



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONE E SALUTE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

CICLO XXV

**PROGETTAZIONE E SVILUPPO DI SCAFFOLDS NATURALI
PER LA RIGENERAZIONE OSSEA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Isola

Supervisore: Ch.mo Prof. Maurizio Isola

Dottorando: Luca Finotti

Indice generale

INTRODUZIONE	1
1. INNESTO OSSEO	3
1.1 CARATTERISTICHE DELL'INNESTO OSSEO.....	3
1.2 TIPOLOGIE DI INNESTO OSSEO.....	7
1.2.1 INNESTI AUTOLOGHI.....	8
1.2.2 INNESTI ETEROLOGHI.....	9
1.2.3 INNESTI SINTETICI.....	12
2. TECNICHE DI DECELLULARIZZAZIONE	16
2.1 METODI FISICI	17
2.2 CONGELAMENTO/SCONGELAMENTO.....	17
2.3 FREEZE-DRY	18
2.4 AGITAZIONE MECCANICA	18
2.5 TRATTAMENTO TERMICO.....	19
2.6 METODI ENZIMATICI.....	19
2.7 METODI CHIMICI	20
3. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	22
3.1 ISOLAMENTO E CULTURA MSCs	24
3.2 CARATTERIZZAZIONE IMMUNOFENOTIPICA DELLE MSCs	26
3.3 APPLICAZIONI CLINICHE DELLE MSCs.....	27
4. SCOPO DELLA TESI	31
5. MATERIALI E METODI	33
5.1 CAMPIONAMENTO DELL'INNESTO OSSEO.....	33
5.2 DECELLULARIZZAZIONE DEI CAMPIONI.....	33
5.2.1 FASE DI CONGELAMENTO	33
5.2.2 FASE DI SCONGELAMENTO	35
5.3 TEST DI PROLIFERAZIONE MTT.....	35
5.4 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).....	36
5.5 PRODUZIONE DI CELLULE STAMINALI ADULTE DA TESSUTO ADIPOSO (ADSCs)	37
5.5.1 ISOLAMENTO DELLE ADSCs.....	37
5.5.2 AMPLIFICAZIONE E SEMINA DELLE ADSCs.....	38
5.6 ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE REAL TIME-PCR.....	38
5.7 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI RNA.....	39
5.8 SINTESI DEL DNA COMPLEMENTARE (cDNA).....	40
5.8.1 QUANTIFICAZIONE DEL cDNA MEDIANTE RT-PCR.....	41
5.8.2 AMPLIFICAZIONE DEL cDNA	42

5.9 TEST IN VIVO	44
5.9.1 PROCEDURA ANESTESIOLOGICA.....	46
5.9.2 TECNICA CHIRURGICA	47
5.9.2.1 POSIZIONAMENTO	47
5.9.2.2 PREPARAZIONE DEL CAMPO CHIRURGICO.....	47
5.9.2.3 ACCESSO CHIRURGICO.....	48
5.9.3 TRATTAMENTO POST-OPERATORIO	52
5.9.4 EUTANASIA DEGLI ANIMALI ED ESTRAZIONE DEI CAMPIONI DI MATRICE OSSEA	52
5.9.5 ALLESTIMENTO DEI PREPARATI ISTOLOGICI	53
6. RISULTATI	55
6.1 PROTOCOLLI DI DECELLULARIZZAZIONE	55
6.2 TEST DI PROLIFERAZIONE MTT	58
6.3 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).....	64
6.4 ANALISI IN VITRO	64
6.4.1 PROLIFERAZIONE ADSCs.....	64
6.4.2 ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE RT-PCR.....	65
6.5 ANALISI ISTOLOGICA DEI CAMPIONI	66
6.5.1 XENOGRAFT BOVINO A 15 GIORNI.....	67
6.5.2 BIO-OSS® A 15 GIORNI	68
6.5.3 XENOGRAFT BOVINO A 30 GIORNI.....	69
6.5.4 BIO-OSS® A 30 GIORNI	70
6.5.5 XENOGRAFT BOVINO A 60 GIORNI.....	71
6.5.6 BIO-OSS® A 60 GIORNI	72
7. DISCUSSIONE	73
8. CONCLUSIONI.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	79

Introduzione

Da anni la medicina rigenerativa si concentra sullo studio e la ricerca di biomateriali, naturali o sintetici, in grado di mimare le caratteristiche fisiche del tessuto ricevente e di velocizzarne la guarigione. Una scrupolosa conoscenza delle qualità biologiche del tessuto danneggiato è di fondamentale importanza per la creazione di nuovi biomateriali che dovranno essere contraddistinti da: una elevata biocompatibilità con il sito ricevente, per innescare processi infiammatori che potrebbero ritardare o addirittura bloccare il processo riparativo del tessuto lesionato; una spiccata biodegradabilità e quindi facilmente rimpiazzabili dalle nuove cellule prodotte dal sito ricevente; facilità di utilizzo da parte chirurgo e costo ridotto (Albrek T. *et al.*, 2001; Bianchi G. *et al.*, 2001; Di Bello C. *et al.*, 2009). In odontostomatologia da anni si impiegano biomateriali, per il trattamento di edentuliti parziali o totali in tutti i soggetti affetti da atrofia ossea e pneumatizzazione dell'osso mascellare (Smiller D.G. *et al.*, 1992). L'intervento prevede la sostituzione dei denti mancanti mediante

l'implantologia. L'inserimento di protesi osteointegrate deve pertanto tener conto della quantità e della qualità dell'osso nel quale verrà posizionato l'impianto; infatti la mancanza di un adeguato spessore di osso alveolare potrebbe impedirne il corretto posizionamento pregiudicandone la stabilità nel tempo (Chen X.L. *et al.*, 2007; Ogunsalu C., 2011); l'osteoinnesto per il rialzo del seno mascellare consente un efficace ripristino della quantità di osso sufficiente a garantire l'osteointegrazione dell'impianto (Pettinicchio M. *et al.*, 2010; Haas R. *et al.*, 2002). In ambito ortopedico e traumatologico si ricorre spesso all'utilizzo di innesti ossei, naturali o sintetici, per il trattamento di patologie o gravi eventi traumatici, che comportano una importante perdita di matrice ossea del soggetto (Bauer T.W. *et al.*, 2000), come per esempio: in presenza di unioni ritardate o non unioni; durante l'esecuzione di una artrodesi; di fronte a fratture scheggiose e comminute complesse (Keating J.F. *et al.*, 2008; Kuzyk P.R.T. *et al.*, 2010); in gravi fratture a carico dell'osso mandibolare e mascellare, che potrebbero pregiudicare la stessa vita del paziente se non si dovessero risolvere rapidamente (Pettinicchio M. *et al.*, 2010); nel trattamento di cisti ossee, capaci di creare cavità all'interno dell'osso; nella gestione di tumori dell'apparato scheletrico, caratterizzati da foci osteolitici che nel corso del tempo si ampliano erodendo gran parte del segmento osseo colpito (Lucroy M.D., 1999; De Vicente J.C. *et al.*, 2010). Attualmente in commercio

esistono numerosi biomateriali che vengono ampiamente applicati in campo medico. La scelta è molto importante ai fini della riuscita dell'intervento chirurgico e deve tener conto di diversi fattori quali: un attento studio della natura e del tipo di lesione; analisi delle caratteristiche del sito ricevente; tipologia di innesto osseo da impiegare (autologo o eterologo; naturale o sintetico); conoscenza e confronto delle caratteristiche di osteoconduttività, osteoinduttività ed osteogenesi tipiche di ogni biomateriale (Albrek T. *et al.*, 2001; Di Bello C. *et al.*, 2009; Keating J.F. *et al.*, 2008).

1. INNESTO OSSEO

1.1 CARATTERISTICHE DELL'INNESTO OSSEO

L'innesto osseo è in grado di promuovere la guarigione del tessuto danneggiato mediante tre tipi di attività: **osteoconduttività**, **osteoinduttività** e **attività osteogenica** (Albrek T. *et al.*, 2001). Lo scaffold osseo ideale dovrebbe presentare tutte e tre queste importanti caratteristiche per ottimizzare e velocizzare i processi riparativi dell'osso.

L'osteoconduttività è la capacità dell'innesto osseo di consentire l'adesione superficiale e l'infiltrazione al suo interno di cellule ossee progenitrici e di cellule endoteliali. Il difetto viene invaso da una nuova rete vascolare attraverso canali ossei già esistenti o neoformati dai capillari stessi, che porta con sé osteoclasti ed osteoblasti (Albrek T. *et al.*, 2001). Gli

osteoclasti si dirigono verso gli apici del sito danneggiato in modo da eliminare e rimodellare il tessuto osseo necrotico, mentre gli osteoblasti si dispongono in lamelle concentriche lungo il decorso dei vasi per deporre nuova matrice ossea. I processi di deposizione ossea e di rimodellamento sono lenti e possono superare i dodici mesi, ma i tempi di riparazione possono essere accorciati quando si utilizza un biomateriale (Albrek T. *et al.*, 2001; Bianchi G. *et al.*, 2001).

L'osteoaduttività è la capacità del biomateriale di indurre, attraverso specifici segnali biologici, la differenziazione di cellule locali o trapiantate, in osteoblasti maturi. Lo stimolo differenziativo viene dato primariamente dalle caratteristiche morfologiche dell'innesto (rugosità di superficie, macroporosità, microarchitettura del materiale), dalla capacità di mimare l'habitat cellulare ideale per la crescita cellulare e dalla differenziazione osteoblastica (Albrek T. *et al.*, 2001; Di Bello C. *et al.*, 2009). Le capacità osteoaduttive di un biomateriale possono essere potenziate utilizzando fattori di crescita, proteine che riescono a legarsi a specifici recettori di membrana in grado di influenzare la differenziazione, la proliferazione e la crescita cellulare (Di Bello C. *et al.*, 2009). I fattori di crescita ossei più utilizzati sono:

- ***Bone Morphogenic Proteins (BMP)***: scoperte negli anni Sessanta del Novecento da Pierre Lacroix. sono omodimeri di circa 120 residui amminoacidici (di cui 7 cisteine aventi ponti –SH che ne conferiscono l'attività biologica) e divisi in 15 sottogruppi. Il sottogruppo **BMP-2**, in particolare, accelera i processi di calcificazione nelle lesioni ossee. Purtroppo però le BMP-2 si degradano molto rapidamente, sono molto costose e difficilmente reperibili (Di Bello C. *et al.*, 2009; Bauer T.W. *et al.*, 2000).
- ***Insulin Growth Factors I-II (IGF I-II)***: sono formati da circa 70 amminoacidi e presentano un 60% di somiglianza con la pro-insulina (da qui il loro nome). Le IGF I-II, principalmente prodotte dagli osteoblasti, sono importanti fattori di crescita che stimolano la produzione di collagene facilitando l'ossificazione intramembranosa (Bauer T.W. *et al.*, 2000).
- ***Fibroblast Growth Factors (FGFs)***: sono fattori di crescita prodotti principalmente dagli osteoblasti, coinvolti nella riparazione e nella neovascolarizzazione del tessuto osseo (Di Bello C. *et al.*, 2009; Bauer T.W. *et al.*, 2000).
- ***Trasforming Growth Factors Beta (TGFs)***: prodotte dagli osteoblasti, appartengono alla stessa famiglia delle BMP (fatta

eccezione delle BMP-1), e vanno a regolare la trascrizione genica per la proliferazione cellulare e per la formazione di matrice ossea extracellulare (Albrek T. *et al.*, 2001; Alexander J.W., 1976).

L'attività osteogenica è la capacità del biomateriale di promuovere la produzione di nuova matrice ossea per mezzo di cellule ossee vitali oppure attraverso l'utilizzo di cellule progenitrici , come per esempio le cellule staminali mesenchimali (MSCs), contenute all'interno dell'innesto stesso (Albrek T. *et al.*, 2001).

L'osteoconduttività è una proprietà sempre presente in tutti gli innesti ossei, mentre l'osteoinduttività e l'attività osteogenica variano notevolmente in funzione del tipo di biomateriale che si considera e dalla sua combinazione con cellule o fattori di crescita (Alexander J.W., 1976; Keating J.F. *et al.*, 2008).

I biomateriali vengono progettati per riprodurre sia *in vitro* che *in vivo* il tessuto che dovranno sostituire ed è per questo motivo che uno scaffold deve possedere determinate caratteristiche quali:

- **Biocompatibilità:** il biomateriale innestato deve essere inerte e non deve in alcun modo creare danno all'organismo;

- **Biodegradabilità:** una volta che il processo di guarigione si è innescato, il biomateriale deve degradarsi in modo tale da essere sostituito dal nuovo tessuto prodotto dall'ospite stesso;
- **Attività antigenica:** un ottimo biomateriale non dovrebbe mai innescare alcun tipo di risposta infiammatoria nel sito ricevente perché questo si tradurrebbe in un'assente o ritardata guarigione;
- **Maneggevolezza:** i biomateriali non dovrebbero essere troppo delicati o di difficile inserimento nel sito ricevente perché potrebbero complicare il lavoro del chirurgo;
- **Costi accessibili:** le spese di produzione e di vendita troppo elevati di un biomateriale, che rappresentano una barriera importante al loro utilizzo in medicina umana, lo sono ancor di più in ambito veterinario (Di Bello C. *et al.*, 2009).

1.2 TIPOLOGIE DI INNESTO OSSEO

Gli scaffold ossei possono essere **naturali** o **sintetici**, cioè prodotti in laboratorio con lo scopo di ricreare le caratteristiche dell'osso (*alloplast*) (Haas R. *et al.*, 2002). I primi si suddividono a loro volta in innesti ossei **autologhi** (*autograft*) ed **eterologhi** (*allograft* e *xenograft*) (Di Bello C. *et al.*, 2009).

1.2.1 INNESTI AUTOLOGHI

Gli innesti ossei autologhi sono biomateriali naturali (osso spongioso, cortico-spongioso e corticale), ricavati dallo stesso donatore che riceverà il trapianto di matrice ossea in una sede diversa da quella di prelievo.

I siti di prelievo maggiormente impiegati in campo veterinario sono: la spina iliaca dorso-craniale dell'ala dell'ileo, il tubercolo maggiore dell'omero e la cresta tibiale; in odontostomatologia umana si ricorre invece al mento, al corpo e ai rami mandibolari, al processo zigomatico e ad esostosi come il *tori orale* (Lucroy M.D., 1999; Haas R. *et al.*, 2002).

L'**autograft** è considerato il “*gold standard*” in tutte le tecniche chirurgiche che richiedono un osteoinnesto. Le sue proprietà osteoconduttive, osteoinduttive ed osteogeniche sono eccellenti, in quanto il materiale osseo prelevato è ricco di fattori di crescita e di cellule vitali, capaci di innescare i processi di guarigione dell'osso. Inoltre, l'impiego di materiale autologo non innesca alcun tipo di risposta immunologica da parte del soggetto, evitando il rigetto e la potenziale trasmissione di malattie infettive (Sanz-Herrera J.A. *et al.*, 2010; Sciadini M.F. *et al.*, 2000).

L'*autograft* presenta però un grosso limite al suo utilizzo legato al fatto che la quantità di tessuto osseo che si può prelevare dal paziente è molto limitata; inoltre per ottenere l'*autograft* il paziente deve essere sottoposto a

due interventi chirurgici nella stessa sessione, incrementando notevolmente il livello di morbilità ed il dolore postoperatorio (Cancedda R. *et al.*, 2007). Per le ragioni sopramenzionate, l'impiego di un innesto osseo autologo è possibile solo in quei casi dove la perdita di matrice ossea è di modesta entità. Anche le condizioni generali di salute del soggetto e soprattutto la sua età possono alterare negativamente l'osteoaduttività e l'osteogenicità dello scaffold: infatti un soggetto giovane ed in buona salute presenterà un maggior numero di cellule osteoprogenitrici e di fattori di crescita rispetto ad un soggetto anziano (Sanz-Herrera J.A. *et al.*, 2010; Cancedda R. *et al.*, 2007).

1.2.2 INNESTI ETEROLOGHI

Gli innesti **eterologhi** si suddividono in *allograft*, quando il donatore ed il ricevente appartengono alla stessa specie, e **xneograft** quando donatore e ricevente appartengono a specie diverse (Van Heest A. *et al.*, 1999). A differenza di quanto accade per gli *autografts*, la matrice extracellulare (ECM) degli innesti eterologhi è ricca di cellule che presentano sulla loro superficie di membrana proteine che vengono riconosciute dall'organismo del ricevente come non *self* (Di Bello C. *et al.*, 2009). Il riconoscimento di antigeni non *self* da parte del ricevente attiva i fattori pro-infiammatori ed il reclutamento di cellule della linea bianca del sangue che confluiscono nel sito di innesto attaccando lo scaffold eterologo. Il processo flogistico così

innescato, ritarda la guarigione della lesione e, se dovesse persistere per lunghi periodi, comporterebbe la formazione di tessuto fibroso a discapito di quello osseo, e questo impedirebbe una corretta osteointegrazione dello scaffold eterologo (Bauer T.W. *et al.*, 2000). Pertanto, per ridurre al minimo l'antigenicità dello scaffold eterologo, è necessario sottoporlo a processi di decellularizzazione in modo tale da rimuovere la componente cellulare dalla matrice extracellulare (Stephen F.B. *et al.*, 2011).

L'*allograft*, dopo essere stato sottoposto a decellularizzazione, mantiene inalterata l'osteconduttività, perde in parte l'osteinduttività (mantiene le BMP-2), ma è privo di capacità osteogeniche (Haas R. *et al.*, 2002). Attualmente la principale fonte di *allografts* è costituito dalle banche dell'osso: strutture ospedaliere che recuperano tessuto osseo durante alcuni interventi ortopedici, oppure prelevandolo da cadaveri (entro 24 ore dal decesso) per poi renderlo disponibile in caso di necessità. La creazione delle banche dell'osso ha permesso al chirurgo di usufruire di grosse quantità di osso decellularizzato, cosa che non è possibile utilizzando gli scaffold autologhi, riducendo sia la morbilità che il dolore postoperatorio del soggetto sottoposto ad intervento chirurgico (Schaller O., 2007). Bisogna però considerare gli svantaggi legati all'impiego di questi materiali che sono:

- **Qualità degli scaffold:** le banche dell'osso stoccano materiale che deriva da differenti tipi di donatori (sesso, età, specie); questo implica che la qualità dell'osso e le proprietà osteoconduttive ed osteoinduttive non siano standardizzabili (McLaughlin R.M. *et al.*, 1998).
- **Tecniche di decellularizzazione:** non esiste un protocollo standard di decellularizzazione degli scaffold ossei e questo potrebbe variare molto la risposta infiammatoria del soggetto ricevente (McLaughlin R.M. *et al.*, 1998).
- **Trasmissione di infezioni:** l'utilizzazione di *bone grafts* che non hanno subito i giusti trattamenti di decellularizzazione e di sterilizzazione potrebbero trasmettere al paziente malattie virali come l'epatite B, l'HIV, il cimurro (in ambito veterinario), patologie ossee degenerative ed eventualmente anche cellule tumorali (Schaller O., 2007; McLaughlin R.M. *et al.*, 1998).

Gli *xenografts* sono innesti eterologhi dove il donatore ed il ricevente appartengono a specie diverse. La loro produzione e il loro stoccaggio non avviene in banche dell'osso come per gli *allografts*, ma è prerogativa di ditte specializzate (Haas R. *et al.*, 2002). Da molti anni la fonte animale principalmente utilizzata per la loro creazione è il bovino (*Bos taurus*) con

il nome commerciale di Bio-oss® (Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Switzerland), ma recentemente si sta diffondendo l'uso di tessuto osseo equino (*Equus caballus*) con la denominazione di Bioteck® (Bioteck S.p.A, Arcugnano -Vi-, Italy).

I vantaggi degli *xenografts* sono perfettamente sovrapponibili a quelli degli *allografts* con la differenza che le tecniche di produzione e di decellularizzazione sono standardizzate. L'uniformità di questi prodotti garantisce l'immissione sul mercato di prodotti aventi caratteristiche simili e comportamenti prevedibili. Questa tipologia di innesto può però diventare un'importante fonte di zoonosi (BSE nel caso di xenograft di osso bovino), anche se i processi di decellularizzazione e di sterilizzazione dovrebbero garantirne la sicurezza (Haas R. *et al.*, 2002).

1.2.3 INNESTI SINTETICI

Gli innesti sintetici sono biomateriali sintetizzati in laboratorio *ex novo* che mimano le caratteristiche del tessuto osseo. In commercio esistono molti prodotti impiegati nella rigenerazione ossea, e la ricerca scientifica sta contribuendo a crearne di nuovi. Essi devono rispettare le caratteristiche ideali di uno scaffold osseo, pertanto la loro progettazione è un processo lungo ed elaborato. La **rugosità di superficie**, la **macroporosità**, l'**ultrastruttura** e la presenza di **fattori di crescita** devono essere simili a quelle del tessuto osseo e facili da maneggiare da parte del chirurgo (Bauer

T.W. *et al.*, 2000; Di Bello C. *et al.*, 2009). Gli innesti sintetici sono indicati per ogni tipo di innesto, sono praticamente privi di qualsiasi rischio di reazioni immunitarie o da corpo estraneo, presentano tempi di guarigione brevi, sono privi di tossicità sistemica o locale, sono facilmente sterilizzabili e reperibili in commercio; inoltre possono essere utilizzati in associazione tra loro, oppure arricchiti con fattori di crescita e cellule staminali mesenchimali in modo tale da sopperire al non trascurabile svantaggio di non possedere attività osteogenica (Lucroy M.D., 1999; Haas R. *et al.*, 2002). Sono rappresentati essenzialmente dal **fosfato tricalcico**, dall'**idrossiapatite**, dal **solfo di calcio**, dall'**idrossido di calcio**, dai **biovetri** e dai prodotti a base di **polimeri**.

Il **fosfato tricalcico**, costituito da calcio e fosforo in rapporto 3:2, ha assunto negli ultimi anni una crescente considerazione grazie alla sua biocompatibilità e riassorbibilità. Se ne conoscono due fasi, α e β , che pur essendo identiche dal punto di vista chimico si comportano in maniera diversa dal punto di vista biologico. La **fase α** viene riassorbita lentamente e il materiale innestato è riconoscibile dall'osso ricevente anche a distanza di anni, mentre la **fase β** viene completamente riassorbita e sostituita da osso neoformato nell'arco di 8-12 mesi.

L'**idrossiapatite** (fosfato di calcio idratato), rappresenta uno dei costituenti principali del tessuto osseo e dei tessuti duri dei denti dei vertebrati e può essere ricavato da sostanze naturali come lo scheletro del corallo, estratta da osso bovino, oppure ottenuta attraverso un processo di sintesi a partire da sali di fosfato di calcio. Le varie forme dell'idrossiapatite presenti in commercio differiscono tra loro per la forma, solida o granulare, per la grandezza dei granuli e per il volume delle porosità presenti. La **forma granulare** compatta presenta una densità che supera il 65%, una bassa porosità, un'alta cristallinità e una bassissima percentuale di riassorbimento, mentre la **forma porosa** presenta una microstruttura haversiana simile a quella dell'osso con pori di diametro superiore ai 100 μm che favoriscono lo stabilirsi di una neovascolarizzazione ed un alto grado di riassorbimento. Esiste infine in commercio un'**idrossiapatite bifasica a riassorbibilità controllata**, costituita da idrossiapatite e fosfato tricalcico in diverse proporzioni. Man mano che il fosfato tricalcico viene riassorbito, l'idrossiapatite diventa più porosa ed una quota sempre maggiore entra a contatto con i tessuti ospiti favorendo un lento processo di sostituzione che si completa nell'arco di 4-5 anni (Chen X.L. *et al.*, 2007; Haas R. *et al.*, 2002; Pokorny J.J. *et al.*, 2003).

Il **solfo di calcio**, è un materiale a base di β -emidrato di solfato di calcio, prodotto calcinando gesso naturale a temperature di 110-130 °C. Presenta

un'ottima biocompatibilità, è facilmente modellabile e viene utilizzato sia come barriera per la rigenerazione ossea guidata, sia come vettore per proteine morfogenetiche.

I **biovetri** sono materiali costituiti per il 45% da silice (SiO_2), per il 24,5% da ossido di calcio (CaO), per il 24,5% da ossido di sodio (Na_2O) e per il 6% da ossido di fosforo (P_2O_5). Altamente biocompatibili ed osteoconduttivi, i biovetri stabiliscono con l'osso un legame chimico-fisico attraverso un film di Ca-P, scambiando con esso ioni o gruppi molecolari. Sono assolutamente non riassorbibili, non riuscendo gli osteoclasti ad eliminare i materiali a base di silicati, e permangono sotto forma di materia vetrosa estremamente solida.

Tra i vari prodotti a base di **polimeri** distinguiamo quelli costituiti da polimetilmetacrilato (PMMA) e poliidrossietilmetacrilato (PHEMA), come l'HTR, e quelli composti da copolimeri dell'acido polilattico e poliglicolico, come il SINTbone. Il **polimero HTR**, altamente biocompatibile, è costituito da uno strato profondo di polimetilmetacrilato, che gli conferisce le caratteristiche meccaniche, da uno strato intermedio di poliidrossietilmetacrilato, a cui si possono attribuire le caratteristiche di emostasi e di adesione, ed infine uno strato esterno di idrossido di calcio, responsabile della capacità osteoconduttiva, che rappresenta l'unica

componente riassorbibile del materiale. L'**acido polilattico** e l'**acido poliglicolico**, in varia composizione percentuale, sono i costituenti di molti prodotti attualmente in commercio utilizzati come dispositivi medici in campo chirurgico, odontoiatrico, maxillofacciale ed ortopedico. Questi polimeri sono biocompatibili e non citotossici e il loro tempo di degradazione, variabile da un minimo di 4 ad un massimo di 8 mesi, è strettamente correlato alla massa impiantata, alla reattività individuale, all'età del paziente, alla circolazione sanguigna della zona dell'innesto, oltre ai fattori fisici propri del materiale, quali la struttura chimica, la composizione, peso molecolare, la forma della superficie esposta, il grado di densità (Badylak S.F. *et al.*, 2011).

2. TECNICHE DI DECELLULARIZZAZIONE

Gli *allografts* e gli *xenografts*, essendo innesti provenienti da altri individui, non possono essere introdotti nel tessuto ricevente senza subire processi di decellularizzazione. Con il termine **decellularizzazione** si intende il procedimento mediante il quale avviene la rimozione cellulare da un organo o da un tessuto, riducendolo a sola matrice extracellulare (Urabe K. *et al.*, 2007). Attualmente in ingegneria tissutale esistono svariate tecniche di rimozione cellulare, suddivisibili in base alla metodica impiegata: esistono metodi fisici, enzimatici e chimici.

2.1 METODI FISICI

I metodi fisici comportano la distruzione meccanica della membrana cellulare, facilitando la rimozione delle cellule dalla matrice extra cellulare.

Tra i metodi fisici maggiormente impiegati vi è il congelamento/scongelo, il *freeze-dry*, l'agitazione meccanica ed i trattamenti ad elevate temperature (Urabe K. *et al.*, 2007).

2.2 CONGELAMENTO/SCONGELAMENTO

L'innesto eterologo viene congelato in acqua per un periodo di tempo variabile. L'acqua, a contatto con il materiale, penetra per gradiente osmotico all'interno delle cellule e congelando crea cristalli che rompono la membrana cellulare. Generalmente questa metodica comporta una buona decellularizzazione della matrice extracellulare (ECM), senza alterarne la struttura e senza distruggere i fattori di crescita tissutali normalmente presenti al suo interno. Uno dei problemi della decellularizzazione tramite congelamento/scongelo è la permanenza di materiale intracellulare sulla superficie dell'ECM dopo la rottura della membrana; pertanto, i detriti cellulari devono essere rimossi in un secondo momento attraverso lavaggi specifici. Questa metodica non prevede però un protocollo di impiego standardizzato in funzione del tempo e della temperatura di congelamento/scongelo, comportando una notevole variabilità

antigenica e di vitalità cellulare (Shafiei Z. *et al.*, 2009; Haas R. *et al.*, 1989).

2.3 FREEZE-DRY

Il *freeze-dry* è un processo di liofilizzazione attraverso il quale viene rimossa acqua da una sostanza congelata sotto vuoto; i cristalli di ghiaccio vengono eliminati sotto forma di vapore acqueo. Con questa tecnica le cellule vengono uccise perché private del loro principale componente, ovvero l'acqua (Hasirci V. *et al.*, 2001). L'allograft può essere sottoposto a questa procedura in una forma ancora mineralizzata (*freeze-dry bone allograft*, FDBA), oppure nella forma demineralizzata (*demineralized freeze-dry bone allograft*, DFBA). Tra le due tecniche la FDBA risulta essere la migliore per facilitare l'esposizione delle BMP-2 e quindi favorire l'osteoaduttività del biomateriale (Haas R. *et al.*, 2002). Questa tecnica di liofilizzazione non è standardizzata e questo comporta notevoli variazioni del numero di cellule vitali presenti all'interno dello scaffold. Il *freeze-dry* inoltre, può compromettere le caratteristiche strutturali del biomateriale, alterando l'osteoaduttività e l'osteoaduttività (Shafiei Z. *et al.*, 2009).

2.4 AGITAZIONE MECCANICA

L'agitazione meccanica può essere adottata come tecnica di decellularizzazione solo in combinazione con altre metodiche per la rimozione dei detriti cellulari, poiché singolarmente non garantirebbe un

risultato soddisfacente. L'agitazione meccanica può essere ottenuta impiegando uno “*shaker*” oppure un piatto magnetico; la velocità e il tempo di agitazione dipendono da diversi fattori: la quantità di reagenti, il volume della soluzione ed il tipo di matrice extra cellulare da trattare (Urabe K. *et al.*, 2007).

2.5 TRATTAMENTO TERMICO

L'elevata temperatura priva le cellule di tutta la loro componente acquosa provocandone la morte in seguito alla rapida disidratazione. Questa procedura comporta un eccellente abbattimento dell'antigenicità del biomateriale ma può comportare gravi alterazioni della matrice extracellulare; infatti il calore può denaturare le proteine coinvolte nei processi di adesione cellulare presenti sull' ECM, inibendo l'osteointegrazione (Kang J.S. *et al.*, 1995).

2.6 METODI ENZIMATICI

Le tecniche di decellularizzazione basate su metodi enzimatici prevedono l'utilizzo di catalizzatori biologici quali la tripsina e le endonucleasi.

La **tripsina** è un enzima proteolitico in grado di rompere i legami peptidici dell'arginina e della lisina alle loro estremità carbossi-terminali. Questa proteasi è normalmente presente a livello plasmatico e lungo il tratto digestivo, con un'attività ottimale a 37°C e a pH=8 (Urabe K. *et al.*, 2007).

La tripsina non altera il contenuto di glicosaminoglicani (GAGs) come

invece accade per i metodi chimici, ma ha un'azione molto forte sulle proteine dell'ECM ossea, in particolare sulle fibre collagene e sull'elastina, pertanto deve essere utilizzata con molta cautela per non denaturare la struttura della matrice extra cellulare. Per ottenere un'elevata decellularizzazione con questo sistema bisognerebbe incubare l'innesto eterologo a contatto con la proteasi per lunghi periodi, pertanto viene impiegata in associazione ad altre metodiche (Haas R. *et al.*, 1989).

Le **nucleasi** (endonucleasi ed esonucleasi), degradano l'RNA e il DNA idrolizzando in punti diversi i legami ribonucleotidici e deossiribonucleotidici: le **endonucleasi** tagliano i legami interni degli acidi nucleici, mentre le **esonucleasi** spezzano i legami terminali. La morte cellulare avviene a causa dell'incapacità della cellula di sintetizzare le proteine. E' importante che gli enzimi impiegati per decellularizzare l'ECM dell'innesto eterologo vengano rimossi al termine della procedura, poiché potrebbero provocare risposte immunitarie, anche gravi, da parte del tessuto ricevente (Urabe K. *et al.*, 2007).

2.7 METODI CHIMICI

L'efficacia dei metodi chimici dipende molto dal tipo di ECM che si vuole decellularizzare, dalla sua struttura, dalla cellularità, dalla sua densità e dal contenuto lipidico.

Gli **acidi** e le **basi** promuovono le degradazioni idrolitiche della membrana cellulare e degli acidi nucleici provocando la morte cellulare. I più impiegati sono: l'**acido acetico**, l'**acido peracetico**, l'**acido solforico** e l'**idrossido di ammonio** (Haas R. *et al.*, 1989).

I **detergenti ionici** e quelli **non ionici** abbassano la cellularità dello scaffold solubilizzando le membrane cellulari e dissociando il DNA dalle proteine. Tra i detergenti ionici maggiormente impiegati vi sono il **sodio dodecil-solfato** (SDS) e il **sodio deossicolato**: il primo ha un'ottima attività decellularizzante ma diminuisce in modo importante il contenuto di glicosaminoglicani della matrice extracellulare, alterando la struttura del collagene; il secondo invece ha una attività simile, ma la degenerazione della matrice che crea è nettamente superiore a quella prodotta dal sodio dodecil-solfato. Il **Triton X-100** è un detergente non ionico che inibisce i legami lipide-proteina e lipide-lipide, ma non quelli tra proteina e proteina. Ha un ottima efficacia sui tessuti molto spessi come quello osseo e determina alterazioni della matrice extracellulare meno ingenti rispetto ai detergenti ionici (Haas R. *et al.*, 1989).

Gli **agenti chelanti** come l'**EDTA** e l'**EGTA** creano strutture ad anello, che legano ed isolano ioni metallici (calcio e magnesio) coinvolti nel processo di adesione cellulare al substrato proteico (integrine) della matrice

extracellulare. Generalmente gli agenti chelanti non sono dotati di buone capacità decellularizzanti, pertanto devono essere associati ad altre metodiche, come quelle enzimatiche. E' importante assicurarsi della totale eliminazione del composto chimico al termine del protocollo, in quanto la permanenza sulla superficie della matrice extracellulare potrebbe provocare gravi reazioni tossiche (Urabe K. *et al.*, 2007).

3. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono precursori non ematopoietici, inizialmente isolati dal midollo osseo come elementi aderenti, altamente proliferanti, dotati di potenziale di *self-renewal* a lungo termine, e di differenziazione multilineare in diversi tessuti di origine mesenchimale (Friedenstein A.J. *et al.*, 1976; Jiang Y. *et al.*, 2002). Queste caratteristiche, assieme alla facilità di isolamento, coltivazione e al loro elevato potenziale di espansione *ex vivo*, ne fanno una interessante risorsa utilizzabile in una vasta gamma di applicazioni cliniche, nel contesto della terapia cellulare e genica ed in medicina rigenerativa (Minguell J.J. *et al.*, 2001). Le MSCs si differenziano verso il terzo mese di gestazione e derivano dal mesoderma (foglietto embrionale intermedio), da cui originano i tessuti connettivi di tutto l'organismo. 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 principalmente il supporto strutturale. 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 (Ambrosi G. *et al.*, 2001). Durante lo sviluppo embrio-fetale ci sono cellule che si distribuiscono nei vari distretti corporei e persistono nell'adulto come riserva per la riparazione e la rigenerazione tissutale (Dennis J.E. *et al.*, 2002). Le MSCs sono in grado di differenziarsi non solo in tessuti di origine mesenchimale, tra cui stroma midollare, tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo e muscolare scheletrico, mesoderma viscerale e cellule endoteliali (Friedenstein A.J. *et al.*, 1976; Jiang Y. *et al.*, 2002), ma anche in cellule di origine non-mesodermica quali neuroni, cellule epiteliali di cute e tubo digerente, fegato e polmone (Reyes M. *et al.*, 2001; Kotton D.N. *et al.*, 2001). Le MSCs si distinguono rispetto ad almeno altri due tipi cellulari. Il primo è costituito dalle ***multipotent adult progenitor cells*** (MAPCs), elementi in grado di differenziarsi *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 ***multipotent mesenchymal stromal cells*** (MMSC) che hanno capacità differenziativa

multilineare, limitata ai soli tessuti di origine mesodermica (tessuto adiposo, osso, cartilagine, muscolo) (Horwitz E.M. *et al.*, 2005).

3.1 ISOLAMENTO E CULTURA MSCs

Due principali problematiche limitano l'utilizzo di MSCs da midollo osseo: la procedura invasiva del prelievo di midollo e l'esiguo numero di cellule staminali che si ottengono da ogni prelievo (Harvey C. *et al.*, 2007). Per questo sono state cercate fonti alternative come i tessuti fetali ed il tessuto adiposo (Friedestein A.J. *et al.*, 1976; Jiang Y. *et al.*, 2002). Il tessuto adiposo rappresenta una ricca risorsa di cellule staminali mesenchimali adulte (ADSCs), che costituiscono una popolazione cellulare pluripotente la quale può differenziarsi in cellule di vari tessuti derivati dalla linea mesodermica (cellule del tessuto osseo, adiposo, cartilagineo, cardiaco e muscolare) e non mesodermica (cellule neuron-like, cellule endoteliali, epatociti, cellule pancreatiche). Dai dati di bibliografia, le MSCs isolate da midollo osseo e tessuto adiposo non mostrano differenze (Horwitz E.M. *et al.*, 2005). Dalla **frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo** è infatti possibile estrarre cellule staminali, che presentano caratteristiche fenotipiche e plastiche simili alle cellule staminali mesenchimali estratte da midollo osseo (Gronthos S. *et al.*, 2001; Martini I. *et al.*, 1997). Il tessuto adiposo può essere facilmente prelevato durante alcune chirurgie plastiche estetiche, oppure durante chirurgie addominali che permettono di

raggiungere con facilità il grasso omentale (Martini I. *et al.*, 1997). Per ottenere l'isolamento delle MSCs, il campione di lipoaspirato deve essere immerso in un medium standard come il *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), successivamente digerito attraverso specifiche collagenasi e poi centrifugato. La centrifugazione permette di separare il materiale non digerito dal pellet cellulare formato dalle MSCs e da eritrociti. Le cellule vengono nuovamente immerse in DMEM, seminate su piastra o fiaschette ed incubate a 37°C al 5% di CO₂. Le cellule staminali aderiscono bene su plastica, quindi già dopo due giorni possono essere eliminati i globuli rossi rimasti in superficie, evidenziando la presenza di foci di proliferazione cellulare (*Fibroblast colonyforming-units*, FCU-F) (Martini I. *et al.*, 1997). Trascorse 3-5 settimane le FCU-F creano una popolazione cellulare omogenea capace di proliferare senza differenziarsi spontaneamente fino a 40 generazioni. La proliferazione delle MSCs da tessuto adiposo può essere stimolata da molti supplementi esogeni tra i quali ricordiamo il *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) (Chiou M. *et al.*, 2006; Lennon D.P. *et al.*, 2000). Le MSCs da tessuto adiposo secernono inoltre alcuni fattori di crescita, come il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), l'*hepatocyte growth factor* (HGF), l'FGF 2, ed *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) (Nakagami H. *et al.*, 2005; Rehman J. *et al.*, 2004); i quali possono essere aumentati tramite l'esposizione delle cellule all'ipossia

(Rehman J. *et al.*, 2004), a fattori di crescita, a fattori di differenziazione (Zeng Q. *et al.*, 2007), oppure a *tumor necrosis factor- α* (Wang M. *et al.*, 2006).

3.2 CARATTERIZZAZIONE IMMUNOFENOTIPICA DELLE MSCs

La caratterizzazione fenotipica delle MSCs, data la mancanza di un marcatore specifico per l'analisi e l'isolamento, lascia ancora ampio spazio alla ricerca (Campioni D. *et al.*, 2003; Gronthos S. *et al.*, 2001); 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 (Gronthos S. *et al.*, 2001), come il CD45, il CD34 ed il CD14, e l'espressione di una serie di molecole di superficie, come il CD90, il CD105 (Barry F.P. *et al.*, 1999), 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 comuni a tutte le MSCs prodotte dall'organismo, indipendentemente dalle fonti utilizzate: midollo osseo, grasso, sangue periferico o tessuti fetali (Horwitz E.M. *et al.*, 2005; Majumdar M.K. *et al.*, 2003; Vogel W. *et al.*, 2003).

3.3 APPLICAZIONI CLINICHE DELLE MSCs

Il potenziale differenziativo e l'effetto immunoregolatore delle MSCs suggeriscono un possibile impiego di queste cellule in vari ambiti clinici (Bonassar L.J. *et al.*, 1998; Griffith L.G. *et al.*, 2002). Ormai è chiaro come le MSCs presentino spiccate proprietà immunoregolatrici.

Le cellule staminali mesenchimali sono capaci di sopprimere reazioni immunitarie sia *in vitro* che *in vivo* in modo indipendente dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) (Krampera M. *et al.*, 2005; Krampera M. *et al.*, 2003), attraverso un meccanismo che coinvolge l'inibizione paracrina della proliferazione delle cellule T e B. E' stato dimostrato nel babuino che le MSCs prolungano in modo significativo la sopravvivenza di trapianti cutanei incompatibili dal punto di vista del complesso maggiore di istocompatibilità (Li Y. *et al.*, 2000). Studi nell'animale hanno dimostrato che l'infusione di cellule staminali mesenchimali facilita l'attecchimento del trapianto di cellule staminali emopoietiche, incrementando la mielopoiesi e la piastrinopoiesi (Bolanos-Meade J. *et al.*, 2006; Noort W.A. *et al.*, 2002).

Studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità di differenziarsi in senso osseo delle MSCs, quindi sono stati fatti diversi tentativi di espandere le MSCs al fine di riparare *in vivo* alcuni difetti ossei (Barry F.P. *et al.*, 2001; Krebsbach P.H. *et al.*, 1997). 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 (Kon E. *et al.*, 2000). Inoltre, le MSCs sono state utilizzate in diversi modelli animali per riparare difetti ossei segmentari di notevole entità (Pereira R.F. *et al.*, 1995; Petite H. *et al.*, 2000).

A partire dal 1994 (Jorgensen C. *et al.*, 2001) 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 (Schultz O. *et al.*, 2000; Wakitani S., 1994). Le MSCs sono state usate *in vivo* per riparare difetti della cartilagine articolare in modelli animali (Beuningen H.M. *et al.*, 1998; Wakitani S. *et al.*, 1994).

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 (Tuan R.S. *et al.*, 2003). Le MSCs, inoltre, possono differenziare in cellule muscolari striate scheletriche, striate cardiache e lisce (Ferrari G. *et al.*, 1998). La maggior parte degli studi si sono focalizzati sul potenziale di differenziazione cardiomiocellulare delle MSCs in funzione delle loro possibili applicazioni pratiche nella rigenerazione dopo infarto miocardico (Orlic D. *et al.*, 2001; Stamm C., 2003).

Numerosi studi hanno dimostrato l'utilità della somministrazione di MSCs in malattie del sistema nervoso; è stato osservato per esempio come l'impianto diretto delle MSCs nel muscolo striato di ratti anziani con deficit motori e cognitivi porti ad un miglioramento dell'attività motoria (Miyahara Y. *et al.*, 2006) mentre in modelli animali di morbo di Parkinson, di danno neurale ipoischemico e danno retinico, è stato dimostrato un significativo recupero funzionale, dopo trapianto *in vivo* di cellule staminali nella sede della lesione (Locatelli F. *et al.*, 2003). 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 (Corti I. *et al.*, 2003; Nakamizo A. *et al.*, 2005).

4. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo studio è stato quello di mettere a punto un protocollo per la creazione di uno *xenograft* bovino di facile impiego in campo medico per la riparazione di difetti ossei. Per il raggiungimento di tale obiettivi sono stati sviluppati i seguenti punti:

- Validazione *in vitro* dell'effettiva decellularizzazione dello *xenograft* bovino.
- Validazione *in vitro* delle capacità osteoinduttive del biomateriale mediante l'impiego di cellule staminali.
- Validazione *in vivo* della capacità rigenerativa del campione rispetto al *gold standard* in campo medico.

5. MATERIALI E METODI

5.1 CAMPIONAMENTO DELL'INNESTO OSSEO

I protocolli di decellularizzazione sono stati inizialmente applicati su campioni d'osso murino.

Per il campionamento dell'innesto osseo sono stati utilizzati tredici ratti femmine di razza Wistar (peso medio di 300g). A tutti i ratti (eutanasiati mediante l'impiego di anidride carbonica), sono stati asportati in ambiente sterile i femori e scarnificati accuratamente. I femori così ottenuti sono stati collocati in capsule Petri da 150mm, e poi trattati all'interno di Falcon da 50ml con 30ml di PBS (*Phosphate buffered saline*) per circa 1h per eliminare eventuali residui tissutali adesi all'osso.

5.2 DECELLULARIZZAZIONE DEI CAMPIONI

5.2.1 FASE DI CONGELAMENTO

I campioni sono stati suddivisi in sei gruppi composti da quattro femori ciascuno, e sottoposti a variazioni di temperatura di congelamento per periodi di tempo prestabiliti, differenti per ogni tipo di protocollo testato.

Gruppo 0: I campioni sono stati congelati ad una temperatura di -80°C ,
rispettivamente per un periodo di 24, 48, 72 e 168 ore. Dopo essere stati scongelati è stato effettuato il test MTT.

Gruppo 1: I campioni quattro femori sono stati congelati ad una temperatura di -80°C , rispettivamente per un periodo di 24, 48, 72 e 168 ore. Dopo essere stati scongelati è stato effettuato il test MTT.

Gruppo 2: I campioni sono stati congelati ad un temperatura di -20°C , rispettivamente per un periodo di 24, 48, 72 e 168 ore; in seguito sono stati trasferiti per 24 ore ad una temperatura di -80°C . Dopo essere stati scongelati, è stato effettuato il test MTT.

Gruppo 3: I campioni sono stati congelati ad un temperatura di -20°C , rispettivamente per un periodo di 24, 48, 72 e 168 ore; in seguito sono stati trasferiti per 48 ore ad una temperatura di -80°C . Dopo essere stati scongelati, è stato effettuato il test MTT.

Gruppo 4: I campioni sono stati congelati ad un temperatura di -20°C , rispettivamente per un periodo di 24, 48, 72 e 168 ore; in seguito sono stati trasferiti per 72 ore ad una temperatura di -80°C . Dopo essere stati scongelati, è stato effettuato il test MTT.

Gruppo 5: I campioni sono stati congelati ad un temperatura di -20°C , rispettivamente per un periodo di 24, 48, 72 e 168 ore; in seguito sono stati trasferiti per 168 ore ad una temperatura di -80°C . Dopo essere stati scongelati, è stato effettuato il test MTT.

5.2.2 FASE DI SCONGELAMENTO

I femori del gruppo 0 sono stati sottoposti a **scongelamento lento** (bagnomaria alla temperatura di 37°C per 1h), mentre i femori dei gruppi 1-2-3-4 e 5, sono stati scongelati mediante **shock termico** (autoclave per 90 minuti a 196°C). A tutti i femori scongelati è stata poi asportata, sotto cappa sterile, la testa femorale (componente spongiosa).

5.3 TEST DI PROLIFERAZIONE MTT

I femori scongelati sono stati sottoposti al saggio MTT (*4,5-Dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-dipheniltetrazolium bromide secondo il metodo di Denizot e Lang, per la valutazione del **tasso di vitalità cellulare**. Il saggio MTT misura in modo quantitativo la presenza di attività della *succinil-deidrogenasi* all'interno delle cellule. Le reazioni catalizzate da questo enzima mitocondriale vengono impiegate come marker per verificare l'attività metabolica, la vitalità e l'eventuale crescita delle cellule in coltura. Il test si basa sulla conversione del composto chimico MTT (colorante azolico di colore giallo), in sali di formazano di colore blu, ad opera della *succinil-deidrogenasi* mitocondriale. La quantità di formazano, determinata spettrofotometricamente, è proporzionale alla presenza di tale enzima nella coltura cellulare e quindi, direttamente proporzionale al numero delle cellule vitali. La lettura viene eseguita ad una lunghezza d'onda di 540nm.

La soluzione MTT (5mg/ml) è stata diluita 1:10 con PBS in una Falcon e ricoperta da carta stagnola per impedire il passaggio della luce (reagente fotosensibile). Ad ogni campione è stato aggiunto 1ml di soluzione MTT, incubandolo poi a 37°C per 3h. Terminato il periodo di incubazione, il reattivo è stato aspirato ed aggiunto ad una quantità equivalente di soluzione estraente (90% di isopropanolo, 10% di DMSO), lasciata agire per 15 minuti a 37°C. Infine è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro (Perkin Elmer, Victor x3 Multilabel Plate Reader), con una lunghezza d'onda pari a 540nm. Il software che è stato impiegato è il New WorkOut 2.5.

5.4 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

I costrutti, precedentemente lavati in PBS, sono stati fissati con una soluzione di glutaraldeide al 2% in tampone sodio fosfato 0.1M a pH 7.2, e conservati a 4°C fino al momento della disidratazione. La disidratazione, preceduta da tre lavaggi in tampone sodio fosfato 0.1M, è stata eseguita mediante la scala ascendente degli alcoli: i campioni sono stati immersi in soluzioni di alcol etilico a concentrazione crescente (dal 20% al 96%), con doppi passaggi di 5 minuti ciascuno per eliminare gradualmente il contenuto di acqua. Con lo scopo di individuare l'eventuale presenza di cellule, i campioni sono stati conservati per una notte in alcool 96% e dopo un passaggio in alcool assoluto, sono stati sottoposti a *Critical Point*

Drying e metallizzati con oro. I preparati così ottenuti sono stati osservati mediante microscopio elettronico a scansione (modello JSM Jeol 6490) in dotazione al Centro Interdipartimentale di Servizi dell'Università di Padova (CUGAS).

Il test MTT e la microscopia elettronica a scansione ci hanno permesso di valutare il miglior protocollo di congelamento/scongelo per la decellularizzazione dei campioni ossei murini. Tale procedura è stata successivamente applicata ai costrutti bovini valutando anche in questo caso la vitalità cellulare residua mediante test MTT e microscopia elettronica a scansione.

5.5 PRODUZIONE DI CELLULE STAMINALI ADULTE DA TESSUTO ADIPOSO (ADSCs)

Cellule staminali adulte del tessuto adiposo (ADSCs) sono state isolate, amplificate e seminate sulla superficie dell'osso bovino decellularizzato. Lo scopo è quello di potenziare le capacità osteoinduttive del biomateriale.

5.5.1 ISOLAMENTO DELLE ADSCs

Le cellule staminali dell'adipe (ADSCs) sono state isolate da campioni di tessuto adiposo sottocutaneo di pazienti umani, sottoposti ad addominoplastica, previo consenso informato.

Il grasso addominale, lavato in PBS e ridotto in piccoli pezzi è stato digerito mediante agitazione (3 ore a temperatura ambiente). La digestione

è stata effettuata con una soluzione allo 0.075% di collagenasi di *Clostridium histolyticum* tipo II (Sigma), in una soluzione *Hank's Balanced Salts* (HBSS, Lonza). L'attività enzimatica della collagenasi è stata bloccata con un egual volume di *Dulbecco's Modified Eagle Medium* completo (DMEM, Lonza), costituito da: DMEM, 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS, Gibco), e 1% di Penicillina Streptomicina (P/S, Lonza). Le cellule, raccolte tramite centrifugazione a 1200 rpm per 4 minuti, sono state lavate in PBS e filtrate con colino da 70 µm (*BD Biosciences*) per eliminare i residui della digestione; infine, le cellule raccolte sono state seminate in fiasche F75 (BD Falcon) con DMEM *low glucose* completo (Lonza), e poste in incubatore umidificato al 5% CO₂ ed alla temperatura di 37°C.

5.5.2 AMPLIFICAZIONE E SEMINA DELLE ADSCs

A due giorni dalla digestione, le cellule non adese (adipociti maturi e globuli rossi) ed il terreno di coltura, sono stati eliminati e sostituiti con DMEM *low glucose* completo, fresco. Successivamente le cellule sono state seminate sulla superficie del biomateriale e coltivate in presenza di terreno non differenziativo per 21 giorni.

5.6 ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE REAL TIME-PCR

Al fine di valutare l'andamento della differenziazione ossea in funzione del tempo, è stata indagata l'espressione genica dei marker ossei a 5, 7, 14 e 21

giorni dalla semina delle ADSCs sulla superficie del biomateriale, mediante *Real Time-PCR*.

5.7 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI RNA

L'estrazione di RNA dai campioni è stata effettuata utilizzando una soluzione monofasica a base di fenolo e guanidina isotiocianato: il TRIzol® Reagent (Invitrogen). I campioni omogeneizzati, associati al TRIzol® Reagent, vanno in contro a lisi delle membrane cellulari garantendo l'integrità dell'RNA per inibizione degli enzimi RNasi. I costrutti sono stati trasferiti in microprovette contenenti 1 ml di TRIzol® Reagent ed incubati (5 minuti complessivi) per consentirne la completa dissociazione. Ai campioni sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e sottoposti ad intensa agitazione per 30 secondi, incubati a temperatura ambiente per 2 minuti, e successivamente centrifugati a 14000rpm per 15 minuti a 4°C. Il procedimento descritto poc'anzi ha permesso di creare 3 differenti fasi: una fase superiore, acquosa e limpida contenente l'RNA; una interfase centrale bianca, contenente il DNA e una fase inferiore rosa, contenente proteine, fenolo e cloroformio. La fase superiore contenente RNA, è stata poi trasferita in una nuova microprovetta contenente 500 µl di isopropanolo; lo scopo era quello di far precipitare l'acido nucleico. I campioni incubati per 10 minuti a temperatura ambiente sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti a 4° C. Il pellet derivante dalla

centrifugazione, costituito da RNA, è stato lavato con 1 ml di etanolo al 75 % freddo, agitato e centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti a 4° C. Successivamente l'RNA è stato asciugato a temperatura ambiente per 10 minuti e risospeso in acqua DNase e RNase-free.

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata mediante spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific). Questo spettrofotometro stima la concentrazione e la purezza dei campioni sottoposti ad analisi.

5.8 SINTESI DEL DNA COMPLEMENTARE (cDNA)

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

Per ciascun campione sono stati retrotrascritti 500ng di RNA in un volume di reazione pari a 20µl. In microprovette *nuclease-free* sono stati miscelati: 1 µl di Oligo (dT)12-18 [500 µg/ml] (Invitrogen), 500ng di RNA totale, 1µl di dNTP Mix [10mM] (Invitrogen) e acqua distillata *nuclease-free* fino ad ottenere un volume pari a 12µl. Le miscele così ottenute sono state incubate

a 65°C per 5 minuti e successivamente poste in ghiaccio per alcuni minuti; dopo centrifugazione (5 minuti a temperatura ambiente), sono stati addizionati i seguenti reagenti: 4µl di First-Strand Buffer 5X (Invitrogen); 2µl di DTT [0,1M] (Invitrogen) e 1µl di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor [40 U/µl] (Invitrogen). Le miscele di reazione, dopo essere state mescolate delicatamente, sono state incubate a 37°C per 2 minuti. In seguito, ad ogni campione è stato aggiunto 1µl di soluzione contenete l'enzima M-MLV RT [200 U/µl] (Invitrogen). Dopo aver incubato i campioni a 37°C per 50 minuti, la reazione è stata inattivata portando i campioni a 70°C per 15 minuti.

5.8.1 QUANTIFICAZIONE DEL cDNA MEDIANTE RT-PCR

La *Real Time PCR* consente, attraverso l'uso di coloranti o sonde fluorescenti, di quantificare in tempo reale l'amplificazione del cDNA, correlando l'intensità di fluorescenza del segnale alla concentrazione dei prodotti derivanti dalla PCR. Ogni reazione di Real Time PCR è caratterizzata da un accumulo di segnale fluorescente che viene contraddistinto dal *cycle threshold* (numero di cicli richiesti per ottenere un'intensità del segnale superiore al rumore di fondo del sistema). A quantità elevate di DNA di partenza corrisponde un veloce incremento del segnale fluorescente, e quindi un basso valore di *cycle threshold* (Ct). Il segnale fluorescente è stato generato aggiungendo alla miscela di reazione

il colorante fluorescente SYBR Green I. Quando le molecole di SYBR Green I sono libere in soluzione non presentano una fluorescenza rilevante; al contrario quando si legano al DNA a doppia elica, subiscono un cambio conformazionale, con conseguente incremento della quantità di fluorescenza emessa.

5.8.2 AMPLIFICAZIONE DEL cDNA

All'interno di microprovette *nuclease-free* da 200µl sono stati miscelati i seguenti reagenti: 12.5µl di *FastStart SYBR Green Master* [2X] (Roche), 0.75 µl di *Forward primer* (10 µM), 0.75 µl di *Reverse primer* (10 µM) e 8.5 µl di acqua *DNasi-RNasi free* (GIBCO). Dopo aver mescolato delicatamente e centrifugato brevemente ogni miscela, sono stati aggiunti 2.5µl di cDNA.

Le reazioni di *Real Time PCR* sono state condotte mediante un termociclatore Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research, Australia), seguendo il programma di amplificazione riportato in tabella 1. I campioni di cDNA sono stati analizzati in triplice copia utilizzando le coppie di *primers* riportate in tabella 2.

N° CICLI	PASSAGGIO	TEMPERATURA	TEMPO
1	Denaturazione iniziale del cDNA	95°C	10 minuti
40	Denaturazione	95°C	10 minuti
40	Appaiamento dei <i>primers</i>	60°C	30 secondi
40	Estensione	72°C	30 secondi
1	Estensione finale	72°C	10 minuti

Tabella 1 Programma di amplificazione RT-PCR.

GENE	FORWARD PRIMER (5'→3')	REVERSE PRIMER (5'→3')
Collagene I	TGAGCCAGCAGATCGAGA	ACCAGTCTCCATGTTGCAGA
GAPDH	TCAACAGCGACACCCAC	GGGTCTCTCTTCTCCTTGTG
Osteocalcina	GCAGCGAGGTAGTGAAGAGAC	AGCAGAGCGACACCCTA
Osteonectina	TGCATGTGTCTTAGTCTTAGTCACC	GCTAACTTAGTGCTTACAGGAACCA

Tabella 2 *Primers* utilizzati.

L'analisi dell'espressione genica è stata determinata normalizzando la quantità del trascritto del gene di interesse, con quella di un gene di

riferimento (GAPDH) nello stesso campione. La normalizzazione è stata effettuata applicando la seguente formula:

$$2^{\Delta C_t}$$

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

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

Infine i profili genici sono stati presentati come il rapporto fra il C_t normalizzato della condizione di riferimento (coltura cellulare in presenza di fattori differenziativi), ed il C_t normalizzato della condizione controllo (colture cellulari in terreno non differenziativo), per valutare l'espressione dei geni ossei dell'osteopontina, dell'osteonectina, dell'osteocalcina e del collagene tipo I presente nella matrice extra cellulare ossea.

5.9 TEST IN VIVO

La scelta del modello ovino è dettata dal fatto che la morfologia della membrana sinusale e lo spessore corticale della parete laterale del seno mascellare ovino sono molto simili a quelli umani. Questa regione anatomica, inoltre, non è sottoposta ad importanti sollecitazioni biomeccaniche, come invece accade a livello degli arti (Castro-Malaspina H., *et al*, 1980). L'assenza di variabili biomeccaniche così importanti ci ha permesso di valutare in maniera più precisa le capacità **osteoconduttive** ed

osteoinduttive dello *xenograft* bovino decellularizzato, arricchito di cellule staminali, confrontandolo con il Bio-oss® (Geistlich Pharma AG Wohlhusen, Switzerland). La decisione di utilizzare il Bio-oss® è dettata dal fatto che le caratteristiche di questo materiale sono già state ampiamente studiate e testate sia *in vitro* che *in vivo*. Il **Bio-oss®** è uno *xenograft* bovino decellularizzato mediante l'ausilio di alte temperature, che viene impiegato ormai da tempo sia in medicina umana che in veterinaria. Questo biomateriale presenta una struttura ad elevata porosità, che favorisce la formazione dei vasi sanguigni e la migrazione delle cellule ossee attraverso le interconnessioni esistenti tra i pori del materiale stesso, consentendo allo *xenograft* di osteointegrarsi con successo a livello del sito nel quale è stato inserito (Galindo-Moreno P. *et al.*, 2010; Degidi M. *et al.*, 2006); inoltre possiede un'ampia superficie interna che favorisce un'ottima osteointegrazione (Weibrich W. *et al.*, 2000).

La sperimentazione, previa autorizzazione da parte del Comitato Etico per la Sperimentazione Animale (CEASA), ha previsto l'utilizzazione di trenta pecore femmine adulte, di razza bergamasca, peso medio 48 kg (da 45 a 52 kg) non gravide, test *Q fever* negativo, stabulate presso lo Stabilimento di Utilizzo e di Allevamento del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie (Viale dell'Università 16, Agripolis, Legnaro PD). Lo studio ha seguito le linee guida indicate in letteratura per la valutazione della rigenerazione di

difetti ossei nel modello animale ovino (Castro-Malaspina H. *et al.*, 1980; Sengenès C. *et al.*, 2005).

Una volta stabulati (5 pecore per box) tutti i soggetti, pesati, sono stati visitati clinicamente per l'esclusione di patologie cardio- respiratorie e a carico dell'apparato riproduttore, quindi trattate contro gli endoparassiti (Ivermectina 0.5ml/25Kg, SC). Inoltre sono stati eseguiti esami ematobiochimici di ogni animale per escludere patologie sistemiche. Il controllo del peso delle pecore è stato monitorato periodicamente per tutta la durata della sperimentazione. Perdite di peso uguali o maggiori al 10% sono correlabili ad uno stato di sofferenza dell'animale con conseguente suo allontanamento dalla sperimentazione (Sengenès C. *et al.*, 2005).

5.9.1 PROCEDURA ANESTESIOLOGICA

L'analgesia preempitiva è stata garantita dalla somministrazione endovenosa di metadone (0,2-0,3 mg/kg) e xilazina (0,1 mg/kg). L'accesso venoso è stato ottenuto attraverso il posizionamento di un catetere venoso a livello della vena auricolare laterale dell'orecchio destro (Schaller O., 2007). L'anestesia generale è stata indotta mediante l'impiego di Propofol (3-5mg/Kg IV ad effetto) e, previa intubazione oro tracheale, mantenuta con isofluorano (1-1,6%; MAC 1,19-1,56) in ossigeno/aria medicale. Per tutta la durata dell'intervento sono stati monitorati: frequenza cardiaca, elettrocardiogramma (ECG), pressione sistemica non invasiva,

pulsossimetria, frequenza respiratoria, capnometria, gas inspirati/espirati e temperatura corporea. Una sonda oro-ruminale è stata inserita e lasciata in sede durante la chirurgia, al fine di evitare fenomeni di meteorismo del rumine dovuti al posizionamento dell'animale e all'anestesia generale.

5.9.2 TECNICA CHIRURGICA

5.9.2.1 POSIZIONAMENTO

Previa tricotomia delle regioni mascellari, nell'unica seduta operatoria, gli animali sono stati posizionati in decubito sternale, con la testa allungata sul collo e leggermente ruotata dal lato destro o sinistro, a seconda del lato di intervento chirurgico prescelto.

5.9.2.2 PREPARAZIONE DEL CAMPO CHIRURGICO

- Detersione e disinfezione del sito chirurgico mediante soluzione a base di Iodio Povidone 10% (Betadine);
- Delimitazione del campo operatorio con teli sterili;
- Anestesia locale con mepivacaina al 2% e adrenalina 1:200000, dell'area di incisione (figura 1).



Figura 1. Posizionamento pre-operatorio.

5.9.2.3 ACCESSO CHIRURGICO

L'accesso chirurgico del seno mascellare ha previsto un approccio extraorale:

- Incisione cutanea obliqua di circa 5 cm in direzione dorso-caudale e ventro-rostrale, parallela alla cresta facciale e vetralmente alla vena angolare dell'occhio;
- Scollamento sub-periostale dell'inserzione del muscolo massetere e spostamento del medesimo in direzione dorsale a scoprire la base ossea del seno mascellare (figura 2).



Figura 2. Incisione cutanea.

- Fenestrazione rettangolare del seno mascellare mediante fresa ossea (1x 1,5cm), (figura 3).

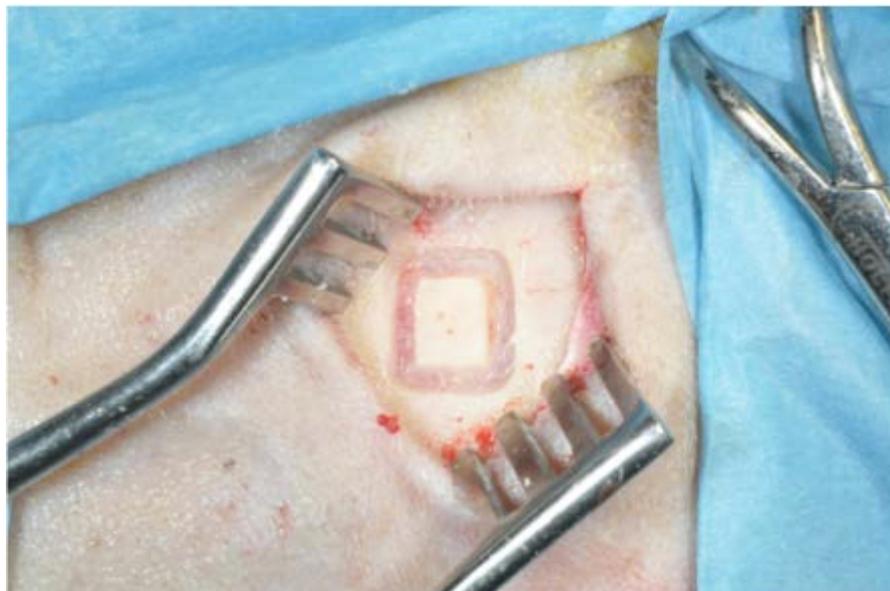


Figura 3 Fenestrazione ossea.

- Posizionamento di un punto metallico a delimitare i margini caudale e rostrale della fenestrazione ossea;
- Scollamento della membrana sinusale;

- Inserimento del materiale d'innesto designato: nel lato test il materiale innestato è rappresentato dallo **xenograft bovino** decellularizzato mediante congelamento/ scongelamento, mentre nel lato controllo è stato innestato **Bio-oss®** (Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Switzerland). Il lato test ed il lato controllo sono stati assegnati random (figura 4).

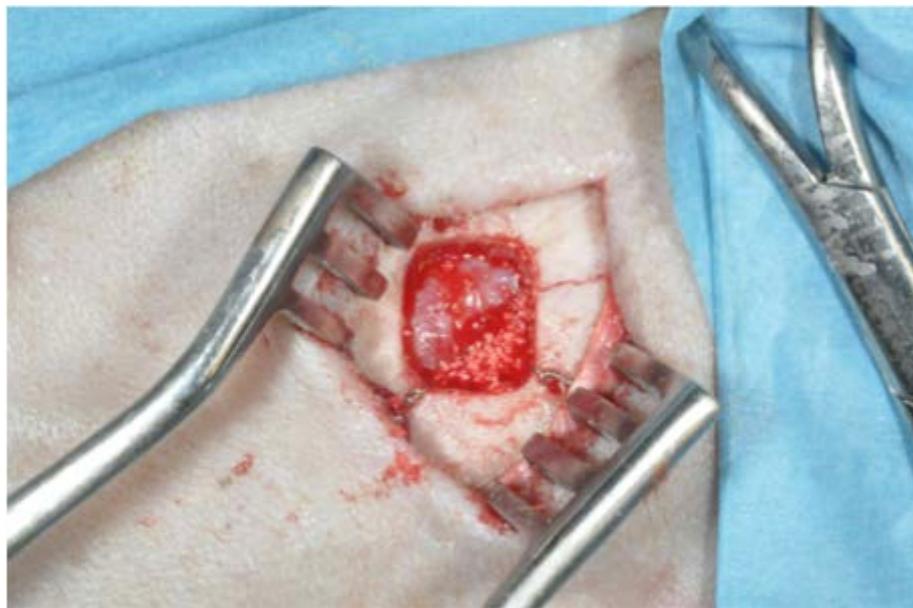


Figura 4. Innesto del biomateriale.

- Posizionamento di una membrana isolante a base di collagene (Bio-Gide® Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Switzerland) a copertura dell'innesto (figura 5).



Figura 5. Posizionamento della membrana isolante di collagene.

- Sutura della fascia superficiale del muscolo massetere e del sottocute con filo riassorbibile (Polyglactin 910, 2-0 3Ph. Eur.), e giustapposizione dei lembi cutanei con filo da sutura non riassorbibile (Monofilament Nylon, 2-0 3Ph. Eur.) (figura 6).



Figura 6. Sutura cutanea della linea di incisione.

5.9.3 TRATTAMENTO POST-OPERATORIO

Nel post-operatorio le pecore sono state costantemente monitorate con la consulenza del Servizio Veterinario Centralizzato e sottoposte a terapia analgesica, mediante iniezioni sottocutanee di tramadolo (3-4 mg/Kg) ogni 8 ore per 3 giorni; terapia antinfiammatoria con iniezioni sottocutanee di carprofen (2mg/Kg) una volta al giorno per 6 giorni; antibioticoterapia con iniezioni sottocutanee di tetraciclina cloridrato (15 mg/kg) per 7 giorni.

5.9.4 EUTANASIA DEGLI ANIMALI ED ESTRAZIONE DEI CAMPIONI DI MATRICE OSSEA

Le pecore sono state suddivise in tre gruppi composti da dieci soggetti ciascuno, e sottoposte ad eutanasia a 15, 30 e 60 giorni di distanza dalla data dell'intervento di rialzo del seno mascellare.

Il sacrificio degli animali è stato effettuato seguendo le indicazioni dell'*American Veterinarian Medical Association (AVMA Panel)*. Ogni capo è stato sedato con una iniezione endovenosa di xilazina (0.1mg/kg), quindi si è proceduto con la somministrazione di boli ad effetto di tiopentale sodico (10-15mg/Kg IV); ottenuta la totale perdita di coscienza del soggetto è stata somministrata per via endovenosa una dose letale di Tanax® (Intervet Italia Srl). Dal sito di intervento sono stati poi asportati i campioni di tessuto osseo contenenti lo *xenograft* bovino, scarnificati accuratamente avendo cura di non danneggiare l'area di innesto dello

xenograft bovino delimitati dai punti di repere metallici. I campioni di tessuto osseo sono stati inviati al laboratorio per le indagini istologiche

5.9.5 ALLESTIMENTO DEI PREPARATI ISTOLOGICI

I campioni sono stati fissati in formalina al 10% per due giorni, dopo di che sono stati sciacquati in acqua corrente. Ciascun costrutto è stato poi immerso in una soluzione decalcificante a base di EDTA al 10% (pH 7.2), e sottoposto ad agitazione meccanica a temperatura ambiente. Il decalcificante è stato cambiato tutti i giorni per tre mesi, quindi i campioni sono stati lavati sotto acqua corrente e disidratati impiegato alcool etilico a concentrazione crescente (dal 50% al 100%), con doppi passaggi da cinque minuti ciascuno. L'ultimo passaggio è stato effettuato in xilene (solvente organico). Successivamente i costrutti sono stati inclusi in paraffina e tagliati al microtomo in sezioni da 7 μ m. I vetrini così allestiti sono stati colorati con ematossilina-eosina.

6. RISULTATI

6.1 PROTOCOLLI DI DECELLULARIZZAZIONE

PROTOCOLLO DI DECELLULARIZZAZIONE			
CONGELAMENTO		SCONGELAMENTO (lento)	
TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA
24 h	-80°C	1 h	37°C
48 h	-80°C	1 h	37°C
72 h	-80°C	1 h	37°C
168 h	-80°C	1 h	37°C

Tabella 3 Protocollo di decellularizzazione mediante congelamento e scongelamento del Gruppo 0.

PROTOCOLLO DI DECELLULARIZZAZIONE			
CONGELAMENTO		SCONGELAMENTO (shock termico)	
TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA
24 h	-80°C	20 minuti	196°C
48 h	-80°C	20 minuti	196°C
72 h	-80°C	20 minuti	196°C
168 h	-80°C	20 minuti	196°C

Tabella 4 Protocollo di decellularizzazione mediante congelamento e scongelamento del Gruppo 1.

PROTOCOLLO DI DECELLULARIZZAZIONE					
CONGELAMENTO				SCONGELAMENTO (shock termico)	
FASE I		FASE II			
TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA
24 h	-20°C	24 h	-80°C	20 minuti	196°C
48 h	-20°C	24 h	-80°C	20 minuti	196°C
72 h	-20°C	24 h	-80°C	20 minuti	196°C
168 h	-20°C	24 h	-80°C	20 minuti	196°C

Tabella 5 Protocollo di decellularizzazione mediante congelamento e scongelamento del Gruppo 2.

PROTOCOLLO DI DECELLULARIZZAZIONE					
CONGELAMENTO				SCONGELAMENTO (shock termico)	
FASE I		FASE II			
TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA
24 h	-20°C	48 h	-80°C	20 minuti	196°C
48 h	-20°C	48 h	-80°C	20 minuti	196°C
72 h	-20°C	48 h	-80°C	20 minuti	196°C
168 h	-20°C	48 h	-80°C	20 minuti	196°C

Tabella 6 Protocollo di decellularizzazione mediante congelamento e scongelamento del Gruppo 3.

PROTOCOLLO DI DECELLULARIZZAZIONE					
CONGELAMENTO				SCONGELAMENTO (shock termico)	
FASE I		FASE II			
TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA
24 h	-20°C	72 h	-80°C	20 minuti	196°C
48 h	-20°C	72 h	-80°C	20 minuti	196°C
72 h	-20°C	72 h	-80°C	20 minuti	196°C
168 h	-20°C	72 h	-80°C	20 minuti	196°C

Tabella 7 Tabella di decellularizzazione mediante congelamento e scongelamento del Gruppo 4.

PROTOCOLLO DI DECELLULARIZZAZIONE					
CONGELAMENTO				SCONGELAMENTO (shock termico)	
FASE I		FASE II			
TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA	TEMPO	TEMPERATURA
24 h	-20°C	168 h	-80°C	20 minuti	196°C
48 h	-20°C	168 h	-80°C	20 minuti	196°C
72 h	-20°C	168 h	-80°C	20 minuti	196°C
168 h	-20°C	168 h	-80°C	20 minuti	196°C

Tabella 8 Tabella di decellularizzazione mediante congelamento e scongelamento del Gruppo 5.

6.2 TEST DI PROLIFERAZIONE MTT

TEST MTT				
TEMPO	XENOGRAFT	CAMPIONE CONTROLLO		
	SPONGIOSA	CORTICALE	SPONGIOSA	CORTICALE
/			2.390 nm	0.937 nm
24 h	1.530 nm	0.799 nm		
48 h	1.728 nm	0.933 nm		
72 h	1.855 nm	0.667 nm		
168 h	1.589 nm	0.888 nm		

Tabella 9 Test di proliferazione MTT del Gruppo 0.

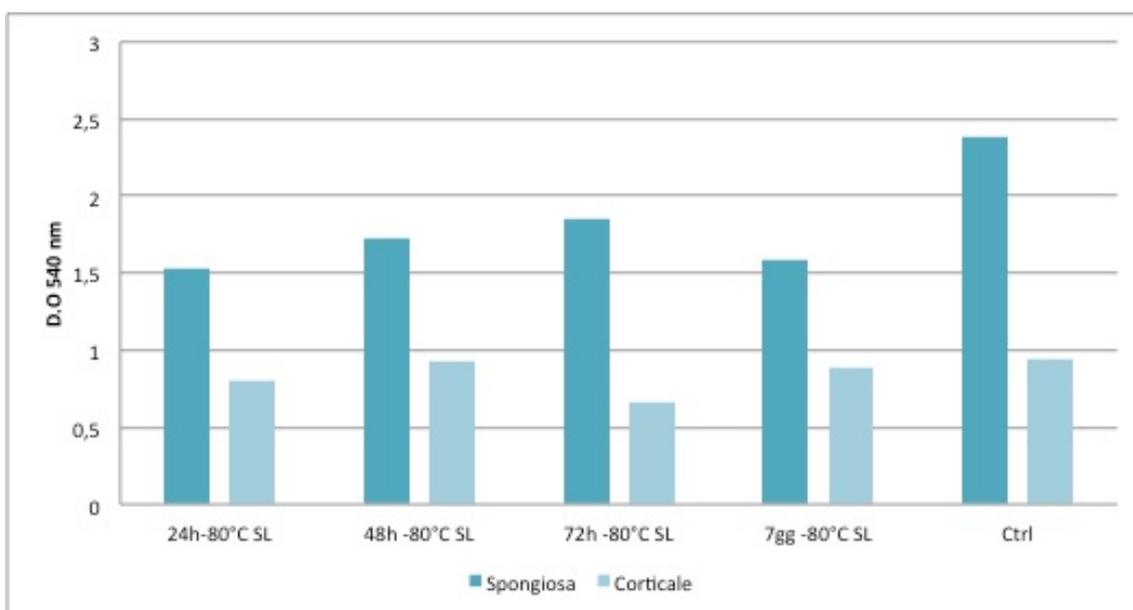


Grafico 1. Test di proliferazione MTT del Gruppo 0.

TEST MTT				
TEMPO	XENOGRAFT	CAMPIONE CONTROLLO		
	SPONGIOSA	CORTICALE	SPONGIOSA	CORTICALE
/			2.390 nm	0.937 nm
24 h	1.164 nm	0.423 nm		
48 h	0.675 nm	0.328 nm		
72 h	0.593 nm	0.205 nm		
168 h	0.436 nm	0.436 nm		

Tabella 10 Test di proliferazione MTT del Gruppo 1.

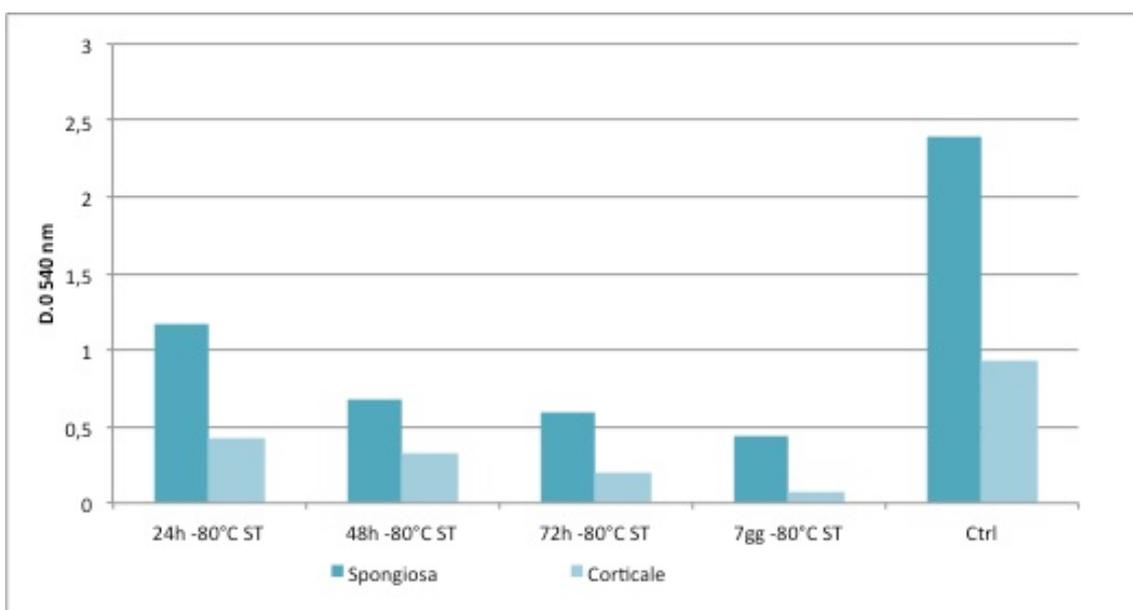


Grafico 2. Test di proliferazione MTT del Gruppo 1.

TEST MTT				
TEMPO	XENOGRAFT	CAMPIONE CONTROLLO		
	SPONGIOSA	CORTICALE	SPONGIOSA	CORTICALE
/			2.390 nm	0.937 nm
24 h	0.863 nm	0.291 nm		
48 h	0.571 nm	0.272 nm		
72 h	0.560 nm	0.240 nm		
168 h	0.541 nm	0.193 nm		

Tabella 11 Test di proliferazione MTT del Gruppo 2.

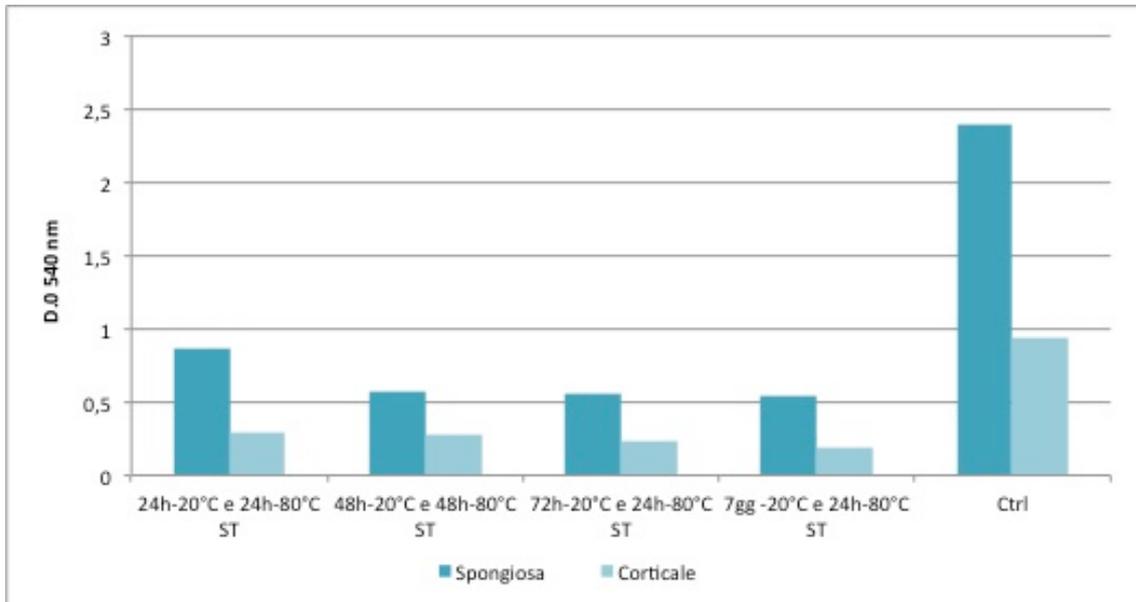


Grafico 3. Test di proliferazione MTT del Gruppo 2.

TEST MTT				
TEMPO	XENOGRAFT	CAMPIONE CONTROLLO		
	SPONGIOSA	CORTICALE	SPONGIOSA	CORTICALE
/			2.390 nm	0.937 nm
24 h	0.622 nm	0.181 nm		
48 h	0.568 nm	0.151 nm		
72 h	0.558 nm	0.139 nm		
168 h	0.391 nm	0.193 nm		

Tabella 12 Test di proliferazione MTT del Gruppo 3.

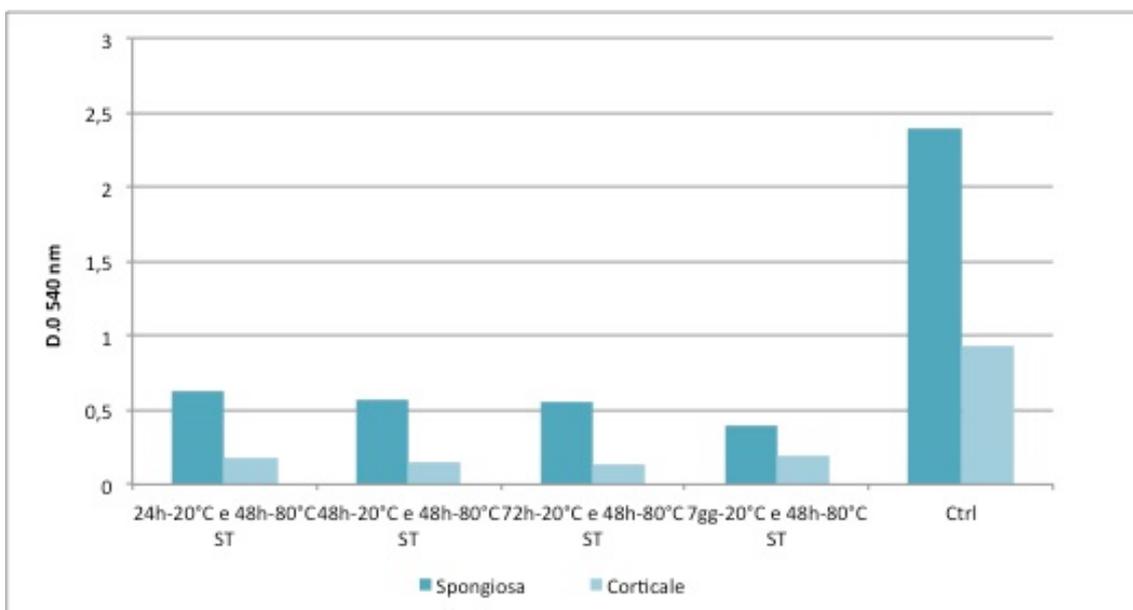


Grafico 4. Test di proliferazione MTT del Gruppo 3.

TEST MTT				
TEMPO	XENOGRAFT	CAMPIONE CONTROLLO		
	SPONGIOSA	CORTICALE	SPONGIOSA	CORTICALE
/			2.390 nm	0.937 nm
24 h	0.980 nm	0.395 nm		
48 h	0.967 nm	0.341 nm		
72 h	0.753 nm	0.365 nm		
168 h	0.725 nm	0.202 nm		

Tabella 13 Test di proliferazione MTT del Gruppo 4.

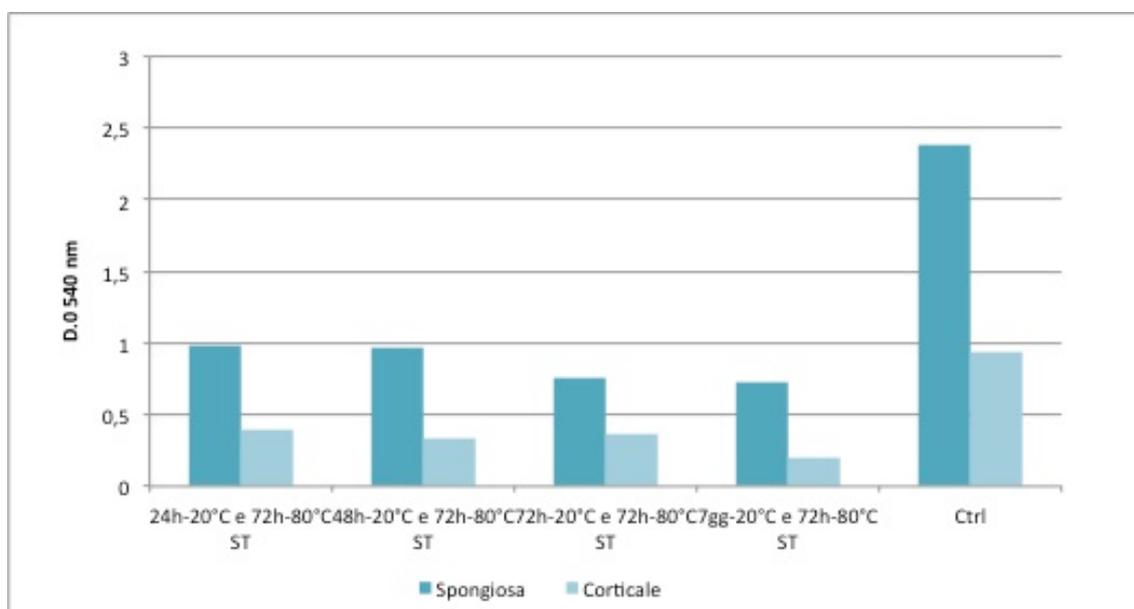


Grafico 5. Test di proliferazione MTT del Gruppo 4.

TEST MTT				
TEMPO	XENOGRAFT	CAMPIONE CONTROLLO		
	SPONGIOSA	CORTICALE	SPONGIOSA	CORTICALE
/			2.390 nm	0.937 nm
24 h	0.989 nm	0.330 nm		
48 h	0.896 nm	0.251 nm		
72 h	0.645 nm	0.105 nm		
168 h	0.205 nm	0.030 nm		

Tabella 14 Test di proliferazione MTT del Gruppo 5.

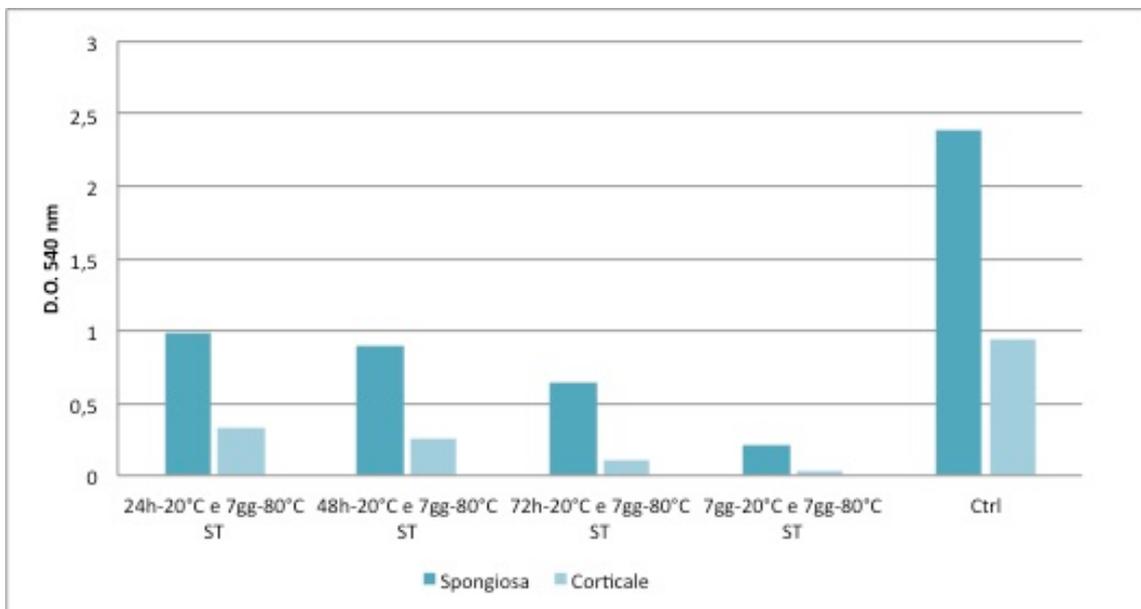


Grafico 6. Test di proliferazione MTT del Gruppo 5.

6.3 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

La microscopia elettronica dei campioni conferma l'assenza di cellule vitali e di batteri sulla superficie del biomateriale testato (figura 7).

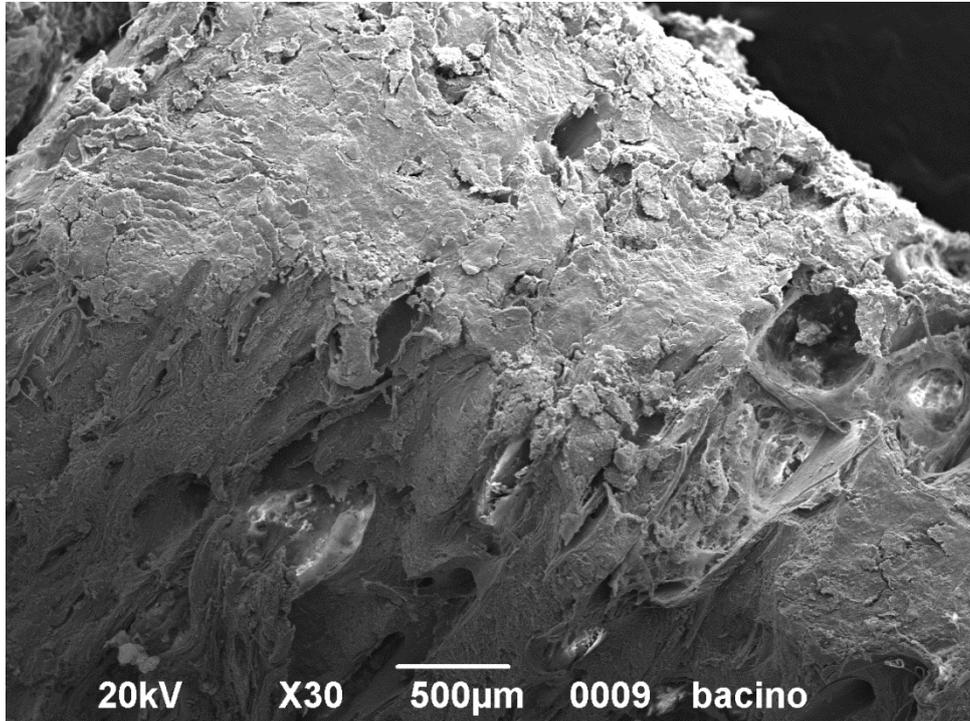


Figura 7. Microscopia elettronica a scansione dello *xenograft* bovino.

6.4 ANALISI *IN VITRO*

6.4.1 PROLIFERAZIONE ADSCs

Oltre a verificare l'espressione di marker ossei da parte delle ADSCs è stata valutata, mediante saggio MTT, anche la loro proliferazione sulla superficie del biomateriale a 3, 7, 14 e 21 giorni. Come si può notare dal grafico 7, già a 3 giorni le cellule staminali cominciano a proliferare; a 7 giorni i valori di assorbanza crescono per poi stabilizzarsi a 14 e 21 giorni.

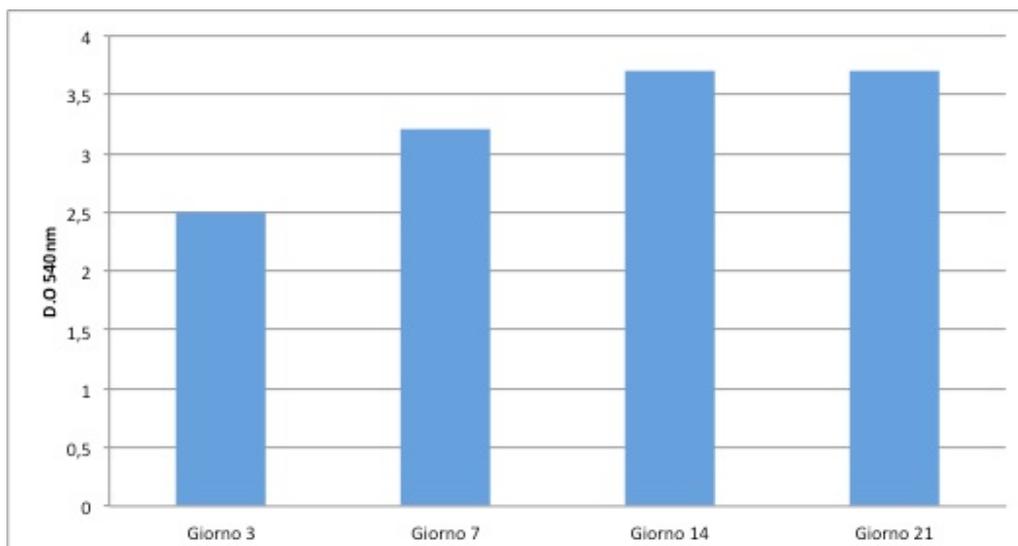


Grafico 7. Test MTT a 3, 7, 14 e 21 gg sullo xenograft con ADSCs.

6.4.2 ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE RT-PCR

La differenziazione osteoblastica delle cellule staminali è stata testata mediante analisi semi quantitativa con *Real Time PCR*. Grazie a questo tipo di indagine molecolare è stato possibile evidenziare l'espressione di mRNA codificante per proteine coinvolte nei processi di ossificazione, quali: **l'osteopontina**, **l'osteonectina** e **l'osteocalcina**; oltre a ciò si è valutata l'espressione del **collagene di tipo I**, principale componente della matrice extracellulare ossea.

Come si può osservare dal grafico 8, a 21 giorni dalla semina è presente un fenotipo cellulare di tipo osteoblastico in quanto sono espressi i marker ossei.

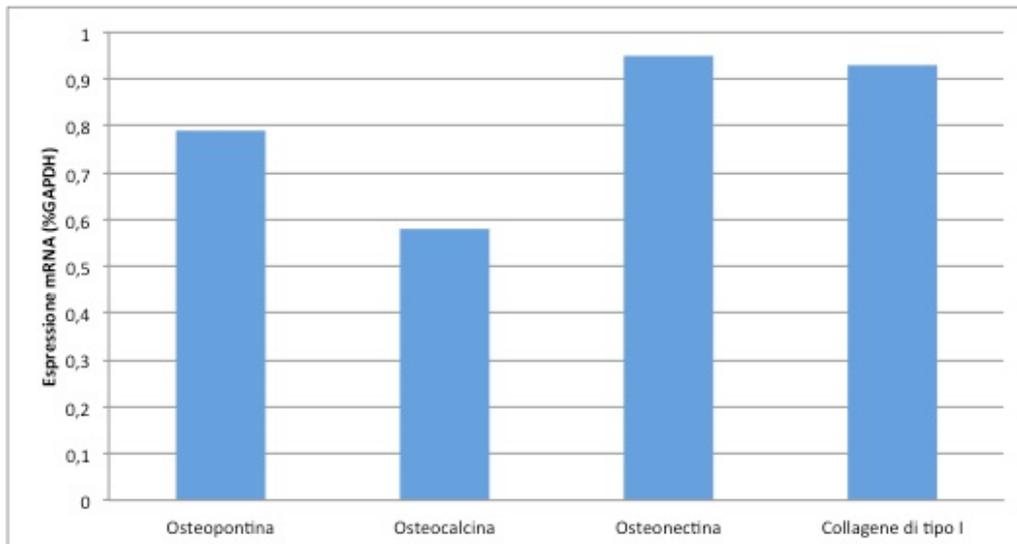


Grafico 8. RT-PCR a 21gg su xenograft bovino.

6.5 ANALISI ISTOLOGICA DEI CAMPIONI

I granuli di osso decellularizzati sono stati impiantati nel seno mascellare di pecora per intervento di rialzo di seno e dopo 15, 30 e 60 giorni dall'impianto si è proceduto ad effettuare l'analisi istologica per valutare il grado di rigenerazione ossea generato.

6.5.1 XENOGRAFT BOVINO A 15 GIORNI

A 15 giorni dall'impianto è possibile osservare l'assoluta mancanza di elementi infiammatori contenuti nella matrice cellulare, questo conferma l'assenza di proprietà antigeniche del biomateriale nel sito di innesto. Sulla superficie dello scaffold osseo si notano numerosi osteoblasti, inoltre la presenza di vasi sanguigni nella matrice indica una buona qualità della nuova matrice ossea prodotta, contribuendo ad accelerare il processo di ossificazione (Figura 8).

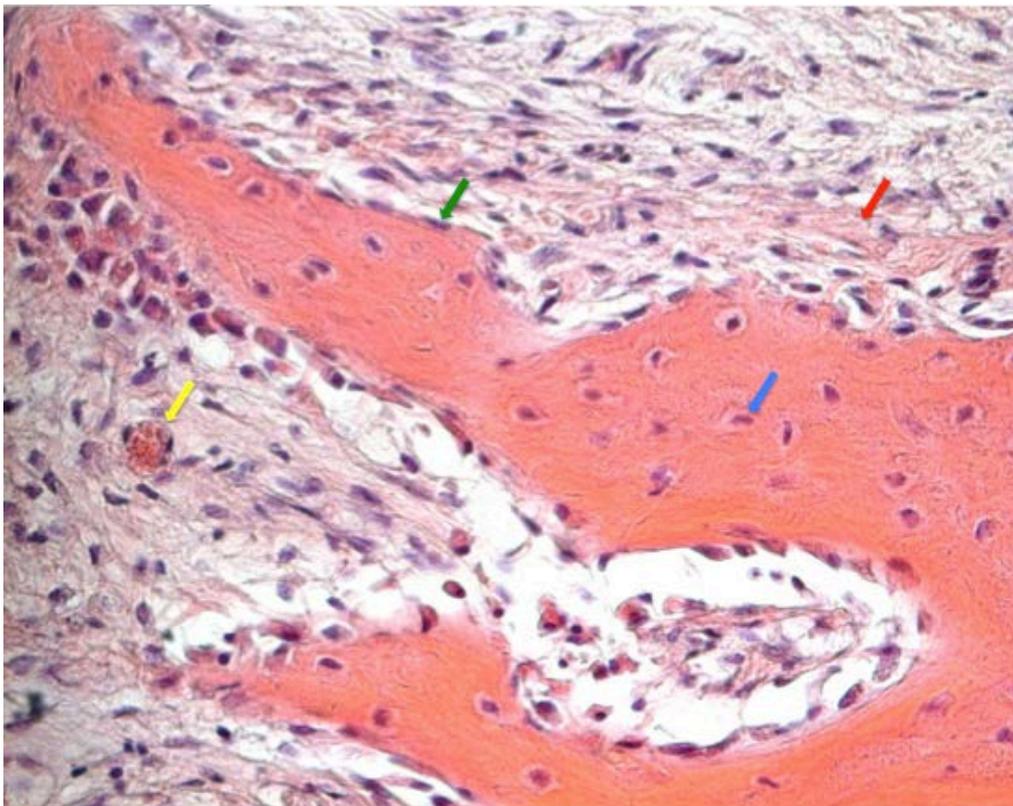


Figura 8. Xenograft bovino a 15 giorni: assenza di cellule infiammatorie nel preparato; attorno alle particelle del biomateriale si osservano cellule con morfologia osteoblastica che ne colonizzano tutta la superficie (freccia verde); presenza di tessuto osseo neoformato di color rosa chiaro (freccia rossa); presenza di vasi sanguigni (freccia gialla); presenza di nuclei delle cellule native dello xenograft bovino (freccia blu).

6.5.2 BIO-OSS® A 15 GIORNI

La matrice extracellulare del Bio-oss® non è completamente priva di nuclei cellulari. Anche in questo caso non si apprezza un pattern cellulare di tipo infiammatorio; inoltre si osserva una ridotta adesione di osteoblasti attorno allo *scaffold*, con la presenza di importanti spazi tra Bio-oss® ed il tessuto osseo circostante. Non si rileva la presenza di vasi sanguigni (Figura 9).

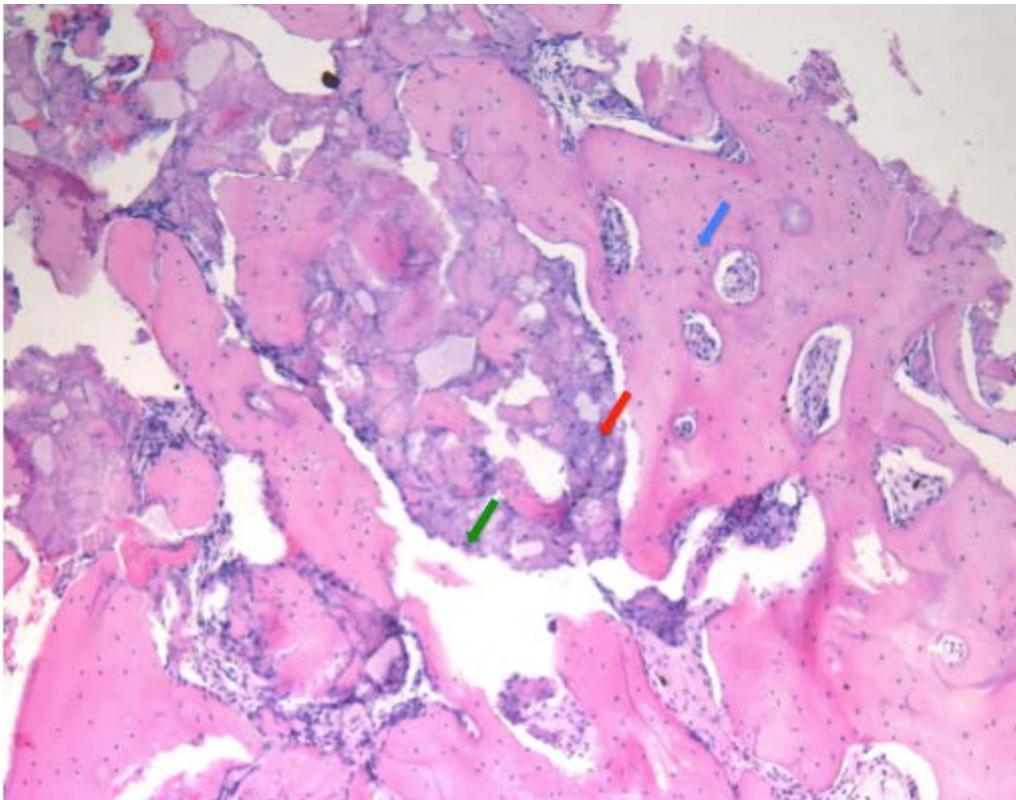


Figura 9. Bio-oss® a 15 giorni: nel preparato è visibile la deposizione di tessuto osseo neoformato (freccia rossa); è presente una scarsa adesione cellulare lungo la superficie del biomateriale (freccia verde); presenza di nuclei di cellule native all'interno della matrice ossea neoformata (freccia blu); assenza di vasi sanguigni.

6.5.3 XENOGRAFT BOVINO A 30 GIORNI

Adese alla superficie del biomateriale si osservano cellule con morfologia osteoblastica; questo dato ci conferma che lo xenograft bovino è altamente biocompatibile. L'assenza di cellule infiammatorie nella matrice cellulare dimostra come il biomateriale sia privo di attività antigenica; inoltre l'elevata presenza di vasi sanguigni sono indice di una rilevante neoangiogenesi (Figura 10).

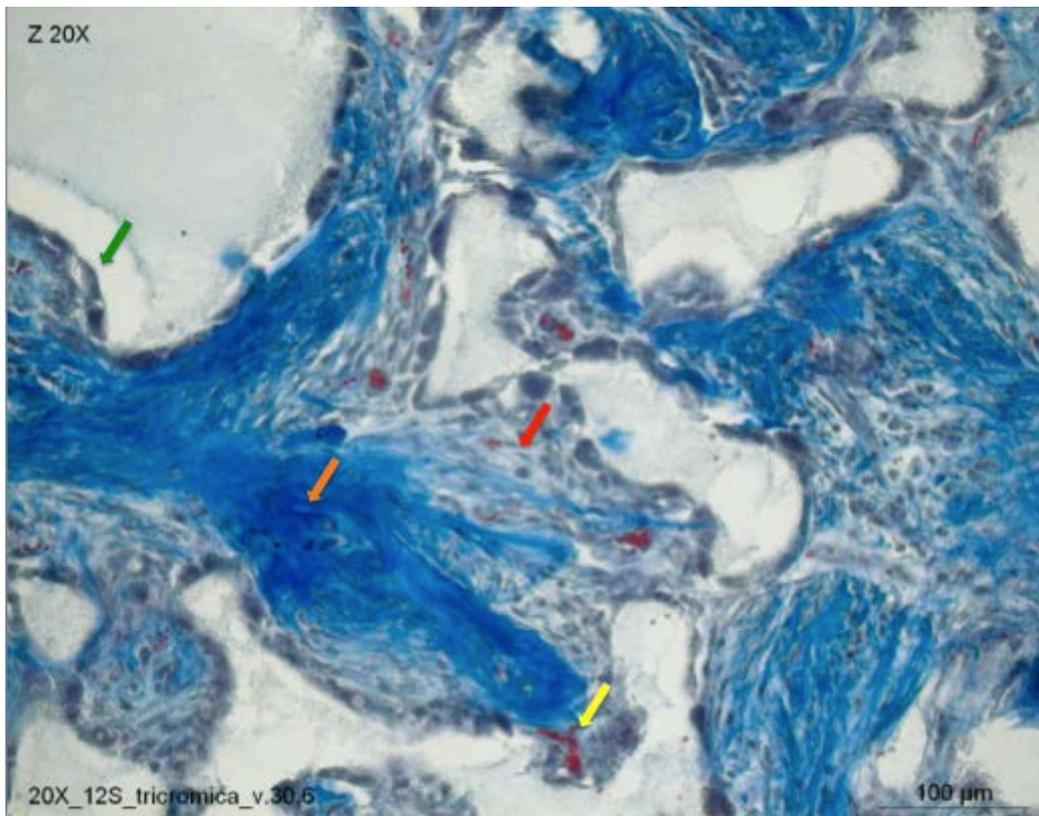


Figura 10. Xenograft bovino a 30 giorni: assenza di cellule infiammatorie nel preparato; attorno alle particelle del biomateriale si osservano cellule con morfologia osteoblastica che ne colonizzano tutta la superficie (freccia verde); presenza di tessuto osseo neoformato di color azzurro chiaro (freccia rossa) che circonda il tessuto osseo maturo (freccia arancio); presenza di numerosi vasi sanguigni (freccia gialla).

6.5.4 BIO-OSS® A 30 GIORNI

A 30 giorni dall'innesto del Bio-oss®, è possibile osservare un leggero infiltrato infiammatorio, probabilmente dovuto all'incompleta decellularizzazione della matrice extracellulare. Anche a 30 giorni sono visibili scarsi osteoblasti adesi alla superficie del Bio-oss® e l'assenza di vasi sanguigni (Figura 11).

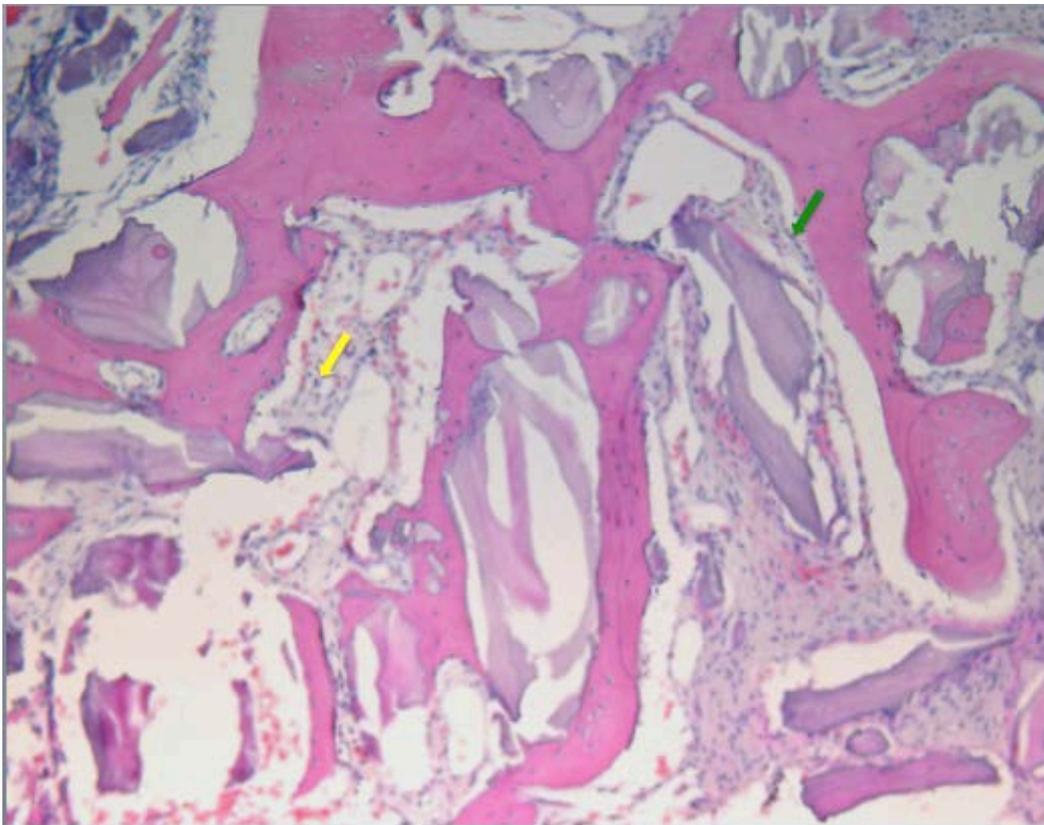


Figura 11. Bio-oss® a 30 giorni: nel preparato sono visibili cellule infiammatorie a livello del tessuto osseo neoformato (freccia gialla); scarsa adesione cellulare lungo la superficie del biomateriale; assenza di vasi sanguigni.

6.5.5 XENOGRAFT BOVINO A 60 GIORNI

Adese alla superficie del biomateriale si osservano cellule con morfologia osteoblastica; questo dato ci conferma che lo xenograft bovino è altamente biocompatibile. L'assenza di cellule infiammatorie nella matrice cellulare dimostra come il biomateriale sia privo di attività antigenica; inoltre l'elevata presenza di vasi sanguigni sono indice di una rilevante neoangiogenesi (Figura 12).

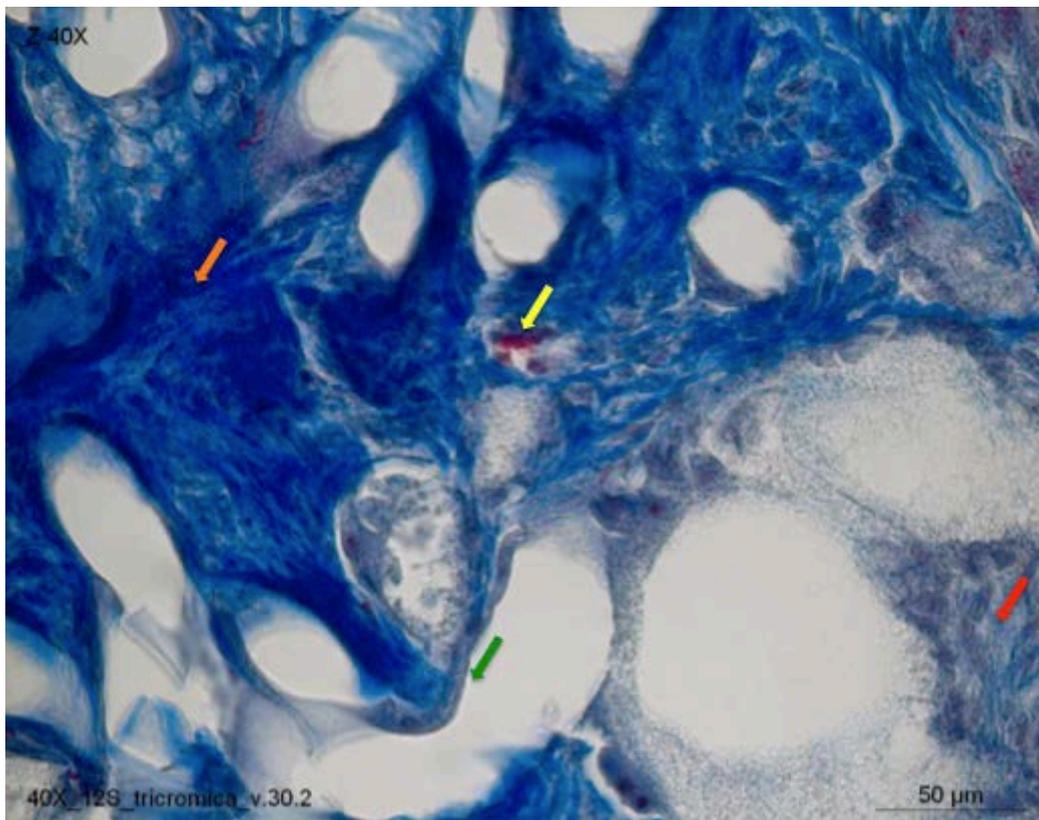


Figura 12 Xenograft bovino a 60 giorni: assenza di cellule infiammatorie nel preparato; attorno alle particelle del biomateriale si osservano cellule con morfologia osteoblastica che ne colonizzano tutta la superficie (freccia verde); presenza di tessuto osseo neoformato di color azzurro chiaro (freccia rossa) che circonda il tessuto osseo maturo (freccia arancio); presenza di numerosi vasi sanguigni (freccia gialla).

6.5.6 BIO-OSS® A 60 GIORNI

A 60 giorni non si osservano più cellule infiammatorie; gli osteoblasti iniziano ad aderire alla superficie del Bio-oss® e si rileva la presenza di scarsi vasi sanguigni (Figura 13).

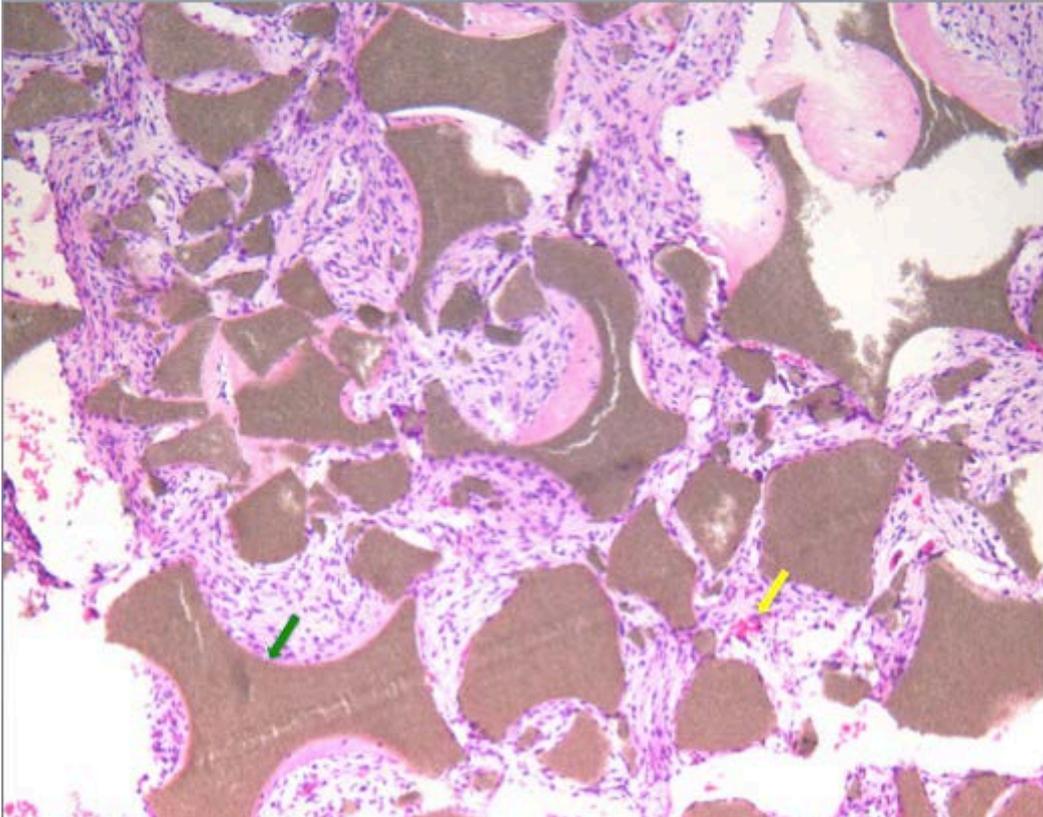


Figura 13. Bio-oss® a 60 giorni: assenza di infiltrato infiammatorio; gli osteoblasti iniziano ad aderire alla superficie del biomateriale (freccia verde); presenza di vasi sanguigni (freccia gialla).

7. DISCUSSIONE

Il successo dei processi di rigenerazione ossea è strettamente correlato a due parametri molto importanti: la qualità e la velocità con cui avviene la deposizione di nuova matrice ossea. Per accelerare e supportare l'osso nella sua guarigione la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale impiegano ormai da molti anni biomateriali che da soli o in combinazione, esplicano un'attività **osteoconduttiva**, **osteoinduttiva** ed **osteogenica** (Albrek T. *et al.*, 2001). L'obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare un'**efficace protocollo di decellularizzazione** capace di abbattere il potenziale antigenico del biomateriale testato, preservandone però le caratteristiche osteoconduttive ed osteoinduttive.

Le prove di decellularizzazione hanno evidenziato come lo **scongelo lento** a differenza dello scongelamento con **shock termico**, non permette un buon abbattimento della vitalità cellulare del biomateriale; infatti i valori di assorbanza di corticale e spongiosa del gruppo 0 ottenuti mediante **test MTT**, sono quelli che si avvicinano di più ai valori di assorbanza del tessuto osseo fresco preso come controllo. I valori spettrofotometrici del biomateriale ottenuti mediante **shock termico**, diminuiscono dal gruppo 1 fino al gruppo 3, poi tendono ad aumentare nel gruppo 4, diminuendo nuovamente nel gruppo 5; in particolare in questo ultimo gruppo notiamo

come l'assorbanza crolli drasticamente quando il biomateriale viene sottoposto al seguente protocollo di decellularizzazione:

1. **CONGELAMENTO** 
 - Fase I:** -20°C per 7 giorni
 - Fase II:** -80°C per 7 giorni
2. **SCONGELAMENTO** 20 minuti a 196°C (shock termico)

L'ipotesi più probabile per questo tipo di andamento potrebbe essere imputabile a fenomeni di adattamento cellulare a condizioni ambientali sfavorevoli; in particolare si può presumere che dopo una prima fase di stress termico, le cellule dei gruppi 1, 2 e 3 inizino ad adattarsi alle basse temperature, presentando addirittura una resistenza maggiore allo shock termico nel gruppo 4. Nel gruppo 5 invece, le cellule non riescono più ad adattarsi alle condizioni sperimentali e vanno incontro a morte. L'assenza di cellule e batteri sulla superficie del biomateriale è stata poi confermata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM).

La semina delle cellule staminali adulte sulla superficie del biomateriale ci ha permesso di capire se le capacità osteoinduttive dello *xenograf in vitro* restavano inalterate anche dopo il trattamento di decellularizzazione. La differenziazione osteoblastica delle ADSCs è stata indagata mediante analisi

semi quantitativa tramite RT-PCR. Grazie a questo tipo di indagine molecolare si è potuto appurare l'espressione di mRNA codificante per proteine coinvolte nei processi di ossificazione quali: l'**osteopontina**, l'**osteocalcina**, l'**osteonectina** ed il **collagene di tipo I**. Il confronto dei risultati della RT-PCR dello *xenograft* bovino indicano l'espressione di *marker* ossei già a 3 giorni dalla semina. Il differenziamento in senso osteoblastico aumenta a 7 giorni e si stabilizza a 14 e 21 giorni. Questi risultati evidenziano come in un primo momento solo poche ADSCs siano in grado di differenziarsi in osteoblasti, ma che all'aumentare del tempo di contatto con il biomateriale anche le altre cellule perdano la loro staminalità differenziandosi in osteoblasti.

A questo punto mediante l'intervento del rialzo del seno mascellare, sono state testate *in vivo*, le proprietà osteoconduttive ed osteoinduttive del biomateriale, confrontandolo con il Bio-oss® (osso bovino decellularizzato mediante trattamento termico ad alte temperature). I preparati istologici a 15 giorni hanno messo in evidenza come lo *xenograft* bovino decellularizzato mediante congelamento/scongelo presenta ottime caratteristiche osteoconduttive ed osteoinduttive. L'adesione di cellule native sulla superficie del biomateriale, la presenza di matrice ossea in via di deposizione e la formazione di vasi sanguigni, indicano che lo *xenograft bovino* si è osteointegrato correttamente, innescando i processi di

rigenerazione tissutale in tempi estremamente brevi. Queste stesse caratteristiche permangono senza importanti variazioni anche a 30 e 60 giorni. Il lato controllo rappresentato dal **Bio-oos®** a 15 giorni, presenta invece una scarsa adesione di osteoblasti alla superficie del Bio-oos®, una ridotta deposizione di matrice ossea e l'assenza di vasi sanguigni neoformati; a 30 giorni invece iniziano a formarsi vasi sanguigni ma compare un leggero infiltrato infiammatorio che tende a scomparire a 60 giorni. Questo risultato potrebbe essere dovuto al diverso protocollo adottato per la decellularizzazione del Bio-oos®. La decellularizzazione mediante trattamento termico ad alte temperature ha probabilmente alterato la struttura proteica della matrice extracellulare, compromettendo l'integrità delle proteine coinvolte nei processi di adesione cellulare e molto probabilmente non è riuscita ad eliminare completamente la componente cellulare conservando un certo grado di antigenicità.

8. CONCLUSIONI

In conclusione si può affermare che il protocollo di decellularizzazione mediante congelamento/scongelo da noi sviluppato, consente di produrre un sostituto osseo ideale per la rigenerazione di difetti ossei in campo medico. Il biomateriale testato favorisce infatti l'adesione degli osteoblasti su tutta la sua superficie, promuovendo la neoangiogenesi e conseguentemente la deposizione di nuova matrice ossea a soli 15 giorni dall'innesto. Inoltre i preparati istologici sono privi di infiltrati infiammatori e questo ci conferma ulteriormente l'efficacia del protocollo testato.

Bibliografia

1. **Albrek T., Johansson C.** “Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration” *European Spine Journal* 2001; Vol. 10: 96-101.
2. **Alexander J.W.** “Bone grafting” *Veterinary clinics of north america: small animal practice* 1976; Vol. 17: 811-819.
3. **Ambrosi G. et al.** “Embriologia e organogenesi” in “Anatomia dell'uomo” Edizione Ermes, Editor 2001: Milano.
4. **Badylak S.F., Taylor D., Uygun K.** “Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds” *Annual review of biomedical engineering* 2011; 15(13): 27-53.
5. **Barry F.P., Boynton R.E., Haynesworth S., Murphy J.M., Zaia J.** “The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 265(1): 134-139.
6. **Barry F.P., Boynton R.E., Liu B., Murphy J.M.** “Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow:

- differentiation-dependent gene expression of matrix components”
Experimental Cell Research 2001; Vol. 268: 189-200.
7. **Bauer T.W., Muschler G.F.** “Bone graft materials: an overview of the basic science” *Clinical Orthopaedic Related Research* 2000; Vol. 371: 10-27.
8. **Beuningen H.M., Van Glasbeek H.L., Kraan P.M., Berg W.B.** “Differential effects of local application BMP-2 or TGF-(beta) on both articular cartilage composition and osteophyte formation”
Osteoarthritis Cartilage 1998; 6(5): 306-317.
9. **Bianchi G., Muraglia A., Daga A., Corte G., Cancedda R., Quarto R.** “Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells” *Wound repair and regeneration*. 2001; Vol. 9(6): 460-468.
10. **Bolanos-Meade J., Vogelsang G.B.** “Mesenchymal stem cells and organ transplantation: current status and promising future”
Trasplantation 2006; 81(10): 1388- 1389.
11. **Bonassar L.J., Vacanti C.A.** “Tissue engineering: the first decade and beyond” *Journal of cellular biochemistry* (Suppl.) 1998; 30:297-303.

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. **Cancedda R., Giannoni P., Mastrogiacomo M.** “A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice” *Biomaterials* 2007; Vol. 28: 4240–4250.
14. **Castro-Malaspina H., Gay R.E., Resnick G., Kapoor N., Meyers P., Chiarieri D., McKenzie S., Broxmeyer H.E., Moore M.A.** “Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny” *Blood* 1980; Vol. 56(2): 289-301.
15. **Chen X.L., Li Z.L., Zhang W.B., Ye Z.C., Ke S.N.** “Experimental study of maxillary sinus lifting with tissue engineered bone” *Zhonghua kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2007; Vol. 42: 610-613.
16. **Chiou M., Xu Y., Longaker M.T.** “Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal stem cells” *Biochemical and biophysical research communications* (2006); 343:644-652.

17.Corti S., Locatelli F., Strazzer S., Guglieri M., Comi G.P.

“Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives of the treatment of acquired and degenerative central nervous system disorders” *Current gene therapy* 2003; 3(3): 247-272.

18.De Vicente J.C., Herná'ndez-Vallejo G., Brana-Abascal P., Pena

I. “Maxillary sinus augmentation with autologous bone harvested from the lateral maxillary wall combined with hydroxyapatite: clinical and histologic observation” *Clinical oral implants research* 2010; Vol. 21: 430–438.

19.Degidi M., Artese L., Rubini C., Perrotti V., Iezzi G., Piattelli A.

“Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using Bio-Oss®” *Oral disease* 2006; Sep; 12(5): 469–475.

20.Dennis J.E., Charbord P. “Origin and differentiation of human and

murine stroma” *Stem cells* 2002; 20:205-214.

21.Di Bello C., Bagno A. “Interazione tra biomateriali e tessuti”

Bologna : Pàtron Editore, 2009.

22. **Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F.** “Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors” *Science* 1998; 279(5356): 1528-1530.
23. **Friedestein A.J., Gorskaja J.F., Kulagia N.N.** “Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hemopoietic organs” *Experimental hematology* 1976; 4: 267-274.
24. **Galindo-Moreno P., Padiál-Molina M., Fernández-Barbero J.E., Mesa F., Rodríguez-Martínez D., O’Valle F.** “Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables” *Clinical oral implants research* 2010; 21(2): 221–227.
25. **Griffith L.G., Naughton G.** “Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities” *Science* 2002; 295: 1009-1014.
26. **Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Storms R.W., Gimble J.M.** “Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells” *Journal of cellular physiology* 2001;189(1): 54-63.

27. **Haas R., Haidvogel D., Dortbudak O., Mailath G.** “Freeze-dried bone for maxillary sinus augmentation in sheep” *Clinical oral implant research* 2002; Vol. 13: 581-586.
28. **Haas R., Mailath G., Dortbudak O., Watzek G.** “Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus augmentation: analysis of interfacial bond strength of dental implants using pull-out tests” *Clinical oral implant research* 1989; Vol. 9: 117-122.
29. **Harvey C., Jan Thorsen S., Arun K.G.** “Beyond the vernacular: new sources of cells for bone tissue engineering” *Plast reconstr surg* 2007; 122:755.
30. **Hasirci V., Lewandrowski K., Gresser J.D., Wise D.L., Trantolo D.J.** “Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application” *Journal of Biotechnology* 2001; Vol. 86: 135-150.
31. **Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A. (International Society for Cellular Therapy)** “Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement” *Cytotherapy* 2005; 7(5): 393-395.

32. **Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M.** “Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow” *Nature* 2002; 418(6893): 41-49.
33. **Jorgensen C., Noel D., Apparailly F., Sany J.** “Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis” *Annals of rheumatic disease* 2001; 60: 305-309.
34. **Kandziora F., Schmidmaier G., Schollmeier G., Bail H., Pflugmacher R., Görke T., Wagner M., Raschke M., Mittlmeier T., Haas N.P.** “IGF-I and TGF-beta1 application by a poly-(D,L-lactide)-coated cage promotes intervertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine” *Spine* 2002; 27(16): 1710-1723.
35. **Kang J.S., Kim N.H.** “The biomechanical properties of deep freezing and freeze-drying bones and their biomechanical changes after in-vivo allograft” *Yonsei medical journal* 1995; Vol. 36(4): 332-335.

36. **Keating J.F., McQueen M.M.** “Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma” *The journal of bone & joint surgery* American edition, 2008; Vol. 83: 3-8.
37. **Kon E., Muraia A., Corsi A., Bianco P., Marcacci M., Martin I., Boyde A., Ruspantini I., Chistolini P., Rocca M., Giardino R., Cancedda R., Quarto R.** “Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones” *Journal of biomedical materials research* 2000; 49(3): 328-337.
38. **Kotton D.N., Ma B.Y., Cardoso W.V., Sanderson E.A., Summer R.S., Williams M.C., Fine A.** “Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium” *Development* 2001; 128(24): 5181-5188.
39. **Krampera M., Cosmi L., Angeli L., Pasini A., Liotta F., Andreini A., Santarlasci V., Mazzinghi B., Pizzolo G., Vinante F., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F.** “Role of the IFN- γ in the immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cell” *Stem Cells* 2005; 24(2): 386-398.
40. **Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F.** “Bone marrow mesenchymal stem cells

inhibit the response of naïve and memory antigen-specific cells to their cognate peptide” *Blood* 2003; 101(9): 3722-3729.

41.Krebsbach P.H., Kuznetsov S.A., Satomura K., Emmons R.V., Rowe D.W., Robey P.G. “Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts” *Transplantation* 1997; 63(8): 1059-1069.

42.Kuzyk P.R.T., Schemitsch E.H., Davies J.E. “Biodegradable Scaffold for the treatment of a diaphyseal bone defect of the tibia” *Journal of orthopaedic research* 2010; Vol. 28: 474-480.

43.Lennon D.P., Haynesworth S.E., Arm D.M., Baber M.A., Caplan A.I. “Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in Vitro and in Vivo osteochondrogenesis” *Developmental Dynamics*. 2000; Vol. 219(1): 50-62.

44.Li Y., Hisha H., Inaba M., Lian Z., Yu C., Kawamura M., Yamamoto Y., Nishio N., Toki J., Fan H., Ikehara S. “Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: a role of stromal cells in positive selection” *Experimental hematology* 2000; 28(8): 950-960.

45. **Locatelli F., Corti S., Donadoni C., Guglieri M., Capra F., Strazzer S., Salani S., Del Bo R., Fortunato F., Bordoni A., Comi G.P.** “Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1- and Sca-1-positive cells” *Journal of hematotherapy & stem cells research* 2003; 12(6): 727-734.
46. **Lucroy, Michael D.** “Advances in canine steosarcoma” Orlando, Florida : North American Veterinary Conference, 1999.
47. **Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., Hardy W.B., Moorman M.A., McIntosh K.R., Mosca J.D.** “Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells” *Journal of biomedical Science* 2003; 10: 228-241.
48. **Martini I., Muraglia A., Campanile G., Cancedda R., Quarto R.** “Fibroblast Growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow” *Endocrinology*. 1997; Vol. 138(10): 4456-4462.
49. **McLaughlin R.M., Roush J.K.** “Autogenous cancellous and cortico-cancellous bone grafting” *Veterinary Medicine* 1998; Vol. 93: 1071-1074.

50. **Minguell J.J., Erices A., Conget P.** “Mesenchymal stem cells”
Experimental biology and medicine 2001;226: 507-520.
51. **Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., Ishino K., Ishida H., Shimizu T., Kangawa K., Sano S., Okano T., Kitamura S., Mori H.** “Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction” *Nature medicine* 2006; 12(4): 459-465.
52. **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” *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* (2005); 25: 2542-2547.
53. **Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang F.F.** “Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of the gliomas” *Cancer research* 2005; 65(8): 3307-3318.
54. **Noort W.A., Kruisselbrink A.B., Anker P.S., Kruger M., van Bezooijen R.L., de Paus R.A., Heemskerk M.H., Lowik C.W., Falkenburg J.H., Willemze R., Fibbe W.E.** “Mesenchymal stem

cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice” *Experimental haematology* 2002; 30(8): 870-878.

55.Ogunsalu, Christopher “Bone Substitutes and Validation” *Implant dentistry- The most promising discipline of dentistry*. s.l. : Prof. Ilser Turkyilmaz (Ed.), 2011.

56.Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. “Bone marrow cells regenerated infarcted myocardium” *Nature* 2001; 410(6829): 701-705.

57.Pereira R.F., Halford K.W., O’Hara M.D., Leeper D.B., Sokolov B.P., Pollard M.D., Bagasra O., Prockop D.J. “Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone cartilage, and lung irradiated mice” *Proceedings of the national academy of sciences* 1995; 92(11): 4857-4861.

58.Petite H., Viateau V., Bensaid W., Meunier A., de Pollak C., Bourguignon M., Oudina K., Sedel L., Guillemain G. “Tissue-engineered bone regeneration” *Nature biotechnology* 2000; 18(9): 959-963.

59. **Pettinicchio M., Traini T., Murmura G., Caputi S., Degidi M., Mangano C., Piattelli A.** “Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans” *Clinical oral investigation* 2010; 16(1): 45-53.
60. **Pokorny J.J., Davids H., Moneim M.** “Vascularized bone graft for scaphoid nonunion” *Tech hand up extrem surg* 2003; Vol. 7: 32-36.
61. **Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L.** “Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells” *Circulation* (2004);109(10): 1292-1298.
62. **Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aquiar D., Koodie L., Verfaillie C.M.** “Purification and ex-vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells” *Blood* 2001; 98(9):2615-2625.
63. **Sanz-Herrera J.A., Doblare´ M., Garcí´a-Aznar J.M.** “Scaffold microarchitecture determines internal bonedirectional growth” *Journal of biomechanics* 2010; Vol. 43: 2480-2486.

- 64.**Schaller O.** *Nomenclatura anatomica veterinaria illustrata*. Roma : Antonio Delfino Editore, 2007.
- 65.**Schultz O., Sittinger M., Haeupl T., Burmerster G.R.** “Emerging strategies of bone and joint repair” *Arthritis research* 2000; 2: 433-436.
- 66.**Sciadini M.F., Lonson K.D.** “Evaluation of human recombinant BMP-2 as a bone graft substitute in a canine segmental defect model” *Journal orthopaedic research* 2000; Vol. 18: 289-302.
- 67.**Sengenès C., Lolmède K., Zakaroff-Girard A., Busse R., BoulOumié A.** “Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult Mesenchymal and hematopoietic stem cells” *Journal of Cell Physiology*. 2005; Vol. 205(1): 114-122.
- 68.**Shafiei Z., Bigham A.S., Dehghani S.N., Torabi Nezhad S.** “Fresh cortical autograft versus fresh cortical allograft effects on experimental bone healing in rabbits: radiological, histopathological and biomechanical evaluation” *Cell Tissue Bank* 2009; Vol. 10: 19-26.

69. **Smiller D.G., Johnson P.W., Lozada J.L., Misch C., Rosenlicht J.L., Tatum O.H. Jr, Wagner J.R.** “Sinus lift grafts and endosseous implants” *Dental clinics of north america* 1992; Vol. 36(1): 151-186.
70. **Stamm C., Westphal B., Kleine H.D., Petzsch M., Kittner C., Klinge H., Schumichen C., Nienaber C.A., Freund M., Steinhoff G.** “Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration” *Lancet* 2003; 361(9351): 45-46.
71. **Stephen F.B., Doris T., Korkut U.** “Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds” *Annual review of biomedical engineering* 2011; 27-53.
72. **Tuan R.S., Boland G., Tuli R.** “Adult mesenchymal stem cell and cell-based tissue engineering” *Arthritis research & therapy* 2003; 5: 32-35.
73. **Urabe K., Itoman M., Toyama Y., Yanase Y., Iwamoto Y., Ohgushi H., Ochi M., Takakura Y., Hachiya Y., Matsuzaki H., Matsusue Y., Mori S.** “Current trends in bone grafting and the issue of banked bone allografts based on the fourth nationwide

survey of bone grafting status from 2000 to 2004” *Journal of orthopaedic science* 2007; Vol. 12(6): 520-525.

74. **Van Heest A., Swiontkowski M.** “Bone-graft substitutes” *Lancet* 1999; Vol. 353: 28-29.

75. **Vogel W., Grunebach F., Messam C.A., Kanz L., Brugger W., Buhning H.J.** “Heterogeneity among human bone marrow derived mesenchimal stem cells and neural progenitors” *Haematologica* 2003; 88(2): 126-132.

76. **Wakitani S., Goto T., Pineda S.J., Young R.G., Mansour J.M., Caplan A.I., Goldberg V.M.** “Mesenchimal-cell based repair of large, full thickness defects of articular cartilage” *The journal of bone & joint surgery (American volume)* 1994; 76(4): 579-592.

77. **Wang M., Crisostomo P., Herring C., Meldrum K.K., Meldrum D.R.** “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” *American journal of physiology Regulatory integrative and comparative physiology* (2006); 291(4): 880-884.

78. **Weibrich, Wagner et al.** *Mund Kiefer Gesichts Chir*, 2000.

79. **Zeng Q., Li X., Beck G., Balian G., Shen F.H.** “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(2): 374-381.