo fase dipendente. In risposta al trattamento con BMP2 umana ricombinante, cellule mesenchimali polpa derivate si differenziano in odontoblasti capaci di formare dentina. Quando associata alla frazione solubile in EDTA della dentina, la BMP2 umana ricombinante è anche in grado di stimolare la differenziazione odontoblastica della papilla dentale separata da quella dell'organo dello smalto.

Inoltre la sialoproteina della dentina (DSP), una proteina dentinale altamente specifica, risulta largamente espressa durante la dentinogenesi in trapianti di DPSC. Le cellule staminali da denti decidui umani esfoliati, se comparate con BMSSCs e DPSCs, hanno rivelato una percentuale di proliferazione maggiore e un elevato numero di duplicazioni.

Ricerche internazionali svolte su topi, hanno dimostrato che SHEDs possiedono l'abilità di differenziarsi in cellule odontoblasto-simili funzionali in vitro. Una volta trapiantate in topi, le SHEDs, si sono differenziate in osso e dentina, anche se non sono state in grado di rigenerare un completo complesso polpa-dentina in vivo come le DPSCs. Inoltre non sono in grado di differenziarsi direttamente in osteoblasti ma inducono la neoformazione ossea formando una guida osteoinduttiva che recluta le cellule osteogeniche dell'ospite.

I fattori chiave coinvolti nella rigenerazione dei tessuti e degli organi sono tre:

- una fonte affidabile di cellule (cellule staminali)
- molecole in grado di indurre la differenziazione delle cellule (proteine , fattori di crescita)
- matrici in cui far crescere le cellule (scaffold)

Gli scaffold devono permettere alle cellule di migrare al loro interno, di fissarsi alla struttura proliferando e differenziarsi. Inoltre devono offrire un ambiente che

permetta alle cellule di mantenere il loro fenotipo e di sintetizzare le proteine e le molecole necessarie al loro sviluppo. Tali strutture devono presentare un'estesa superficie di impianto, una resistenza meccanica, una forma tridimensionale adeguata ed un'eventuale completa biodegradabilità. Infine lo scaffold deve avere un corretto grado di porosità del materiale, per permettere la migrazione cellulare e l'angiogenesi, fornendo un'ampia superficie per le interazioni intercellulari.

Esistono due categorie di scaffold:

1- *Materiali naturali*: collagene, glicosaminoglicani, arginati, ecc..

Hanno il vantaggio di essere scarsamente tossici e di avere una ridotta risposta infiammatoria cronica. Sono, però, scarsamente resistenti all'azione meccanica, sono strutturalmente complessi, aspetto che rende difficile il loro utilizzo e che può richiedere una manipolazione chimica.

2- *Materiali di sintesi*: polimeri, materiali ceramici, biovetri, ecc..

I polimeri vengono utilizzati per innesti vascolari e nella rigenerazione parodontale; i materiali ceramici trovano applicazione nella chirurgia ossea, mentre i campi di utilizzo dei biovetri, sono nell'ambito della rigenerazione ossea, in quanto presentano elevate capacità di legarsi in modo specifico a questo tessuto.

Sfortunatamente al momento non è disponibile nessuno scaffold che soddisfi tutti i requisiti per la rigenerazione di osso e dentina. In particolare, gli scaffold dovrebbero essere ottimizzati per una migliore integrazione con il tessuto ospite nel periodo postoperatorio e per una completa sostituzione con tessuto in formazione a lungo termine.

4.3 Rigenerazione a livello craniofacciale e del disco articolare

Fino ad un decennio di anni fa, l'unico valido rimedio, da un punto di vista riabilitativo, per i difetti ossei è stato rappresentato dall'applicazione di innesti e matrici osteoconduttive.

L'introduzione delle cellule staminali nella ricostruzione dei tessuti ha profondamente modificato, in senso migliorativo, il potenziale riabilitativo di tali lesioni.

In tale senso, è noto che il distretto cranio-facciale è interessato da numerose patologie che comportano notevoli alterazioni delle strutture ossee e cartilaginee, spesso in maniera secondaria rispetto a patologie di natura genetica. Tra queste la Sindrome di Apert, di Crouzon e patologie congenite legate ad alterazioni di sviluppo delle strutture derivate dal I e II arco branchiale, hanno un forte impatto sulla qualità di vita dei pazienti, frequentemente comportano schisi labiali e/o palatali, e iposviluppo mandibolare.

Altri difetti del tessuto osseo si possono riscontrare in caso di asportazioni in seguito a patologie tumorali o severi traumi facciali.

Alcuni studi su modelli animali hanno permesso di dimostrare l'effettivo potenziale rigenerativo delle cellule staminali. A livello del distretto cranio-facciale sono stati rigenerati difetti ossei di calvaria e mandibola utilizzando cellule staminali di midollo osseo combinate con idrossiapatite/fosfato tricalcico.

Clinicamente la procedura prevede l'isolamento dal midollo osseo o dal tessuto dentale di cellule staminali (MSC), messe in coltura in scaffold con fattori morfogenetici in grado di guidare la differenziazione nella linea cellulare di interesse. Il tessuto ibrido ottenuto viene quindi inserito a livello del difetto osseo stimolando una potente risposta osteogenetica. Gli attuali traguardi raggiunti in

ingegneria tissutale, contribuiscono a delineare un futuro in cui sarà possibile applicare tali tecniche anche ad organi altamente mineralizzati come i denti, risultato di un complesso sistema di reciproco controllo tra epitelio e mesenchima dentale. Studi preliminari hanno infatti confermato l'assenza di reazioni immunologiche o infiammatorie in caso di trapianto di cellule del legamento parodontale e del tessuto osseo nelle aree danneggiate.

Ultimamente la medicina rigenerativa ha riportato notevoli progressi anche nel campo dell'ingegneria tissutale dell'ATM. Alhadlaq e Mao hanno descritto l'ingegneria tissutale di un condilo mandibolare a partire da MSCs adulte isolate dal midollo osseo di tibia e femore. Le cellule, in seguito all'azione dei fattori di differenziazione condrogenica e osteogenica, sono state inserite in uno scaffold di idrogel PEGDA (polietilenglicolediacetato) che riproduceva un condilo mandibolare umano. In seguito all'impianto in vivo (4 settimane), si è ottenuta una struttura che riportava fedelmente la forma e le dimensioni di un condilo umano. Ricerche successive erano volte a valutare l'integrazione funzionale in vivo della struttura neoformata.

L'ingegneria tissutale del disco articolare, pur avendo potenzialità terapeutiche ancora maggiori (il disco non presenta alcuna capacità autorigenerativa) sembra essere ancora ad uno stadio precoce. La struttura del disco articolare, fibrocartilaginea, presenta notevoli differenze rispetto alla cartilagine ialina, nella composizione, nella struttura e nella componente cellulare.

4.4 Rigenerazione del complesso dento-pulpare

Nonostante la morfologia della matrice dentinale differisca molto dalla matrice ossea, la composizione biochimica delle stesse è, al contrario, molto simile. Anche la dentina contiene proteine morfogenetiche (BMPs) e la matrice dentinale

demineralizzata può stimolare la formazione di tessuto osseo.

Sia il tessuto osseo che la matrice dentinale possono, inoltre, stimolare la formazione di dentina, qualora vengano impiantate nella polpa dentale.

In uno studio di Gronthos (2000) sono state isolate dalla polpa dentale adulta delle cellule con altissima capacità proliferativa e immuno-fenotipo simile alle MSC di origine midollare. Messe in coltura, queste cellule presentavano una importante attività fosfatasi-alcalina e tendenza a formare noduli densi calcificati. Trapiantate in seguito in vivo, hanno dimostrato capacità di formare strutture simili alla dentina, ma non di differenziarsi in altri fenotipi.

L'assenza di marker specifici per l'identificazione dei cementociti impedisce una precisa identificazione delle cellule progenitrici del cemento radicolare: non si è giunti ancora alla certezza che siano cellule tipo osteoblastiche che sintetizzano questo tessuto in risposta a stimoli ambientali, oppure si un fenotipo cellulare specifico deputato a tale scopo.

Nel 2004 Seo, isolò cellule staminali totipotenti dal legamento parodontale umano. E' stata verificata in vitro la capacità di queste cellule di differenziarsi in cellule della linea cementoblastica, adipociti e cellule in grado di produrre collagene.

Le ricerche eseguite successivamente portarono alla conclusione che la ricreazione dello smalto dentale era più complesso rispetto ad altri tessuti come osso e dentina, in quanto l'organo dello smalto, una volta creato l'elemento dentale, si dissolve completamente, impedendone la ricreazione in caso di danneggiamento. Gli studiosi ipotizzarono che alcune cellule dei tessuti orali in presenza di stimoli specifici possano iniziare a sintetizzare lo smalto.

Proprio a questo scopo venne eseguito lo studio di De Mooerlooze (2000), che portò il ricercatore a suggerire la possibilità che il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFs) mantenga e determini il differenziamento di queste linee cellulari.

4.6 Rigenerazione parodontale

Le recenti scoperte scientifiche in campo di bioingegneria cellulare a livello odontoiatrico, e dei principali fattori di crescita coinvolti (Platelet-derived Growth Factor, Insulin-like Grow Factor, Transforming Grow Factor-1, Basic Fibroblast Grow Factor e le BMPs), hanno suggerito l'utilizzo di tali procedure per la rigenerazione parodontale.

Una valida alternativa all'utilizzo dei singoli fattori di crescita è la combinazione di innesti allo plastici e gel piastrinico, che però crea problematiche a livello dell'attività non specifica dei singoli fattori sulle diverse linee cellulari e delle limitazioni legate al rapido smaltimento di tali fattori applicati per via topica.

L'applicazione della terapia genica in vivo per stimolare la rigenerazione parodontale è stata studiata su modelli animali, confermando la rigenerazione di osso alveolare e cemento in severi difetti parodontali in seguito a trasferimento diretto del gene del Platelet-derived Growth Factor.

E' stato osservato che anche l'uso delle BMPs risulta richiedere alti dosaggi e presenta delle limitazioni d'impiego, legate all'azione non specifica sulle diverse linee cellulari ed al rapido smaltimento in caso di applicazione topica.

Nuove frontiere nella ricerca sono state aperte con la sperimentazione dell'utilizzo delle MSC nella rigenerazione parodontale (Kawaguchi, 2004), studio nel quale vengono isolate alcune MSC dal midollo osseo del modello animale, espanse in vitro e ricombinate con collagene tipo al 2%. Tale medicazione è stata reinserita in difetti di classe III. In seguito è stata eseguita una valutazione di tipo istologico e morfometrica ad un mese dal trapianto, in cui si è osservato l'inizio di una rigenerazione dei difetti con cemento, legamento parodontale e tessuto osseo.

SCOPO DELLA RICERCA

Una fonte particolarmente interessante di cellule staminali mesenchimali è rappresentata dalle cellule staminali isolabili dalla polpa dentaria di denti decidui. La polpa dentaria, proprio per il suo alto contenuto di cellule staminali multipotenti, è un tessuto che presenta numerose prospettive sia per la comprensione dei meccanismi di sviluppo degli elementi dentari e delle strutture associate allo splancocranio, sia per le potenziali applicazioni cliniche delle cellule staminali. In quest'ottica si è valutata la possibilità di realizzare un bancaggio degli elementi dentari, criopreservando la polpa dentaria in previsione dell'impiego delle cellule staminali in essa contenute, per la riparazione dei danni tissutali.

Un'interessante prospettiva di utilizzo è relativa alla popolazione italiana in generale. Secondo i dati ISTAT 2008 la popolazione italiana ha raggiunto il numero di 60.000.000 di persone con un tasso di nascite superiore di 12.000 unità in più rispetto al 2007. I dati riportati nel gennaio 2008 indicano la presenza di una popolazione infantile tra i 5-9 anni in Italia di 1.427.907 e tra i 10-14 anni di 1.430.329, in particolare in Lombardia nella prima fascia di età si osservano 229.892 bambini e tra i 10-14 anni 216.731.

Secondo i dati riportati dall'OMS, il 25% dei bambini in queste fasce di età è affetto da patologie sistemiche e il 35% della popolazione infantile da sindromi genetiche e disordini mentali e sensoriali generici.

La possibilità di preservare la polpa dentale di denti decidui non ancora esfoliati (popolazione tra i 5 e i 14 anni) e con intatta la struttura radicolare e di

conseguenza la polpa, è motivo di grande interesse scientifico, per lo studio e la criopreservazione di cellule staminali contenute in essa. Le sperimentazioni a tutt'oggi eseguite prevedono l'uso di strumentario in grado di rimuovere lo smalto

e la dentina che sovrastano i canali radicolari, ma non preservando l'area e lo strato superficiale della polpa.

Le attuali tecniche di preparazione della corona dentale, possono danneggiare le pareti della camera pulpare e dei canali radicolari, in cui è contenuta la polpa dentale da preservare.

Al fine di evitare danneggiamenti della camera pulpare o della polpa stessa, si è ricercata una metodologia di perforazione della corona dentale che permettesse di preservare l'integrità della polpa dentale, per i futuri scopi di bancaggio.

A tale proposito la ricerca si è rivolta allo studio delle tipologie di laser ad uso medicale, e alle caratteristiche correlate, valutandone le proprietà e indicandone una tipologia che fosse ideale allo scopo della ricerca.

La caratteristica fondamentale che permette l'utilizzo dei laser in medicina è l'interazione tra l'onda elettromagnetica e i tessuti che dipende dalle caratteristiche ottiche dei tessuti stessi. Ogni elemento che li costituisce è dotato della capacità di assorbire una determinata lunghezza d'onda. Ne segue quindi che l'efficienza dei laser si basa sul picco di assorbimento dei materiali contenuti nei tessuti bersaglio di specifiche lunghezze d'onda, che permettono di minimizzare il rischio potenziale di danno ai tessuti circostanti, maggiormente provocato dall'attrezzatura odontoiatrica standard utilizzata.

L'utilizzo del laser quindi, permette di non surriscaldare eccessivamente il tessuto dentale, danneggiando il tessuto pulpare, e di non asportare porzioni di polpa dentale adesa ai canali radicolari.

Alla luce di questi dati si è valutata la possibilità di realizzare un bancaggio degli elementi dentari prelevati, criopreservandone la polpa dentaria, in previsione di un futuro impiego delle cellule staminali in essa contenute. per la riparazione dei danni tissutali.

Scopo primario della ricerca è stato quello di creare un canale di piccolo

diametro, paragonabile ad un ago da siringa (29-30 G), attraverso cui accedere alla polpa dentale in modo da poter facilitare il passaggio del crioprotettore (composti a base di DMSO, trealosio o glicerolo) necessario per la criopreservazione evitando la frattura del dente e di intaccare l'integrità della polpa stessa.

In seguito alla preparazione tramite laser, entro 48 ore dall'avulsione, il dente, deve pervenire alla Biobanca Italiana (Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Dipartimento di Medicina Rigenerativa Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Padiglione Marangoni) dove viene numericamente classificato e inserito all'interno della BioBank per la crioconservazione del tessuto pulpare (inserito in congelatore meccanico a -80°C).

Dopo almeno 10 giorni, il dente viene scongelato e viene estratta la polpa dentaria. Gli scopi secondari saranno il prelevamento, l'isolamento e la differenziazione di cellule staminali contenute nel tessuto pulpare degli elementi dentali conservati.

CAPITOLO 5: IL LASER

5.1 Introduzione

L'idea di utilizzare la luce a scopo terapeutico precede l'invenzione del laser. Nel 1946 un oculista tedesco sfruttò la luce solare per saldare una retina distaccata e per distruggere tumori oculari in alcuni suoi pazienti. Un anno dopo la costruzione del primo laser, avvenuta nel 1960 da parte di Theodore H. Maiman, fu utilizzato un laser per provocare lesioni oculari negli animali; due anni dopo iniziarono ad essere trattate patologie retiniche sull'uomo. Il laser fu rapidamente accettato come strumento chirurgico standard in oftalmologia. Le applicazioni mediche del laser si estesero rapidamente ad altre aree della chirurgia, anche grazie all'introduzione di nuovi dispositivi: laser a rubino pulsato, laser ad argo, CO₂ e Nd:YAG ad emissione continua, dye laser. L'abilità dei laser CO₂ e Nd:YAG ad emissione continua di tagliare i tessuti producendo coagulazione ne definì il principale impiego come laser chirurgici di uso generale.

A partire dai primi anni '80 la ricerca scientifica mostrò un crescente interesse riguardo i meccanismi di interazione laser-tessuto: oltre ai ben noti effetti termici furono scoperti e studiati altri fenomeni provocati dalla luce laser quali reazioni chimiche, fotodissociazione e generazione di onde d'urto, permettendo di definire nuove ed importanti applicazioni cliniche del laser.

Oggi i laser permettono di effettuare precisi interventi di microchirurgia anche in

regioni difficilmente accessibili, grazie all'utilizzo, ad esempio, di fibre ottiche per il trasporto del fascio. Oltre alle lesioni superficiali possono dunque essere trattate anche lesioni accessibili con tecniche di laparoscopia ed endoscopia (ad es: chirurgia toracica, oftalmologia, ginecologia, urologia, neurochirurgia). La precisione assoluta, la quasi totale assenza di sanguinamento, la riduzione del dolore e delle complicanze post-operatorie hanno soppiantato le tecniche precedenti in molti settori specialistici.

Le basi teoriche dei LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) risalgono ai primi anni del novecento, ma soltanto nel 1960 fu sviluppato il primo prototipo di laser che utilizzava come mezzo attivo un cristallo di rubino.

5.2 Struttura di un laser

I laser sono costituiti da tre elementi base:

- *una sorgente di energia*, quale un arco elettrico, un forte campo elettromagnetico, o un'altra sorgente laser, il cui scopo è quello di fornire energia al fine di garantire il pompaggio richiesto per generare l'inversione di popolazione.
- *un mezzo attivo*, che fornisce gli elettroni che devono essere investiti dall'energia della sorgente per generare la radiazione laser. Il mezzo attivo può essere allo stato gassoso (argo, anidride carbonica, HeNe, eccimeri, vapore di rame krypton, ecc.), liquido (tunable Dye), solido(alessandrine, rubino, Nd:YAG, Er:YAG, Ga:As) o costituito da elettroni liberi.
- *una cavità ottica*: si tratta di un contenitore che presenta alle sue estremità due specchi tra i quali rimbalzano i fotoni che investono gli elettroni, con passaggio

degli elettroni eccitati allo stato stabile e conseguente produzione di energia.

Uno degli specchi è parzialmente riflettente e permette alla luce all'interno della cavità di essere trasmessa all'esterno.

5.3 Proprietà della luce laser

La luce laser presenta tre importanti caratteristiche che la contraddistinguono dalle sorgenti di luce convenzionali:

-
1. *monocromaticità*: tutta l'energia della luce è concentrata in una banda minima centrata su una particolare lunghezza d'onda. La lunghezza d'onda è determinata dal mezzo attivo che genera la radiazione laser.
 2. *coerenza*: le onde della luce laser sono tutte in fase tra loro.
 3. *collimazione*: le onde elettromagnetiche della luce laser sono parallele tra loro.
-

Questo permette alla luce di propagarsi per lunghe distanze con una minima divergenza del raggio permettendo così; anche grazie alla proprietà di coerenza, di concentrare elevate quantità di energia luminosa in piccole aree.

5.4 Propagazione della luce nei tessuti

Per parlare dell'utilizzo dei laser in campo medico è necessario considerare l'interazione radiazione-materia, dove per materia si intende, in questo caso, i tessuti organici umani. Gli studi dell'interazione laser-tessuto si basano sulla conoscenza del mezzo di propagazione della luce e quindi sull'assorbimento e la

trasmissione della radiazione. La tipologia dell'interazione cambia notevolmente al variare dei parametri del dispositivo laser e a seconda di come l'energia della radiazione sia convertita a livello biomolecolare.

Quando la luce colpisce la superficie di un tessuto biologico, circa il 3% di essa viene riflessa a causa del cambiamento improvviso dell'indice di rifrazione tra aria e tessuto. La parte rimanente si propaga all'interno del tessuto biologico subendo assorbimento e scattering. L'assorbimento dell'energia luminosa, con conseguente trasformazione della luce in calore, è indispensabile perché si verifichi una reazione tissutale. Se i fenomeni di scattering sono trascurabili rispetto alla capacità di assorbimento del tessuto, la luce laser, rimane fortemente collimata nel tessuto e lo spessore di penetrazione, definito come la profondità alla quale il fascio collimato risulta attenuato, è funzione del coefficiente di assorbimento, che a sua volta è dipendente dalla lunghezza d'onda.

Il coefficiente di assorbimento dipende dal tipo e dalla quantità di cromofori presenti nel tessuto. I *cromofori* sono molecole che conferiscono un certo colore ad una sostanza e che assorbono una specifica lunghezza d'onda; la loro composizione, che varia a seconda del tipo di tessuto, determina la risposta del tessuto alla radiazione laser ad una certa lunghezza d'onda. Il cromoforo presente in quantità maggiore nei tessuti biologici è l'acqua, che costituisce il 70% circa della massa corporea totale. L'acqua è praticamente trasparente alla luce visibile, mentre assorbe fortemente nell'infrarosso. Il rimanente 30% di massa tissutale è dovuto essenzialmente a composti organici: proteine, grasso, DNA. Tali molecole assorbono in parte nel visibile, dando però luogo a considerevoli fenomeni di scattering. Per la loro stimolazione si sfrutta quindi normalmente l'elevato assorbimento nell'ultravioletto dei legami molecolari organici. L'assorbimento a lunghezze d'onda nel visibile è principalmente dovuto a pigmenti specifici del tessuto, quindi emoglobina nei globuli rossi e rodopsina nella retina.

5.5 Il laser in medicina

La luce laser viene generata sotto forma di emissioni di diverso tipo, a seconda dell'ambito di utilizzo:- *emissione continua*: i laser ad emissione continua emettono un raggio con una potenza relativamente bassa, che non varia nel tempo. L'emissione di questi laser può essere interrotta manualmente dall'operatore o possono essere installati dei meccanismi di controllo elettronico che interrompono, a intermittenza, l'emissione del raggio laser per un determinato tempo (da 0,01 secondi a svariati secondi), producendo quindi un raggio, frequentemente detto *pulsato*, che non deve essere confuso con l'emissione dei laser pulsati.

- *emissione pseudo-continua*: consiste in un treno molto rapido di impulsi ultrabrevi, dell'ordine dei nanosecondi, con un'erogazione di potenza relativamente bassa e costante.

- *emissione pulsata*: il laser produce singoli impulsi, estremamente brevi e di potenza più elevata, ma non costante. I laser superpulsati ed ultrapulsati emettono una sequenza controllata di pulsazioni brevi e potenti. La potenza massima erogata è dieci volte superiore a quella prodotta dai laser ad emissione continua.

- *Q-switched*: gli impulsi sono ancora più brevi rispetto a quelli emessi dai laser superpulsati ed ultrapulsati e sono dotati di potenza maggiore. Questo è possibile grazie ad un accumulo di energia nella cavità del laser.

I parametri applicativi più importanti della luce laser sono la densità di potenza, la densità di energia, il tempo di esposizione, il profilo di intensità e la dimensione del fascio.

La *densità di potenza* esprime la potenza rilasciata per unità di area del tessuto

irradiato. Si misura in W/cm^2 e si determina dividendo la potenza di uscita del laser (W) per la dimensione dello spot (cm^2), assumendo per semplicità una densità uniforme.

Per determinare un effetto clinico è necessario che una certa quantità di energia venga assorbita dal tessuto. Questo valore viene misurato dalla *densità di energia* (o *fluenza*), che rappresenta l'energia rilasciata per unità di area del tessuto irradiato. La fluenza si misura in J/cm^2 e si calcola moltiplicando la densità di potenza per il tempo di esposizione. Attualmente, in alcuni laser Q-switched, la densità di energia può essere modificata dall'operatore così da variare l'effetto clinico. Infatti, l'aumento di tale parametro incrementa la quantità di energia rilasciata al tessuto, con conseguente maggiore effetto clinico.

Per quantificare l'emissione nel caso di laser pulsato, essendo la potenza non costante durante gli impulsi, si utilizza la potenza media o, più di frequente, l'energia contenuta in ciascun impulso.

Molto spesso il fascio laser assume un profilo di intensità gaussiano: questo comporta un'intensità di potenza non uniforme che assume un valore massimo al centro del fascio e decresce allontanandosi in direzione radiale. La regione interessata da vaporizzazione o coagulazione dipenderà da una *soglia di intensità* (W/cm^2), funzione della potenza applicata: all'aumentare della potenza, l'intensità nella coda del profilo gaussiano tenderà ad aumentare e la soglia di intensità si allontanerà dal centro del fascio.

5.6 Classificazione dei laser ad uso medicale

I laser disponibili per applicazioni mediche generano lunghezze d'onda che si estendono da 193 *nm*, in banda UV, ai 10300 *nm*, nel lontano infrarosso. In base alle loro caratteristiche fisiche possono essere suddivisi in diverse categorie:

Laser a CO₂: è uno dei laser chirurgici più utilizzati. Numerose applicazioni traggono beneficio dalla sua abilità di taglio e vaporizzazione, grazie al forte riassorbimento dell'acqua alla lunghezza d'onda prodotta da questo laser, 10600 *nm*. Possiede buone capacità di cauterizzazione, tuttavia presenta difficoltà nel trasporto in fibra ottica: per l'utilizzo endoscopico devono pertanto essere impiegate particolari guide d'onda. Le principali applicazioni riguardano la chirurgia generale, la coagulazione superficiale, la terapia termica di alcuni tumori, la ginecologia, l'urologia, la neurochirurgia e la chirurgia vascolare.

Laser Nd:YAG (Neodymium doped Yttrium Aluminium Garnet): si tratta di uno dei laser più versatili per la gamma di frequenze generabili e per l'utilizzo endoscopico, grazie al facile trasporto in fibra ottica. Le frequenze di emissione sono 1064 *nm*, 532 *nm*, 266 *nm*, 1320 *nm*. E' fortemente assorbito da acqua, emoglobina e cornea. Le principali applicazioni riguardano la coagulazione in profondità, la distruzione termica di masse tumorali, la chirurgia vascolare, la chirurgia generale, l'oftalmologia e l'odontoiatria. Questo laser è in grado di vaporizzare carie, detergere e sterilizzare cavità e fessure ed è anche capace di incidere dentina e cemento. Provoca un incremento di temperatura della polpa dentale che rimane comunque inferiore rispetto a quello provocato dall'uso di micromotori o altri strumenti manuali. In questo modo ogni superficie esposta è sterilizzata e la polpa viene intaccata per uno spessore di qualche μm .

Laser ad Argo: possiede una frequenza di emissione di 488 *nm* e 514,5 *nm*. Viene assorbito fortemente dall'emoglobina ed i principali utilizzi sono la

fotocoagulazione, in particolare per trattare alcune patologie retiniche in oftalmologia. Viene inoltre utilizzato come sistema di pompaggio per la sorgente laser nella terapia fotodinamica.

Laser ER:YAG (Erbium doped YAG): presenta una frequenza di emissione di 2940 *nm*, a cui corrisponde il massimo assorbimento dell'acqua. Permette di ottenere precise fotoablazioni tissutali e può essere facilmente trasportato in fibra. Ha trovato ampio utilizzo in ortopedia ed odontoiatria, grazie all'abilità di incidere tessuti duri, e sta rapidamente sostituendo il laser CO₂ in molte applicazioni dermatologiche. Lo svantaggio maggiore è la scarsa capacità di coagulazione.

Laser Ho:YAG (Holmium doped YAG): è un laser ad emissione nell'IR, ad una frequenza di 2060 *nm*. Presenta caratteristiche simili ai laser CO₂, ma ha il vantaggio di essere facilmente trasportabile in fibra e di poter essere utilizzato in mezzi liquidi. E' in grado di incidere con precisione i tessuti e garantisce un'adeguata coagulazione. Viene efficacemente utilizzato in chirurgia ortopedica, per la frammentazione di calcoli e per altre patologie delle vie urinarie.

Laser ad eccimeri: si tratta di diversi tipi di laser con frequenza di emissione nello spettro UV. Vengono fortemente assorbiti da stroma corneale e polimeri organici producendo un effetto fotoablativo. Le principali applicazioni riguardano la chirurgia refrattiva per la correzione di difetti visivi e la chirurgia cardiovascolare.

Laser a coloranti (Dye laser): sono laser fortemente accordabili, presentano una frequenza di emissione variabile tra 570 *nm* e 650 *nm*, vengono assorbiti da vari tessuti a seconda della frequenza utilizzata; grazie alla caratteristica di accordabilità permettono di scegliere selettivamente il tessuto da trattare. Vengono

utilizzati in diverse aree dermatologia e in terapia fotodinamica.

Diodi Laser: sono stati introdotti abbastanza recentemente e presentano numerosi vantaggi rispetto ai laser più tradizionali: sono compatti, efficienti e silenziosi. Emettono una radiazione nel vicino infrarosso. Attualmente vengono utilizzati in odontoiatria per l'incisione di tessuti molli, in terapia fotodinamica e in terapia laser a bassa potenza.

Laser ad elettroni liberi: sono dispositivi in cui il mezzo attivo non è costituito da un sistema atomico o molecolare in cui sia stata realizzata un'inversione di popolazione, ma da un fascio di elettroni che, accelerato ad una velocità di poco inferiore a quella della luce, si propaga attraverso un campo magnetico periodico generato da una serie di magneti a poli alternati (dispositivo chiamato *wiggler* o *ondulatore*). L'interazione tra gli elettroni e l'ondulatore provoca l'emissione di fotoni ad una specifica lunghezza d'onda. Tali fotoni vengono poi fatti rimbalzare tra due specchi come nei dispositivi laser convenzionali. Tuttavia, a differenza di questi ultimi in cui le frequenze di emissione sono limitate dalle transizioni energetiche ammesse nel materiale utilizzato, i laser ad elettroni liberi possono coprire l'intera porzione dello spettro che va dai raggi infrarossi ai raggi x, variando opportunamente la potenza del fascio elettronico o la spaziatura tra i magneti. Oltre all'importante proprietà di accordabilità, i laser ad elettroni liberi sono caratterizzati da un'elevata coerenza spaziale e temporale del fascio generato, da un'elevata potenza di uscita (fino ai *GW*) e dalla possibilità di essere facilmente trasportati in fibra. Il primo intervento chirurgico effettuato con questo laser è stata la rimozione di una porzione di tumore benigno dal cervello; in seguito è stato efficacemente impiegato in un delicato intervento di chirurgia oftalmica noto come fenestrazione della guaina del nervo ottico. Altre possibili

applicazioni sono attualmente oggetto di studio.

5.7 Applicazioni chirurgiche e terapeutiche

I pionieri della chirurgia laser sfruttavano la proprietà del fascio di produrre intenso calore. Lo studio delle diverse proprietà di assorbimento dei vari componenti tissutali e della profondità di penetrazione della luce nei tessuti ha permesso di confinare questi effetti termici in regioni ben precise utilizzando impulsi laser sufficientemente brevi da non sviluppare diffusione termica nei tessuti circostanti, secondo la teoria della fototermolisi selettiva. Questo concetto è utilizzato ad esempio in dermatologia per il trattamento di lesioni cutanee caratterizzate da vasi sanguigni anomali, quali nevi vinosi o flammei.

Nuovi effetti della radiazione laser furono in seguito studiati. Ben presto, infatti, ci si rese conto che i laser potevano essere utilizzati per produrre effetti sui tessuti diversi da quelli termici impiegati inizialmente. L'abilità dei laser pulsati di causare determinati effetti meccanici fu riconosciuta, studiata e utilizzata. Alcuni di questi effetti fotomeccanici si basavano sull'abilità dei laser pulsati di dare luogo a effetti non lineari; in particolare la possibilità di produrre un breakdown ottico nell'acqua fu utilizzata per generare cavitazioni a bolle (ossia cavità riempite di vapore all'interno di un liquido) in grado di provocare onde d'urto. Questi effetti meccanici trovarono impiego clinico in oftalmologia, con lo scopo di trattare una patologia della cataratta. L'uso del breakdown ottico rende possibile la deposizione di energia laser in elementi biologici che non presentano assorbimento. Gli effetti meccanici indotti dal laser trovano così un'ulteriore applicazione clinica, la frammentazione di calcoli urinari e biliari. Tale tecnica, che utilizza una fibra ottica per trasportare la luce, permette di frammentare calcoli localizzati in posizioni non accessibili mediante la tecnica tradizionale

degli impulsi acustici, a causa delle ossa pelviche che bloccano gli impulsi. Un altro utilizzo non termico del laser in medicina riguarda una terapia contro il cancro. Farmaci iniettati nei pazienti possono essere attivati selettivamente illuminando l'area di interesse e producendo una distruzione fotochimica dei tumori. Questo trattamento è noto come terapia fotodinamica.

5.8 Terapia laser a bassa potenza

Le prime pubblicazioni riguardanti la terapia laser a bassa potenza (all'epoca chiamata biostimolazione laser) apparvero più di 30 anni fa. Da allora, sono stati pubblicati circa 2000 studi su questo, ancora oggi controverso, argomento. Negli anni '60 e '70 alcuni medici dell'Europa orientale iniziarono ad applicare la biostimolazione laser, nonostante un gran numero di scienziati in varie parti del mondo mostrassero grande scetticismo riguardo la possibilità di agire su un organismo, con una radiazione laser a bassa intensità, direttamente a livello molecolare. I punti controversi della biostimolazione laser furono analizzati in pubblicazioni apparse alla fine degli anni '80. Oggi, la terapia laser a bassa potenza, anche chiamata terapia laser a bassa intensità (LLLT) o fotobiostimolazione, è utilizzata da fisioterapisti (per trattare una grande varietà di dolori muscolo-scheletrici acuti e cronici), odontoiatri (per trattare tessuti orali infiammati e per guarire diverse ulcerazioni), dermatologi (per trattare edema, ulcere indolenti, ustioni, dermatiti), reumatologi (per alleviare dolore e trattare infiammazioni croniche) e da altri specialisti. I laser (ma anche semplici LED) vengono applicati direttamente nelle aree da trattare oppure in vari punti del corpo.

Le applicazioni cliniche della terapia laser a bassa potenza sono diverse, e sono caratterizzate da una grande quantità di metodologie e dall'utilizzo di varie sorgenti di luce con diversi parametri (lunghezza d'onda, potenza d'uscita, emissione continua o pulsata).

I diodi GaAlAs vengono impiegati sia per i diodi laser sia per i LED. Negli ultimi anni si è preferito utilizzare lunghezze d'onda più elevate (800 – 900 *nm*) e maggiori potenze d'uscita (fino a 100 *mW*).

5.9 Laser in odontoiatria

L'utilizzo del laser in campo odontoiatrico sta assumendo, in questi ultimi tempi, una sempre maggiore importanza. Il laser maggiormente utilizzato nella chirurgia dei tessuti molli è l'Nd:YAG con lunghezza d'onda di 1064 *nm*; penetra profondamente nei tessuti e ha un'ottima capacità di incisione e coagulazione, ma non può essere utilizzato nelle carie come preparatore di cavità in quanto la sua azione è fortemente termica e determinerebbe surriscaldamento del dente e conseguente danno pulpare. Altri laser utilizzati nei tessuti molli sono il CO₂ e i laser a diodi con assorbimento da parte di pigmenti. I laser a diodi vengono spesso abbinati a fibre ottiche. Per quanto riguarda l'incisione dei tessuti duri, quali la dentina e lo smalto, si utilizzano laser Er:YAG (2940 *nm*) ed Er:YSGG (2790 *nm*): essi presentano uno scarso effetto termico e tendono ad essere quasi immediatamente assorbiti dai tessuti al di sotto del punto di applicazione; hanno, quindi, scarsa azione lesiva sui tessuti circostanti a quelli dove il raggio viene diretto. Presentano, tuttavia, scarsa capacità di coagulazione in caso di interessamento di grossi vasi. Infine, laser ad argo sono stati recentemente introdotti per lo sbiancamento dei denti.

L'utilizzo del laser in odontoiatria comporta numerosi vantaggi per il paziente. Il

tempo dell'intervento è spesso più breve, non vi è il fastidio (rumore, vibrazione) degli strumenti rotanti, non vi è il contatto fra il paziente ed apparecchiatura, molto spesso non è necessaria alcuna anestesia, il post-operatorio è quasi sempre indolore e senza edemi.

MATERIALI E METODI

1 Introduzione

Il protocollo sperimentale che è stato proposto in questa ricerca consisteva nella valutazione di una nuova metodica per criopreservare la polpa dentale, al fine di isolare cellule staminali, in particolare cellule staminali mesenchimali, dalla polpa stessa.

Le cellule staminali derivate dalla polpa dentale hanno un livello proliferativo ed una plasticità cellulare ragguardevoli e questo è un aspetto molto importante per le possibili applicazioni terapeutiche. Le cellule staminali della polpa dentale sono in grado di dare origine a diverse cellule di derivazione mesenchimale, per esempio osteoblasti, adipociti, condrociti, cellule del muscolo striato, ma anche cellule di derivazione non mesenchimale, per esempio melanociti.

Allo stesso tempo si stanno realizzando studi specifici atti a verificare la possibilità futura di utilizzare le cellule staminali della polpa dentale per uso autologo od allogenico.

Altro vantaggio della polpa dentale è di essere una fonte molto abbondante e potenzialmente inesauribile di cellule staminali, dato il numero elevato di denti potenzialmente utilizzabili per l'estrazione di questo tessuto.

Alla luce delle potenzialità delle cellule staminali di derivazione pulpale sopra descritte, ci si è posti il problema di come conservare e "bancare" tali cellule in vista di possibili futuri utilizzi terapeutici autologhi o allogenici.

Sono note nel settore metodiche di conservazione e bancaggio delle cellule staminali derivate dalla polpa dentale. Per esempio, in alcune bio-banche specializzate, allo scopo di crioconservare le cellule staminali della polpa dentale, si utilizza un protocollo che prevede una fase di rottura del dente per estrarre la polpa dentale, seguita da una fase di trattamento della polpa al fine di recuperare le cellule staminali in essa contenute. Le cellule staminali sono, quindi, stoccate in azoto liquido, previa amplificazione.

In alternativa alla metodica di crioconservazione delle cellule staminali estratte dal dente, sono note procedure in cui un dente intatto, estratto dalla sua sede, è sottoposto a crioconservazione e bancaggio. Lo scopo di crioconservare e bancare un dente intatto è di recuperare la polpa e le cellule staminali in essa contenute in una fase successiva, solo nel momento di reale necessità terapeutica. Il primo degli approcci sopradescritti consente di recuperare cellule staminali dalla polpa dentale, per esempio cellule mesenchimali staminali, con elevata efficienza in termini di resa e di vitalità cellulare. Tuttavia, tale metodo presenta lo svantaggio di essere molto dispendioso sia in relazione al tempo impiegato per recuperare le cellule ed amplificarle, sia da un punto di vista economico.

Al contrario, il metodo di crioconservazione del dente intatto presenta il vantaggio di essere più veloce e meno dispendioso.

Tuttavia, la crioconservazione di un dente intatto non garantisce la certezza di successo assoluto allo scongelamento dello stesso, sia per quanto riguarda le percentuali di recupero delle cellule staminali, sia in relazione alla qualità delle cellule recuperate.

Dalla quantità e dalla qualità delle cellule staminali recuperate dipenderà la portata delle applicazioni attuabili ed il loro esito. E' indispensabile che le cellule

staminali, recuperate in una fase successiva alla crioconservazione, abbiano ancora la capacità proliferativa e differenziativa che caratterizza le cellule staminali isolate dalla polpa di un dente fresco, non sottoposto a crioconservazione.

Le percentuali di recupero delle cellule staminali e la qualità delle cellule recuperate dopo scongelamento di un dente intero crioconservato non sono del tutto soddisfacenti. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che lo smalto del dente è un materiale poco poroso, molto duro e resistente a diverse sostanze chimiche, proprio in ragione della sua funzione biologica. Queste caratteristiche rappresentano, però, uno svantaggio per quanto riguarda l'efficienza di riuscita della crioconservazione in termini di percentuali di recupero delle cellule e di vitalità dopo scongelamento.

Il problema tecnico alla base della ricerca, è di mettere a disposizione un metodo di crioconservazione di polpa dentale (e delle cellule staminali in essa contenute), che sia semplice e poco costoso ed, allo stesso tempo, garantisca buoni risultati in termini di percentuali di recupero post-scongelamento delle cellule e di vitalità delle stesse, con particolare riguardo alla capacità proliferativa e differenziativa.

La presente riguarda un metodo per crioconservare la polpa di un dente comprendente fori praticati nei denti, tramite laser, per mettere a contatto il dente così forato con un agente crioconservante.

Lo scopo della perforazione del dente è quello di aumentarne la porosità, permettendo, in questo modo, al crioconservante di penetrare nel dente almeno fino allo strato di dentina e di diffondere nello stesso. Ciò permette di migliorare le performance di crioconservazione in termini di percentuali di recupero delle cellule staminali e di vitalità cellulare (capacità proliferativa e differenziativa) dopo scongelamento.

Il miglioramento delle performance di crioconservazione del dente consente, infatti, di recuperare, in una fase successiva, una popolazione di cellule staminali della polpa dentale con caratteristiche, quantitative e qualitative, comparabili a quelle di cellule staminali isolate dalla polpa di un dente fresco, non sottoposto a

crioconservazione. Inoltre, le caratteristiche qualitative e quantitative delle cellule staminali recuperate sono superiori rispetto a quelle di cellule staminali ottenute dopo scongelamento di un dente intero non forato.

2 Selezione dei donatori

Al genitore, o chi ne fa le veci, viene presentato e fatto firmare un consenso odontoiatrico in cui è espressamente specificato che il campione biologico prelevato verrà conservato all'interno della Biobanca Italiana, come donazione a scopo di ricerca scientifica.

CONSENSO INFORMATO per la Raccolta, conservazione e utilizzo di materiali biologici umani per ricerca

Istituto/Ospedale/Fondazione	_____		
Unità Operativa scrivere il nome e il numero dell'UO se della Fondazione	_____		
Padiglione	Piano	_____ se della Fondazione	
Dipartimento	_____		
Indirizzo: Via	N. _____	cap	Città _____
Telefoni: Segreteria	_____		Reparto _____
	Fax _____	e-mail _____	
Responsabile Unità Operativa Prof./Dr.	_____		
Referente: Prof./Dr.	Telefono _____	e-mail _____	

Gentile Signore/a,

durante l'estrazione di uno o più denti decidui per il quale ha già prestato il Suo consenso, è utile conservare alcuni Suoi materiali biologici per compiere eventuali studi di ricerca futuri che attualmente non è possibile delineare in modo preciso.

Questo documento ha lo scopo di affiancare il medico nel fornirle un'informazione corretta e completa sulla raccolta, conservazione e utilizzo di tale materiale biologico e/o dei dati associati, affinché Lei possa esprimere una scelta libera e informata.

Questa informazione al consenso per la raccolta, conservazione e utilizzo di materiale biologico viene proposta a:

COGNOME _____ NOME _____ SESSO: M F
 NATO/A IL _____ A _____
 dal Dr. COGNOME _____ NOME _____
 QUALIFICA _____

- 1. Motivazioni per cui viene proposto la raccolta, la conservazione e l'utilizzo del Suo materiale biologico:** avvanzerà materiale
- Durante intervento chirurgico per il quale ha già prestato il Suo consenso: potrà essere prelevato materiale biologico in aggiunta a quello utilizzato per accertamento /ricerca che è utile conservare in vista di studi futuri. Il prelievo avverrà scrivere le modalità del prelievo e la quantità raccolta, le possibili conseguenze e i possibili rischi sono: scrivere le possibili conseguenze e i rischi
- Tale materiale biologico potrà essere utilizzato per compiere indicare la natura degli studi, l'area di afferenza e le finalità secondo un rapporto di coerenza con la natura dell'atto clinico/progetto di ricerca/altro nel contesto del quale è raccolto il materiale biologico
- Ha compreso le motivazioni per cui le si propone la procedura? SI Ho chiesto ulteriori chiarimenti
- 2. Informazioni sulla raccolta e conservazione dei Suoi materiali biologici.**
- Dopo essere stato raccolto il Suo materiale biologico potrà essere conservato scrivere come e dove verrà conservato es. in azoto liquido, in congelatore a -80°C, altro presso:
- questa UO/laboratorio/reparto/altro
- la Biobanca Italiana, una banca pubblica di materiali biologici che opera senza scopo di lucro e che ha sede presso la Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano.
- Per garantire il rispetto della riservatezza, nel rispetto delle normative vigenti, il Suo materiale biologico e i dati associati verranno utilizzati dai ricercatori e dal personale incaricato in forma riservata. Al materiale biologico verrà attribuito un codice. Il legame tra il codice e i Suoi dati anagrafici e sensibili verrà mantenuto dalla Biobanca Italiana, che pertanto potrà utilizzare tali dati. La condivisione di dati tra ricercatori verrà effettuata in forma anonima scrivere la modalità di anonimizzazione proposta: codice, altro.
- Nell'eventualità in cui dovesse decidere di ritirare il suo consenso agli studi che potrebbero essere compiuti in futuro, il Suo materiale biologico e i dati associati, se non già utilizzati, verranno distrutti. La decisione di ritirare il consenso dovrà essere da Lei comunicata in forma scritta al Direttore dell'Unità Operativa proponente la ricerca/studio/altro, che avrà la responsabilità di informare la Biobanca Italiana
- Ha compreso le informazioni sulla procedura proposta? SI Ho chiesto ulteriori chiarimenti
- 3. Utilizzo delle informazioni acquisite dal compimento degli studi**
- Le informazioni acquisite dagli studi compiuti con il Suo materiale biologico e i dati associati potranno, sulla base del Suo consenso: essere condivise in forma anonima con altri ricercatori al fine di scrivere la finalità
- essere utilizzati, in forma anonima, in pubblicazioni scientifiche
- contribuire allo sviluppo di scrivere le potenzialità es. preparazione di farmaci, terapie, strumenti, altro. Gli eventuali proventi economici derivati dalla messa a punto di scrivere es. farmaci strumenti, altro possono essere utilizzati per il perseguimento di benefici collettivi. Essi non comportano compensi diretti per chi mette a disposizione il proprio materiale biologico. Comunque, l'utilizzo del materiale prelevato rispetterà i fini e le condizioni disposti dalle norme giuridiche italiane, con le ulteriori limitazioni da lei di seguito precisate con l'espressione del suo consenso.
- Se lo desidera, potrà richiedere informazioni sui risultati confermati degli esami analitici compiuti durante lo svolgimento di tali studi e su eventuali nuovi risultati e/o possibilità diagnostiche/terapeutiche derivanti dal compimento di tali indagini.
- Ha compreso i benefici attesi dalla procedura proposta? SI Ho chiesto ulteriori chiarimenti
- 4 Rischio derivabili dalla raccolta e/o dalla conservazione del Suo materiale biologico per gli studi proposti**
- La raccolta/il prelievo in aggiunta e/o la conservazione e/o l'utilizzo del Suo materiale biologico e dei dati associati: comporterà i seguenti rischi per la Sua salute [descrivere]
- non comporterà alcun rischio per la Sua salute
- Ha compreso i rischi derivabili dalla procedura proposta? SI Ho chiesto ulteriori chiarimenti

5. Smaltimento del materiale biologico conservato

Il materiale biologico conservato presso la Biobanca Italiana può essere non più disponibile perché: 5.1 completamente utilizzato, 5.2 il contenitore (provetta o sacca) nel quale è contenuto risulta irrimediabilmente danneggiato,

5.3 il Responsabile dell'UO che ha richiesto la conservazione presso la Biobanca Italiana ha dato disposizioni alla Biobanca Italiana di eliminare il materiale biologico, o ha disposto la conservazione presso un altro Ente.

Ha compreso in quali casi il materiale biologico può non essere più disponibile? SI Ho chiesto ulteriori chiarimenti

DICHIARAZIONE DI CHI HA RACCOLTO IL CONSENSO

Io sottoscritto/a _____ dichiaro di aver informato il paziente sulla raccolta, la conservazione e l'utilizzo che potrebbe essere fatto in futuro del suo materiale biologico e dei dati ad esso associati in modo chiaro, con linguaggio semplice, assicurandomi della sua comprensione, di aver risposto ad ogni domanda e di prendere atto della sua libera decisione di seguito espressa.

Data/...../.....

Firma _____

Cognome Nome _____ Qualifica _____

FIRMA INFORMATIVA

Io sottoscritto/a _____ dichiaro di aver ricevuto le informazioni che mi hanno permesso di comprendere la raccolta, la conservazione e l'utilizzo che potrebbe essere fatto in futuro del mio materiale biologico e dei dati ad essi associati, anche alla luce degli ulteriori chiarimenti da me richiesti.

Data/...../.....

Firma _____

del

paziente. _____

Cognome Nome _____

SI

NO

Il materiale biologico raccolto/prelevato in aggiunta durante **scrivere intervento/prelievo** ESPRESSIONE DEL CONSENSO

Le viene qui richiesto di dichiarare o di rifiutare il suo consenso alla raccolta/prelievo/aggiunta/altro conservazione e utilizzo dei Suoi materiali biologici e dei dati associati per il compimento di eventuali studi di ricerca futuri. In ogni caso Lei potrà comunque, in qualsiasi momento successivo, ritirare il consenso precedentemente espresso e richiedere la distruzione irreversibile del Suo materiale biologico e dei dati associati.

ACCONSENSO che:

- Sia prelevata una parte di materiale biologico in aggiunta a quello necessario per il compimento dell'atto clinico/progetto di ricerca
- **/altro come scritto nell'informativa** e i dati associati siano conservati presso l'U.O./l'Istituto e presso la Biobanca Italiana della Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena
 SI NO
- Il materiale biologico e i dati ad essi associati siano utilizzati per eventuali studi di ricerca futuri di carattere **scrivere quanto descritto nell'informativa** riguardanti **scrivere quanto descritto nell'informativa** e finalizzati a **scrivere quanto descritto nell'informativa**
 SI NO
- I dati anagrafici e sensibili siano gestiti dall'UO e dalla Biobanca Italiana, nel rispetto della legge sulla privacy e che venga mantenuto il legame con il codice attribuito al materiale biologico
 SI NO
- Il materiale biologico e i dati associati siano condivisi in forma anonima con altri ricercatori per **precisare la motivazione**
 SI NO
- Il materiale biologico e i dati associati siano utilizzati in forma anonima per pubblicazioni scientifiche
 SI NO
- I risultati acquisiti mediante il compimento degli studi con uso del mio materiale biologico e dei dati ad essi associati siano utilizzati in forma anonima per lo sviluppo di **precisare le finalità**
 SI NO
- I materiali biologici siano smaltiti nei termini precisati nell'informativa
 SI NO

DICHIARO di:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ essere stato/a informato/a della possibilità di revocare il consenso alla raccolta e/o, alla conservazione e/o all'utilizzo del mio materiale biologico e dei dati associati in qualunque momento e per qualunque motivazione e della possibilità di richiedere la distruzione irreversibile dei medesimi 	
<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Data/...../.....	Firma del paziente _____
Cognome Nome _____	

Tab. 1: Scheda raccolta campioni biologici e consenso informato

Selezione dei pazienti “donatori”

Criteria di inclusione:

- Bambini età compresa tra i 5 e i 14 anni
- Dentatura decidua e/o mista
- Processi radicolari intatti
- Accettazione del consenso informato all'estrazione terapeutica ortodontica e alla “donazione”
- Elementi dentali soprannumerari

Criteria di esclusione:

- Processi cariosi
- Corona dentale precedentemente trattata con amalgama e compositi
- Pulpotomie o pulpectomie pregresse
- Riassorbimento radicolare o apicale

- Lesioni periapicali
- Elementi dentali “non vitali”
- Severo bruxismo
- Malattie sistemiche

Sono stati presi in esame 20 elementi dentali decidui, di cui 6 molari (quinti), 8 canini e 6 incisivi.

14 soggetti erano di sesso maschile e 6 di sesso femminile di età compresa tra gli 8 e i 12 anni.

- 8 denti sono stati esclusi dalla ricerca in quanto non rientravano nei criteri di selezioni indicati per i donatori (soggetti affetti da malattie genetiche).
- 4 denti sono stati valutati in vitro, ma esclusi dallo studio, in quanto affetti da processo carioso, e pertanto infetti e con polpa dentale danneggiata e ricca di popolazione batterica che poteva contaminare l’isolamento delle cellule
- 3 denti sono stati criopreservati intatti e senza fori tramite laser
- 4 denti sono stati trattati con metodica laser e successivamente criopreservati
- 1 dente è stato trattato con turbina (fresa a pallina) per praticare dei fori, e successivamente criopreservato

I denti candidati per tale ricerca sono stati prevalentemente i canini e gli incisivi. Questi, infatti, sono i denti che permutano nel range di età prescelto, ma che allo stesso tempo per mancanza di spazio hanno maggiore difficoltà a permutare, risulta pertanto più semplice il loro reperimento, in quanto devono essere avulsi dal cavo orale per fare spazio ai denti permanenti.

3 Estrazione e preparazione degli elementi dentali

I denti decidui non ancora esfoliati, vengono avulsi dal cavo orale, previa anestesia loco-regionale (la tipologia della quale, e il tipo di anestetico, viene

valutato in base all'età e allo stato di salute del soggetto).

Una volta estratti gli elementi dentali, con una garzina sterile imbibita di fisiologica vengono rimossi gli eventuali residui di gengiva o di legamento parodontale.

Dopo attenta decontaminazione della superficie esterna, il dente viene immerso in una provetta da 5 mL in polipropilene tipo falcon in PP, contenente sostanze antibatteriche e nutritive, tipo un medium di coltura: PBS + 10% FBS + 1% penicillina/streptomicina, e viene conservato a freddo in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2°C e 6°C, preferibilmente a 4°C, e mantenuto in posizione verticale.

Viene etichettato con le iniziali del donatore, il sesso, la data di nascita, il giorno del prelievo e il riferimento numerico internazionale di riconoscimento del dente, e verrà assegnato un numero di donatore.

Successivamente, si conserva il dente avulso, in una soluzione disinfettante, antibatterica e nutritiva che consente al dente di mantenere una buona vitalità. Detta soluzione nutritiva può comprendere un terreno di coltura, per esempio RPMI, e/o siero fetale bovino e/o un antibiotico/antimicotico, per esempio una miscela di penicillina/streptomicina.

Entro 48/72 ore dall'avulsione del dente, verrà trasportato al Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Dipartimento di Medicina Rigenerativa, Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Padiglione Marangoni.

4 Individuazione e caratteristiche del laser utilizzato

Il termine LASER è un acronimo che significa Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Radiatore di Luce Amplificata mediante Emissione Stimolata). E' composto da un mezzo attivo, ove la luce viene amplificata; un risonatore, ove la luce forma un'onda risonante riflettendosi sugli specchi

terminali e un sistema per il pompaggio del mezzo attivo.

La scelta della lunghezza d'onda inoltre incide notevolmente sull'efficacia e sulla facilità di impiego.

A livello odontoiatrico, l'attenzione è rivolta sia verso i tessuti molli, che all'idrossiapatite delle strutture dentali e ossee, quindi tale dispositivo è in grado di incidere a livello dello smalto, della dentina e del tessuto osseo. Sull'acqua questi laser esplicano un'azione fototermica determinandone il passaggio istantaneo dallo stato liquido allo stato di vapore. Tale fenomeno comporta un rapidissimo aumento di volume che determina la rottura delle strutture tissutali trattate con il raggio laser e la conseguente asportazione tissutale per strati sottilissimi. La profondità di penetrazione del raggio è legata al fatto che l'energia ceduta viene completamente assorbita dall'acqua presente negli strati superficiali del tessuto trattato per cui si riducono i rischi di danni da trasmissione negli strati profondi e si comprende come non si sviluppino reazioni di incremento termico e quindi non si provochi carbonizzazione dei tessuti.

Il laser scelto è Nd:YAG con i seguenti parametri:

lunghezza d'onda=1064-10600 nm

diametro fibra=200-700 μm

energia impulso=27-90 mJ

potenza=0.5-10 W

frequenza=4-50 Hz

utilizzato a contatto e non, in modalità continua, pulsata e superpulsata. In questo modo vengono eliminate per prime le sostanze più ricche in acqua consentendo nella preparazione della cavità dentale, ai fini di criopreservare la polpa dentale, di rimuovere in modo estremamente preciso e selettivo porzioni di smalto dentale e di dentina, senza il rischio di asportare, lacerare o surriscaldare la polpa dentale, consentendo la criopreservazione del materiale pulpare diminuendo il rischio di un'eccessiva esposizione della materia, con la possibile conseguenza di contaminazione batterica. Il vantaggio principale di tale laser rispetto ad altri sta

proprio nella lunghezza d'onda emessa che rappresenta quella utile per operare sulla dentina.

Tuttavia presenta altri vantaggi, oltre alla riduzione dell'incremento termico sui tessuti circostanti, come già precedentemente discusso. Uno di questi è la possibilità di limitare il campo d'azione della luce laser a zone piccolissime, in questo modo è possibile intervenire solo sulla zona di interesse senza compromettere i tessuti dentali circostanti. Altro vantaggio sta nel fatto che non produce vibrazioni e quindi elimina le problematiche legate alle microfratture prodotte sui tessuti dentali dall'azione dinamica del trapano. Oltre all'azione fototermica, il laser esplica anche un'azione fotomeccanica nei confronti dei tessuti trattati. La modalità di utilizzo fa sì che il breve impulso provoca un picco di energia nel punto di applicazione che si manifesta come incremento di pressione. A tale incremento segue un ritorno elastico del tessuto tanto violento da determinare la rottura dei legami e il distacco di frammenti tissutali. In questo modo si ottiene l'asportazione del tessuto dentale in forma di microesplosioni, si verifica cioè un'esplosione di particelle tissutali. Anche in questo caso non si ha un incremento termico sui tessuti circostanti.

Per le caratteristiche di interazione fisica sia lo smalto che la dentina possono essere trattate tramite laser a Neodimio, non determinando elevati rialzi termici, che potrebbero determinare ipertermia pulpare e/o necrosi, e non provocando segni di fratture dei tessuti circostanti l'area trattata (craking), con un rispetto tissutale superiore a quello ottenibile con strumenti rotanti. Pertanto si osserva una drastica riduzione dei danni tissutali e pulpari e la decontaminazione dell'area.

Tramite pinza di college il dente avulso verrà rimosso dal contenitore tipo falcon e mantenuto in posizione (circa a 90°), si procederà con la perforazione della corona dentale, a livello della giunzione corona-radice, tramite Laser Nd:YAG.

Il metodo prevede di praticare almeno un foro (o perforazione) in ogni dente. Il numero di fori può variare da 1 a 4 a seconda della tipologia di dente. In particolare, può variare da 1 a 2 per un canino o incisivo, mentre per i molari possono essere praticati da 2 a 4 fori.

Il foro è, preferibilmente, un microforo (o microperforazione), più

preferibilmente è un foro avente un diametro compreso tra 0,001 e 0,5 mm, preferibilmente 0,07 e 0,3 mm, praticato in modo da raggiungere almeno la dentina di detto dente.

Verrà praticato un foro non passante, della dimensione massima di un ago di siringa necessario per il passaggio del crioprotettore a livello della camera pulpare del dente.

Si è scelto, preferibilmente, di effettuare al massimo due fori in modo da evitare il surriscaldamento del dente, ma allo stesso tempo in modo da rimuovere parte della dentina per facilitare la penetrazione del crioconservante a livello della polpa dentale e la successiva apertura del dente.

5 Metodologia di trasposto e bancaggio dentale

Dopo la foratura, il dente è inserito all'interno di una Cryovial da 2 mL con all'interno apposito terreno di coltura e inserito in una scatola portaprovette in polistirolo in modo da mantenerlo in posizione verticale. Dal momento della foratura al momento del trasporto, il dente è mantenuto in frigorifero a 4°C.

Entro 48 ore dall'avulsione, il dente, accompagnato dalla relativa *Scheda Caratteristiche Campione*, deve pervenire alla Biobanca Italiana dove viene trasferito, tramite pinze monouso, in una Cryovial da 2 mL (provetta per criogenia, in polipropilene, con tappo a vite con filettatura esterna in polietilene ad alta densità, sterile, non citotossica, apirogena) contenente la soluzione di congelamento. Il dente viene mantenuto per 20 minuti a 4°C per permettere al crioconservante di penetrare all'interno del dente (10% DMSO + 90% destrano).

Il dente forato viene

inserito nel macchinario chiamato "Mr. Frozen", all'interno del congelatore meccanico a -80°C per almeno 12 ore;

Il criocongelamento avviene ad una temperatura compresa tra -15°C e -196°C, preferibilmente tra -50 e -90°C.

In una forma preferita di realizzazione, il criocongelamento è effettuato mediante

un abbassamento programmato di temperatura fino ad arrivare alla temperatura necessaria, alla quale il campione verrà stoccato per il tempo desiderato. In questo caso il dente è stato inserito in congelatore meccanico a -80°C .

Il “Mr. Frozen” fornisce una velocità di raffreddamento da 1-5 gradi al minuto, nel caso di criopreservazione dei denti forati la velocità è stata di $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, che rappresenta la velocità richiesta per una buona criopreservazione e un buon recupero delle cellule.

Dopo almeno 10 giorni, il dente viene scongelato e viene estratta la polpa dentaria. Non essendo possibile nel caso del dente ottenere la sterilità, non è necessario lavorare sotto cappa a flusso laminare.

Nella fase di rottura del dente è preferibile fare leva, con il dispositivo meccanico utilizzato, a livello del punto o dei punti di perforazione del dente.

Il dente, essendo più debole in questi punti, cede più facilmente alla rottura.

Una volta frantumato il dente, la polpa è estratta, preferibilmente utilizzando pinzette sterili e operando in generali condizioni di sterilità.

La polpa dentale estratta è, quindi, sottoposta a dissociazione, utilizzando qualsiasi tecnica nota nel settore.

Ad esempio, la dissociazione può essere meccanica oppure la dissociazione o digestione può essere enzimatica.

Esempi di enzimi utilizzabili per la dissociazione sono scelti tra: tripsina, collagenasi, ialuronidasi o miscele di cellulasi.

La dissociazione può essere realizzata ad una temperatura che può variare da 32 a 40°C . La durata della fase di dissociazione può variare da 30 minuti a 2 ore.

La dissociazione termina quando il campione di polpa dentale è completamente separato nei suoi componenti cellulari.

Il campione di polpa dentale dissociato può essere sottoposto ad una fase di lavaggio. La fase di lavaggio può essere realizzata con uno o più agenti scelti nel gruppo: PBS, HBSS, con e senza calcio e magnesio, addizionato oppure no con glicina, alanina, glucosio, insulina, EDTA o EGTA o albumina o destrano oppure un mezzo di coltura, per esempio RPMI.

Le cellule della polpa dentale recuperate, cioè le cellule staminali, in particolare le

cellule staminali mesenchimali, sono sottoposte ad una fase di amplificazione in coltura.

Ad esempio, la coltura può prevedere una fase di semina delle cellule su un apposito supporto (per esempio su piastre o fiasche di plastica).

La densità a cui le cellule della polpa dentale possono essere seminate varia da 1000-1000000 cellule/cm², preferibilmente 5000-7000 cellule/cm².

Il terreno di coltura è scelto tra: alpha MEM glutamax, MEM, DMEM, alpha MEM, RPMI, Iscove's e F1.

Al terreno possono essere aggiunti diversi nutrienti come supplementi, per esempio Siero Bovino Fetale, amminoacidi non essenziali, L-glutammina, fattori di crescita scelti nel gruppo EGF, FGF, VEGF ed HGF, oppure un gel piastrinico.

Il terreno può anche contenere antibiotici e/o antimicotici, per esempio gentamicina, penicillina e streptomina.

Ad esempio, il terreno di coltura può comprendere Alpha-MEM glutamax, preferibilmente arricchito con siero fetale bovino e/o penicillina/streptomina.

La coltura delle cellule può essere realizzata in condizioni di temperatura, umidità e/o pressione di CO₂ controllate.

In particolare, la temperatura può oscillare da 25-37°C; l'umidità relativa varia da 80-98%, la pressione è preferibilmente la pressione atmosferica; la pressione di CO₂ può variare da 3-10%.

Dalle cellule così coltivate si dissociano le cellule che crescono in adesione.

La dissociazione può avvenire come descritto in precedenza; preferibilmente la dissociazione delle cellule può essere realizzata enzimaticamente, più preferibilmente con l'enzima collagenasi A.

6 Estrazione, isolamento e differenziazione di cellule staminali dentali

La popolazione cellulare, ottenuta dopo coltivazione *in vitro*, comprende cellule della polpa dentale, *in* particolare cellule staminali, preferibilmente cellule mesenchimali.

Una popolazione isolata di cellule mesenchimali staminali derivate da polpa dentale di un dente crioconservato dopo foratura con laser, ha un tasso di proliferazione che oscilla da 4 a 4,5, detto tasso proliferativo essendo calcolato come duplicazioni cumulative della popolazione (CDP) in un tempo di dieci giorni.

In un'ulteriore forma di realizzazione dette cellule mesenchimali staminali esprimono il seguente pannello di marcatori CD90, CD73, CD105, CD44 e HLA-ABC, CD146, NG2, PDGF-Rbeta, alpha-SMA e, preferibilmente, non esprimono il seguente pannello di marcatori CD34, CD45, CD56 CD31, CD144, KDR e HLA-DR. In una forma preferita di realizzazione, dette cellule mesenchimali staminali sono ottenibili dalla polpa dentale crioconservata secondo il metodo della ricerca.

Dette cellule mesenchimali staminali possono essere differenziate in cellule di derivazione mesodermica, in particolare possono generare cellule adipose, cartilaginee od ossee.

Un campione di polpa dentale ottenuta in seguito alla frantumazione di un dente deciduo fresco (non sottoposto a procedura di crioconservazione); un dente deciduo intatto crioconservato con o senza DMSO; un dente deciduo crioconservato in seguito a foratura con laser secondo il metodo descritto sopra, è stato digerito con collagenasi A 1 mg/mL (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany) ad una temperatura di 37°C, per 1 ora fino alla completa dissociazione del campione.

Dopo la procedura di digestione del campione, la sospensione di cellule della polpa dentale è stata raccolta e diluita in un tampone fosfato-salino (PBS; Gibco, Grand Island, NY, USA); quindi, la sospensione cellulare diluita è stata centrifugata a 1400 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso e le

cellule ottenute sono state seminate in un terreno colturale costituito da: Alpha-MEM glutamax 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20% Siero Fetale Bovino (FBS; Biochrom, AG, Berlin, Germany), 1% penicillina/streptomicina (P/S, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).

Il terreno colturale è stato sostituito con terreno fresco ogni 3 giorni e le cellule mesenchimali staminali derivate dalla polpa dentale sono state cresciute a lungo termine a 37°C in atmosfera umidificata e contenente 5% CO₂.

Le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di campioni di dente deciduo fresco sono in grado di essere tenute in coltura a lungo termine, mostrando una forma a fuso (Figura 1) e formando delle colonie definite “round bottom” (Figura 2).

Le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di campioni di dente deciduo intatto e crioconservato con DMSO (Figura 3) o senza DMSO (Figura 4) possono essere mantenute in coltura, ma le cellule sono risultate evidentemente apoptotiche e sofferenti.

Le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di campioni di dente deciduo crioconservato in seguito a perforazione con il laser secondo il metodo descritto sopra (Figure 5), sono in grado di proliferare ed esibiscono la tipica forma a fuso delle cellule mesenchimali staminali isolate da dente fresco.

Le cellule derivate dalla polpa dentale di un dente che crescono aderendo alla superficie su cui sono piastrate (generalmente una piastra od una fiasca di varie dimensioni) quando raggiungono una confluenza di 80% vengono staccate dalla superficie di adesione con un trattamento con tripsina-EDTA (Gibco), contate e riseminate in una fiasca di 75-cm² ad una concentrazione di 5000-7000 cellule/cm² nelle condizioni colturali prima descritte.

Ad ogni passaggio della coltura cellulare, ogni conta cellulare e diluizione cellulare è stata registrata ed utilizzata per calcolare il potenziale di espansione in termini di numero delle duplicazioni cumulative della popolazione cellulare (CPD).

Il numero delle duplicazioni delle cellule (PD) è stato calcolato risolvendo la seguente equazione:

$$PD = \log(N)/\log 2$$

in cui N rappresenta la differenza tra il numero delle cellule raccolte dopo il trattamento con tripsina (N_i) ed il numero delle cellule seminate (N_0). Il CPD è stato calcolato come la somma delle PD che si sono verificate durante i 70 giorni di coltura a lungo termine.

La crescita delle cellule mesenchimali staminali derivate dai campioni di dente deciduo fresco è sempre molto alta durante tutta la fase di coltura (Figura 6, MSCs1 e MSCs2), anche dopo che le cellule isolate sono sottoposte ad una fase di criocongelamento (MSCs8). La velocità di crescita delle cellule mesenchimali staminali derivate dai campioni di dente deciduo intatto e crioconservato con o senza DMSO, ma senza subire il trattamento di foratura illustrato sopra, si è dimostrata sempre molto bassa (Figure 3 e 4, MSCs3 e MSCs4).

La velocità di crescita delle cellule mesenchimali staminali derivate dai campioni di dente deciduo crioconservato in seguito alla foratura con il laser secondo il metodo sopra descritto, è simile a quella delle cellule estratte dal dente fresco (Figure 5 e 6, MSCs5, MSCs6 e MSCs7).

In particolare, la popolazione cellulare di cellule staminali mesenchimali derivate dalla polpa dentale è caratterizzata da un elevato tasso di proliferazione quantificato dal calcolo delle duplicazioni cumulative della popolazione (CPD), che per un tempo di dieci giorni in coltura è molto elevato nel caso delle cellule staminali mesenchimali isolate da denti freschi non crioconservati (valore medio di 5.3), delle cellule staminali mesenchimali isolate da denti criopreservati dopo foratura con laser secondo la metodologia (valore medio di 4.1) e delle cellule mesenchimali staminali isolate da denti freschi e sottoposte a crio-conservazione (valore medio di 5.1).

Nel caso delle cellule staminali mesenchimali isolate da denti crioconservati senza foratura con laser caratterizzate da un basso indice di proliferazione è stato possibile valutare il CPD dopo 40 giorni di coltura (valore medio di 2.5).

Le cellule mesenchimali staminali isolate da campioni di dente deciduo fresco o di dente deciduo crioconservato sottoposto alla foratura secondo la metodica sono state caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica durante i vari passaggi

colturali (Figura 8).

Le cellule sono state lavate con PBS per 20 minuti a temperatura ambiente (RT) e poi sono state incubate al buio con i seguenti anticorpi murini coniugati anti-uomo: CD31-PE (Becton Dickinson, BD, San Jose, CA, USA), CD34-PE (BD), CD44-FITC (BD), CD45-PC7 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), CD73-PE (BD), CD90-PE (Chemicon, Temecula, CA, USA), CD105-PE (ImmunoTools, Friesoythe, Germany), CD146-PE/FITC (BioCytex, Marseille, France), alpha-SMA FITC (Sigma-Aldrich), NG2-PE (Beckman Coulter), PDGF-Rbeta PE (BD), HLA-ABC-FITC (BD), HLA-DR-PE (BD), CD144-FITC (VE-cadherin; Bender MedSystem, Burlingame, CA, USA), KDR-PE (BD).

Come controllo negativo sono stati utilizzati i vari isotipi di immunoglobuline coniugate: IgG1 PE-FITC (Chemicon), IgG1-PC7 (Beckman Coulter) e IgG1-APC (BD).

Le cellule dopo l'incubazione con gli anticorpi sono state lavate con PBS contenente Albumina Siero Bovina (BSA) 0.1%.

Mediante l'uso di un citofluorimetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter) sono stati acquisiti almeno 50,000 eventi e, mediante analisi con il software CXP (Figura 8).

Le cellule mesenchimali staminali isolate da campioni di dente deciduo fresco o di dente deciduo crioconservato e forato secondo il metodo della ricerca, coltivate al passaggio 3, sono state staccate dalle fiasche utilizzando tripsina e caratterizzate mediante citofluorimetria.

Le cellule mesenchimali staminali isolate sia da campioni di dente deciduo fresco, sia da campioni di dente deciduo crioconservato e forato secondo la presente metodologia, hanno evidenziato il tipico immunofenotipo delle cellule mesenchimali staminali e cioè: CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺ e HLA-ABC⁺.

Queste cellule esprimono anche CD146, NG2, PDGF-Rbeta, alpha-SMA, ma non esprimono CD34, CD45 e CD56.

Inoltre, queste cellule sono negative per l'espressione di CD31, CD144, KDR e HLA-DR, confermando il loro profilo tipo-cellule mesenchimali staminali

(Figura 8). Quindi, le cellule mesenchimali staminali isolate da dente deciduo forato e crioconservato secondo la presente ricerca sono caratterizzate dal seguente immunofenotipo: CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺, HLA-ABC⁺ CD146⁺, NG2⁺, PDGF-Rbeta⁺ e alpha-SMA⁺. Inoltre, esse sono CD34⁻, CD45⁻, CD56⁻, CD31⁻, CD144⁻, KDR⁻ e HLA-DR⁻.

Le stesse percentuali dei marcatori sopra riportati sono state riscontrate anche nelle cellule al sesto passaggio colturale.

In particolare, i marcatori analizzati sono: CD146, alpha-SMA (SMA), PDGFRbeta (PDGFRB), CD90, CD44, CD73, HLA-ABC, HLA-DR, CD105, KDR, CD144, CD31, CD45 e CD34. Le cellule sono positive per: CD90, CD73, CD105, CD44, HLA-ABC, CD146, NG2, PDGFRB, SMA.

Le cellule sono negative per: CD34, CD45, CD56, CD31, CD144, KDR e HLA-DR.

Le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo fresco sono state differenziate in senso adipogenico ed osteogenico utilizzando appositi mezzi di coltura.

Allo scopo di indurre il differenziamento in senso adipogenico le cellule mesenchimali staminali sono state seminate in piastra ad una densità cellulare di 2.1×10^4 cellule/cm² in un mezzo denominato human MSC Adipogenic Induction and Maintenance.

Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza, sono stati effettuati 3 cicli di induzione/mantenimento, poi le cellule mesenchimali staminali sono state coltivate per 7 giorni ancora nel mezzo addizionato denominato Adipogenic Differentiation Maintenance Medium (Lonza), sostituendo il terreno di coltura ogni 2-3 giorni.

Le cellule sono state colorate con una soluzione Oil Red O (Sigma-Aldrich) per rivelare i vacuoli lipidici.

Allo scopo di differenziare le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo fresco in senso osteogenico, 3.1×10^3 cellule/cm² sono state cresciute per 3 settimane in un mezzo denominato human MSC Osteogenic Medium (Lonza).

Le cellule indotte al differenziamento osteogenico sono state prima fissate con alcol etilico al 70% per 1 ora e poi sono state colorate per 10 minuti con Alizarin Red S 40 mM (Sigma-Aldrich) allo scopo di rivelare i depositi di calcio.

Le immagini dei saggi colorimetrici sono state acquisite con il microscopio Nikon Eclipse TS100 fornito di obiettivi 40x/0.55 Ph1 ADL e 20x/0.40 Ph1.

Le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo fresco sono in grado di differenziare, sotto appropriato stimolo differenziativo, in cellule della linea osteogenica ed adipogenica.

In condizioni di differenziamento osteogenico le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo fresco diventano mineralizzate con colorazioni specifiche con Alizarin red per il deposito di calcio. In condizioni di differenziamento adipogenico le cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo fresco, dopo 2 settimane, generano vacuoli lipidici.



Figura 1: mostra la morfologia delle cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente fresco deciduo (non esfoliato); in particolare sono rappresentate le cellule mesenchimali staminali a confluenza.

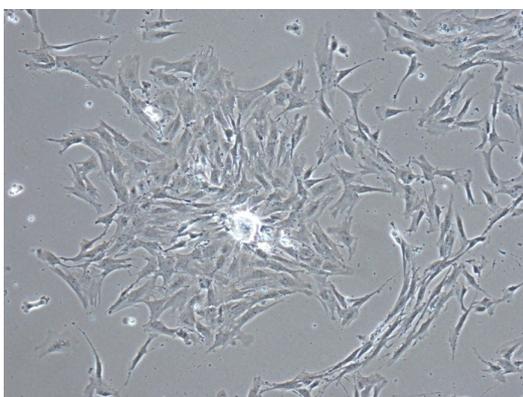


Figura 2: mostra la morfologia delle cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente fresco deciduo (non esfoliato); in particolare è rappresentata una colonia di cellule mesenchimali staminali definita “round bottom”.

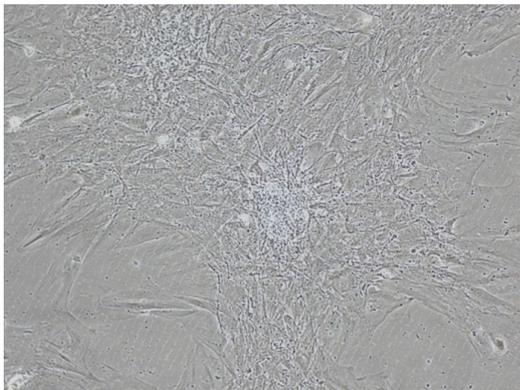


Figura 3: mostra la morfologia delle cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo (non esfoliato) intatto (non forato) scongelato dopo crioconservazione in presenza di DMSO

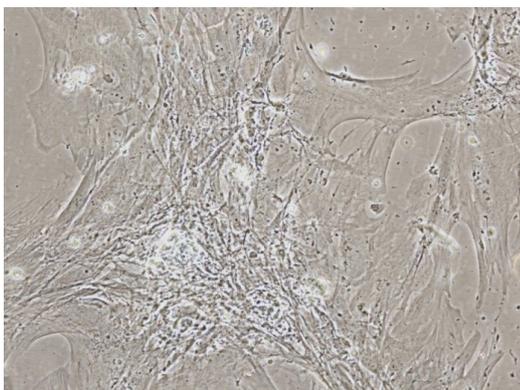


Figura 4: mostrano la morfologia delle cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo (non esfoliato) intatto (non forato) scongelato dopo crioconservazione senza DMSO

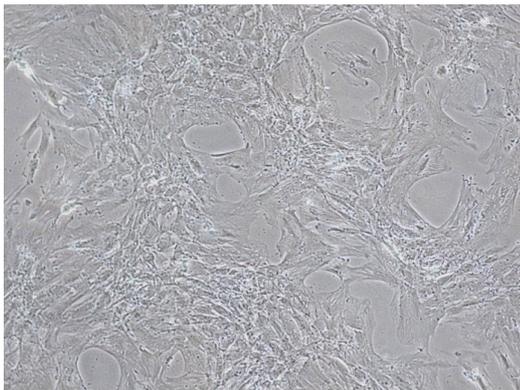


Figura 5: mostra la morfologia delle cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo (non esfoliato), scongelato dopo foratura e crioconservazione

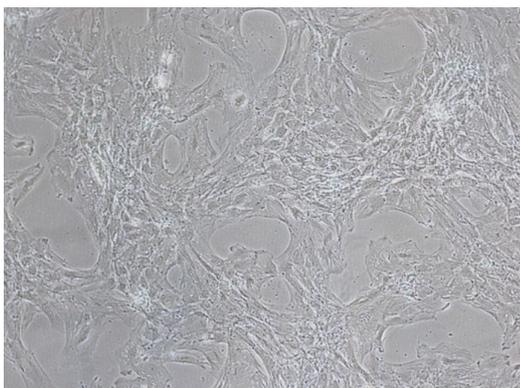


Figura 6: mostrano la morfologia delle cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale di un dente deciduo (non esfoliato), scongelato dopo foratura e crioconservazione.

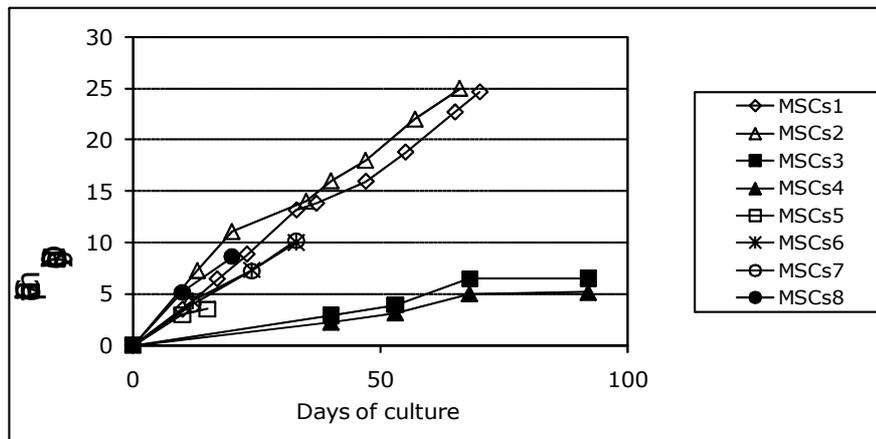
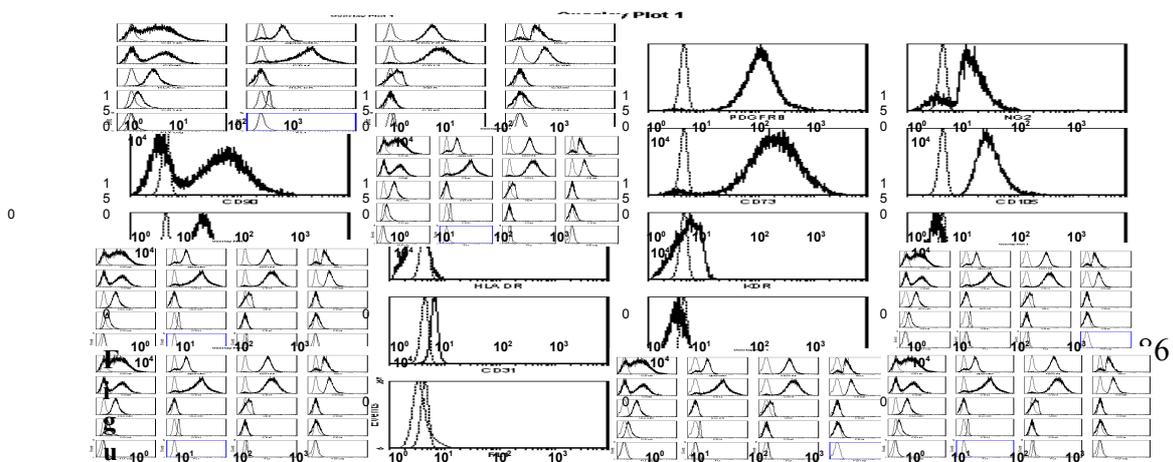


Figura 7: Tasso di proliferazione della popolazione delle cellule staminali mesenchimali ottenute dalla polpa dentale



a
E
r
r
o
r
e
.
N
e
l
d
o
c
u
m
e
n
t
o
n

1	1	1
5	5	5
0	0	0
1	1	1
5	5	5
0	0	0
0	0	0

Figura 8: Cellule staminali della polpa dentale caratterizzate tramite citofluorimetria, con espressione dei marcatori

e
s
i
s
t
e
t
e
s
t
o
d

RISULTATI

Scopo della presente ricerca è stato la messa a punto di una nuova metodica di criococonservazione del dente in toto subito dopo l'estrazione, che assicuri un'ottimale conservazione della polpa dentale preservando la staminalità delle cellule in essa contenute. La metodica comporta l'utilizzo di un laser che permette di effettuare sul dente alcuni fori affinché la polpa possa venire in contatto con l'agente criococonservante. L'impiego del laser consente di rimuovere, in modo estremamente preciso e selettivo, porzioni di smalto dentale e di dentina e di accedere ai canali radicolari senza il rischio di asportare, lacerare o surriscaldare la polpa dentale e preservandone la vitalità cellulare.

L'innovativa metodica ha portato alla deposizione del brevetto no. MI2010A000839 (inventori: S. Gioventù, S. Frasca, L. Lazzari, G. Andriolo, E. Montelatici, P. Rebullà, F. Bonino) e alla creazione della **"Banca del Sorriso"** presso il Dipartimento di Medicina Rigenerativa della Fondazione, con l'obiettivo di raccogliere e criopreservare senza scopo di lucro tessuti dentali donati alla banca previo consenso informato e raccolti presso la Clinica Odontoiatrica della Fondazione.

Il progetto *“Banca del Sorriso”* nasce proprio dalla consapevolezza che le staminali derivate dalla polpa dentale hanno un’elevata capacità proliferativa ed una importante plasticità cellulare, caratteristiche assai rilevanti per possibili applicazioni terapeutiche a livello nervoso, osseo e cartilagineo.

In questo caso le cellule utilizzate sono quelle contenute nei materiali considerati “di scarto” nella quotidiana attività odontoiatrica, in particolare i denti decidui non esfoliati interi (in futuro si prevede di utilizzare anche i germi dei terzi molari) in cui è stata valutata la potenzialità staminale. Il progetto ha previsto di analizzare denti crioconservati interi in cui non sono stati praticati fori (in assenza ed in presenza di agente criopreservante) in confronto alla ottimale staminalità di cellule estratte da polpa dentale fresca (non criopreservata).

Nel corso della ricerca sono state isolate le colture cellulari e analizzate da un punto di vista morfologico, dimostrando che il tasso di proliferazione (calcolato come CPD, cumulative population doublings) della popolazione di cellule staminali mesenchimali ottenute dalla polpa dentale isolate dal dente criopreservato in seguito al trattamento con i fori eseguiti con laser (MSC5, MSC6, MSC7) in coltura mantengono un tasso di proliferazione sovrapponibile alle cellule isolate dalla polpa dentale fresca non criopreservata (MSC1 e MSC2).

Al contrario è molto basso il tasso di proliferazione delle cellule isolate da denti crioconservati interi (privi di fori) in presenza (MSC3) e in assenza (MSC4) di criopreservante.

Infine, le cellule isolate dalla polpa dentale sono state caratterizzate mediante metodica citofluorimetrica e presentano le tipiche caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali ovvero esprimono il seguente pannello di marcatori: CD90, CD73, CD105, CD44 e HLA-ABC, CD146, NG2, PDGF-Rbeta, alpha-SMA, e non esprimono il seguente pannello di marcatori: CD34, CD45, CD56, CD31, CD144, KDR e HLA-DR.

CONCLUSIONI

La mucosa orale, stando ai dati di numerose ricerche internazionali, conterrebbe cellule staminali in grado di essere una valida alternativa alle staminali embrionali. In altre parole, ogni essere umano all'interno del proprio cavo orale possiederebbe numerose cellule staminali che rimangono giovani nonostante il nostro inevitabile invecchiamento, e la proprietà di autorigenerarsi, caratteristica che le renderebbe del tutto simili, in quanto a utilità, a quelle embrionali.

La polpa dentaria, per il suo contenuto in cellule staminali multipotenti, appare quindi un tessuto che presenta notevoli prospettive sia per la comprensione di meccanismi di sviluppo delle strutture dentarie e, più in generale, di tutte le strutture associate allo splancnocranio, come anche per le potenziali applicazioni cliniche delle cellule staminali.

Alla luce dei dati della letteratura scientifica internazionale a carattere generale sulle cellule staminali e, in particolare, dalle ricerche effettuate a livello delle cellule staminali di origine dentale, presso la Cell Factory "Franco Calori" del Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia e il Dipartimento Odontostomatologico della Fondazione Ca' Granda Ospedale

Maggiore Policlinico è stato brevettato un metodo per la criopreservazione delle cellule staminali della polpa dentale, un tessuto ricco di cellule staminali di elevata potenzialità terapeutica per la ricostruzione dei denti e di altri tessuti.

La ricerca descrive una innovativa procedura di microforatura del dente praticata mediante laser, che non surriscalda i tessuti circostanti, non danneggia le cellule staminali, e migliora significativamente l'accesso alla polpa dentale delle sostanze 'crioprotettrici' utilizzate per la conservazione delle cellule allo stato congelato (biobanking del dente).

Mentre sono già attive nel mondo diverse 'banche del dente' commerciali a scopo di lucro, la presente ricerca ha avuto per obiettivo la creazione di una "Banca del Sorriso" no-profit presso la Fondazione Policlinico, ente riconosciuto come istituto dei tessuti.

L'obiettivo del progetto è stato quello di raccogliere e criopreservare senza scopo di lucro denti donati alla banca previo consenso informato, da cui estrarre cellule staminali a scopo di ricerca scientifica.

Questo metodo innovativo è molto vantaggioso perché consente di semplificare le procedure di banking riducendone notevolmente i costi. Inoltre, il metodo assicura una vitalità ottimale delle cellule staminali recuperabili dopo scongelamento e frattura del dente.

Nel corso della ricerca è stata anche valutata la potenzialità staminale della polpa di un dente crioconservato intero a cui sono stati praticati dei fori con una fresa a pallina montata su turbina, e di un dente crioconservato senza preparazione con i fori (in presenza e in assenza dell'agente crioconservante) in confronto alla staminalità ottimale di cellule estratte da polpa dentale fresca (non crioconservata).

La ricerca ha previsto un'analisi attenta e standardizzata per la valutazione della morfologia delle cellule mesenchimali staminali isolate dalla polpa dentale e il tasso di proliferazione (calcolato come CPD, "cumulative population doublings") della popolazione cellulare in seguito a microforatura del dente, valutando che le cellule isolate in coltura mantengono un tasso di proliferazione sovrapponibile alle cellule isolate dalla polpa dentale fresca (non criopreservata).

Al contrario, è stato dimostrato che il tasso di proliferazione delle cellule isolate da denti crioconservati interi (a cui non sono stati praticati i fori con il laser) è molto basso, sia in presenza che in assenza di criopreservante.

BIBLIOGRAFIA

1. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007 Feb 21;7:11.
2. Ambrosi G, et al. *Embriologia e organogenesi in Anatomia dell'uomo.* Edi. Ermes, Editor 2001: Milano.
3. Ballini A, De Frenza G, Cantore S, Papa F, Grano M, Mastrangelo F, Tete S, Grassi FR. In vitro stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007 Jan-Mar;20(1):9-16. Review
4. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epi-

- tope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 134-139.
5. Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol.* 1998;18:1866-1878.
 6. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105: 1663-1668.
 7. Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Ringdén O et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41
 8. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008 Jul 31;16:1-9. Review
 9. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem (Suppl.)* 1998; 30:297-303.
 10. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of stemness. *Exp Hematol* 2004;32:585-598.
 11. Camargo F, Finegold M, Goodel M. Hematopoietic mielomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners *J Clin Invest.* 2004; 113:1266-1270
 12. Campioni D, Lanza F, Moretti S, et al. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105+ and fibroblast + mesenchymal cells from acute myeloid leukaemia: implication for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy* 2003; 5: 66-79.
 13. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
 14. Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2003;5:79-88.
 15. Castro-Malaspina H, Gay Re, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301.

16. Cen H, Lin MF, Huang H, Cai Z. Monocytic differentiation of bone-marrow derived hematopoietic precursors controlled by mesenchymal stem cell in absence of exogenous hematopoietic growth factors (in process) *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. 2004; 37(2):139-144
17. Cilloni D, Carlo-Stella C, Falzetti F, et al. Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2000; 96:3637-3643.
18. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9.
19. D'Amario M, Maggiore C, Luciani L, Baldi M, D'Alessandro A, Lelli S, Giannoni M. Potenzialità delle cellule staminali adulte in odontoiatria. *Dental Cadmos* 2008;76(7):33-42.
20. D'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jul 15;312B(5):408-15.
21. David C. Colter, Reiner Class, Carla M. DiGirolamo, and Darwin J. Prockop. Rapid Expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS* 2000; 97: 3213-3218.
22. De Coppi P, Bartsch G, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy *Nature Biotechnology* 2007; Vol. 25 number 1.
23. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hem* 2000; 28: 875-884
24. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002; 20:205-214.
25. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J*. 2008 Aug;34(2):52-67

26. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292(5819): 154-6.
27. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1737–40.
28. Fauza D. Amniotic fluid and placenta stem cells *Best Practice & Research* 2004;18:877-891
29. Friedestein AJ., Gorskaja JF., Kulagia NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hemopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-274.
30. Gioventù S. , Andriolo G. , Bonino F. , Frasca S. , Lazzari L. , Montelatici E. , Santoro F. , Rebullia P. A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfusion and Apheresis Science* (2012): 3-8
31. Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002;8:607-612
32. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009-1014.
33. Gronthos S et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13625-30 2000)
34. Gronthos S, et al - Human dental pulp stem cells: characterization and developmental potential. *Adult Stem Cells*. Humana Press Inc. pp. 67–82. 2004
35. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* (2001);189:54-63.
36. Gronthos S, Zanettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesisidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003 116:1827-1835
37. Hansen-Smith FM, Carlson BM. Cellular responses to free grafting of the digitorum longus muscle of the rat. *J. Neurol. Sci.* 1979; 41(2): 149-173.

38. Harvey C, Jan Thorsen S, Arun KG. Beyond the Vernacular: New Sources of Cells for Bone Tissue Engineering. *Plast Reconstr Surg* 2007; 122:755.
39. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S745-S753.
40. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. The International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395.
41. Huang AH, Chen YK, Chan AW, Shieh TY, Lin LM Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy.. *J Endod.* 2009 May;35(5):673-81
42. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent.* 2008 Jun;36(6):379-86. Epub 2008 Apr 16. Review
43. Huang S, Terstappen LWMM. Formation of hematopoietic microenvironment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992; 360: 745
44. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13475-80.
45. Ikeda E, Tsuji T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Jun;8(6):735-44.
46. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen Med.* 2009 May;4(3):377-85.

47. Jackson L., Jones DR, Scotting P., Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53: 121-126.
48. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004; 32: 414-425.
49. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow . *Nature* 2002; 418: 41-49.
50. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 2007 Apr;13(4):767-73
51. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006;184(3-4):105-16
52. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128: 5181-5188.
53. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Mar;67(3):501-6
54. Krampera M, Pasini A, Rigo A, et al. HB-EGF/HER-1 signalling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood* 2005; 106: 59-66.
55. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med.* 1996;2:1329-1337
56. Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14: 311-324.
57. Lee UL, Jeon SH, Park JY, Choung PH. Effect of platelet-rich plasma on dental stem cells derived from human impacted third molars. *Regen Med.* 2011 Jan;6(1):67-79.

58. Lindvall O. Parkinson disease. Stem cell transplantation. *Lancet*. 2001;358:Suppl:S48.
59. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation . *Nat Rev Cancer* 2002;2:231-238.
60. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003; 10: 228-241.
61. Mao JJ. Stem cells and the future of dental care. *N Y State Dent J*. 2008 Mar;74(2):20-4
62. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, Montanari M, Tazzari PL, Ricci F, Pasquinelli G, Orrico C, Grossi A, Prati C, Bagnara GP Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009 Jul-Sep;22(3):699-706. PMID: 19822086
63. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-520.
64. Mirandola S, Realdon S, Iqbal J, Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, Marcolongo M, Vario A, Datz C, Hussain MM, Alberti A. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology*. 2006; 130(6): 1661-1669.
65. Morsczech C, Frerich B, Driemel O. Dental stem cell patents. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2009;3(1):39-43.
66. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005);25:2542-2547.
67. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95:379-391.

68. Noort WA, Kruisselbrink AB, Fibbe WE, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Haematol.* 2002; 30: 870-8.
69. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001;19:193-204.
70. Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development.* 1996; 122(8): 2339-48.
71. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 1997; 8(6): 389-404.
72. Parolini O, Alviano F, Bergwerf I et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev.* 2009 Nov 30.
73. Pasquinelli G, Pacilli A, Alviano F, Foroni L, Ricci F, Valente S, Orrico C, Lanzoni G, Buzzi M, Tazzari PL, Pagliaro P, Stella A, Bagnara GP. Multidistrict human mesenchymal vascular cells: pluripotency and stemness characteristics. *Cytotherapy.* 2010.
74. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, Hockema JJ, Woods EJ, Goebel WS. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008 Jun;14(2):149-56.
75. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;80(6):836-42
76. Piernella S, Sherjon SA, Fibbe WE. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22:1338-1345.

77. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143-7.
78. Poloni A, Leoni P, Buscemi L, et al. Engraftment capacity of mesenchymal cells following hematopoietic stem cell transplantation in patients receiving reduced intensity conditioning regimen. *Leukemia*. 2006; 20:329-35.
79. Poloni A, Rosini V, Mondini E, Maurizi G, et al. Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*. 2008; 10:690-697.
80. Prockop DJ. Marrow stromal cell as stem cells for nonhemopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
81. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001; 344: 385–386.
82. Rehman J, Li J, Orschell CM, March K. Peripheral blood Endothelial Progenitor Cells are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* . 2003; 107:1164-1169
83. Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex-vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98:2615-2625.
84. Rizzo R, Campioni D, Stignani M, Melchiorri M, Bagnara GP, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Moretti S, Cuneo A, Lanza F, Baricordi OR A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells *Cytotherapy* 2008; 10(4):364-75. PMID: 18574769
85. Roda B, Reschiglian P, Alviano F, Lanzoni G, Bagnara GP, Ricci F, Buzzi M, Tazzari PL, Pagliaro P, Michelini E, Roda A. Gravitational field-flow fractionation of human hemopoietic stem cells *J Chromatogr A*. 2009 Dec 25;1216(52):9081-7. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19647835

86. Rosfjord E, Rizzino A. The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;203:1795-1802.
87. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 1973–87.
88. Scholer HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* 1989;8:2543-2550.
89. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 2002; 109(10): 1291-302.
90. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal human mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18:696-704
91. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988;336:688-690.
92. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, Kucerová L. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2007;50(3):195-201
93. Sumita Y, Tsuchiya S, Asahina I, Kagami H, Honda MJ. The location and characteristics of two populations of dental pulp cells affect tooth development. *Eur J Oral Sci.* 2009 Apr;117(2):113-21
94. Takara N, Priest RE, Priest JH *et al.* .Estrogen production by cultured amniotic fluid cells. *Clin Res* 1982; 30:888.
95. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, Miyaki S, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res.* 2008 Jul;87(7):676-81

96. Tavian M, Pèault B. Embryonic development of the hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 2005; 49:243-250.
97. Tavian M, Pèault B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Experimental Hematology* 33(2005); 1062-1069.
98. Thomson EM. Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. *Reprod Nutr Dev* 1996;36:619-635.
99. Till JE, McCollough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-222.
100. Tran-Hung L, Tran-Thi N, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M. A new method to extract dental pulp DNA: Application to universal detection of bacteria. *PLoS ONE* 2007;2(10):1-8.
101. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews : Immunology* 2008 8: 726-736.
102. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, et al. Heterogeneity among human bone marrow derived mesenchymal stem cells and neural progenitors. *Haematologica* 2003; 88 : 126-132.
103. Wang M, Crisostomo P, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2006);291:880-884.
104. Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol.* 2007 Jun;5(6):e159
105. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 2001;22:149-164.
106. Woodbury D, Shwartz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-370.

107. Yamazaki H, Tsuneto M, Yoshino M, Yamamura K, Hayashi S. Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells*. 2007 Jan;25(1):78-87. Epub 2006 Aug 31
108. Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A Journey from Dental Pulp Stem Cells to a Bio-tooth. *Stem Cell Rev*. 2010 May 27.
109. Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008 Jan;331(1):359-72. Epub 2007 Oct 16. Review
110. Zeng Q, Li X, Beck G, et al. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro. *Bone* (2007);40:374-381.
111. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*. 2006 Oct;12(10):2813-23