



Cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo in medicina rigenerativa in campo ortopedico

Alberto Combi¹, Giulia Gastaldi², Francesco Benazzo¹

¹Clinica Ortopedica e Traumatologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia, e ²Dipartimento di Scienze Morfologiche, Eidologiche e Cliniche, Sezione di Fisiologia Umana, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

Cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo per la medicina rigenerativa in campo ortopedico

Il tessuto adiposo costituisce una importante fonte di cellule staminali mesenchimali (ASC), cellule in grado di differenziare in molteplici linee cellulari. Esse sono contenute nella frazione stromale vascolare del tessuto adiposo con il vantaggio di un prelievo meno invasivo e quindi associato a minore morbilità rispetto alle cellule mesenchimali ottenute da midollo osseo. Lo scopo di questo studio è l'isolamento, la caratterizzazione e la differenziazione in senso osteogenico delle cellule staminali mesenchimali ottenute da tessuto adiposo. Dopo aver analizzato i *marker* di superficie e la vitalità cellulare, è stata studiata la differenziazione delle cellule staminali ottenute e seminate sia su *monolayer* che su 2 tipi di *scaffold*, in titanio trabecolare e in materiale biomimetico. Dai dati ottenuti è stato possibile osservare che le ASC su *monolayer* sono in grado di differenziarsi in senso osteoblastico: producono una matrice extracellulare mineralizzata, esprimono i geni per le proteine dell'osso e sintetizzano fosfatasi alcalina (ALP), collagene di tipo I, Runx2 e osteocalcina. Inoltre le ASC da noi utilizzate sono in grado di aderire, proliferare e differenziare su entrambi i tipi di *scaffold*, dimostrando così di essere fonte ideale di cellule da poter utilizzare nell'ambito dell'ingegneria tissutale per ripristinare l'anatomia e la funzione del tessuto perso in seguito a malattia, malformazione o traumi.

Mesenchymal stem cells from adipose tissue for regenerative medicine in orthopedics

The vascular stromal fraction of adipose tissue is an important source of mesenchymal stem cells, able to differentiate on multiple cellular lines. The aim of our work is the isolation, characterization and differentiation on osteogenic sense of the mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue. We analyzed surface markers and the cellular vitality, then we studied the differentiation of adipose stem cells seeded on monolayer and on two different types of scaffolds, on trabecular titanium and on biomimetic material. We observed that hASCs seeded on monolayer are able to differentiate in osteogenic sense. They produce a mineralized extracellular matrix, express genes for bone proteins and synthesize alkaline phosphatase (ALP), type I collagen, Runx2 and osteocalcin. Additionally the used hASCs are able to adhere, proliferate and differentiate on both scaffold types. This result clearly shows that hASCs are an ideal source of cells to be used in tissue engineering in order to restore the anatomy and the functionality of the lost tissue because of disease, dismorphism or trauma.

Introduzione

La nascita della medicina rigenerativa è la conseguenza della ricerca di una possibile alternativa alle tradizionali opzioni terapeutiche che per quanto evolute, non possono ritenersi soddisfacenti in molti casi in cui si debba affrontare una importante perdita di sostanza, o di funzione d'organo. In campo ortopedico interventi di ricostruzione del tessuto osseo si rendono necessari in caso di ampie perdite di sostanza, conseguenti a gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, ipoplasie, necrosi ischemiche, lesioni neoplastiche primarie o secondarie. Da alcuni anni la ricerca si è focalizzata sull'impiego di cellule, fattori e *scaffold* biocompatibili per la ricostruzione tissutale, per mimare l'eterogeneità dei tessuti nativi, cioè quella combinazione di elementi cellulari e molecole tessuto specifiche che determinano le peculiari proprietà chimiche, fisiche e meccaniche del tessuto necessarie allo svolgimento della sua propria funzione. L'obiettivo diventa quindi ristabilire la funzione del tessuto o organo, identificando le esigenze meccaniche e strutturali critiche *in situ*, del tessuto da ripristinare, elemento proprio della medicina rigenerativa. Per quanto riguarda il tipo di cellule da utilizzare, sono state scelte le cellule staminali in quanto indifferenziate e capaci di rigenerarsi per tempi prolungati. Le cellule staminali adulte hanno mostrato versatilità e discreto potenziale proliferativo, e per questo ritenute adatte alla rigenerazione tissutale, anche se nelle colture *in vitro* (25-40 passaggi) la "spinta" replicativa decresce progressivamente. Il midollo osseo adulto contiene, oltre a staminali emopoietiche, cellule staminali non-emopoietiche di tipo mesenchimale (*Bone marrow stromal cells* o BMSC). Le cellule staminali mesenchimali hanno la capacità di automantenersi e di differenziarsi in diverse linee cellulari come adipociti, osteoblasti, condroblasti, neuroni, cellule muscolari lisce e striate-scheletriche, cardiomiociti e cellule endoteliali [2-3] e quindi giocano un ruolo fondamentale nell'organogenesi, nel rimodellamento e nella riparazione dei tessuti. Un limite all'utilizzo per la medicina rigenerativa delle BMSC è rappresentato dal fatto che, nell'adulto sano, la componente mesenchimale costituisce solo lo 0,001% circa della popolazione cellulare nucleata del midollo osseo [1]. Inoltre il prelievo di midollo osseo dalla cresta iliaca è un intervento mal tollerato dai pazienti e non scevro da rischi.

Anche la frazione stromale vascolare del tessuto adiposo contiene cellule mesenchimali staminali adulte (ASC) che hanno molte proprietà in comune con quelle derivate dal midollo osseo (BMSC) [4-5]. È stato dimostrato che l'immunofenotipo di superficie di queste due popolazioni di cellule staminali è simile: entrambe subito dopo l'isolamento sono positive per CD10, CD13, CD90 e CD105 [3, 6]. Inoltre, anche le ASC, come le BMSC sono capaci di differenziarsi in osteoblasti [7-8], condroblasti [9-10], neuroni [11-13], cellule muscolari lisce e striate-scheletriche [14], cardiomiociti [15-17] e cellule endoteliali ed emopoietiche [18]. Le ASC sono facilmente reperibili con interventi semplici come la lipoaspirazione, da cui si può ottenere un numero di MSC da 100 a 300 volte superiore rispetto a quello ricavabile da un pari volume di midollo osseo [19-20]. In questo modo sarebbe possibile evitare l'espansione cellulare *in vitro* e ottenere cellule con elevata capacità proliferativa e bassi livelli di senescenza [21-22].

La scelta tra ASC autologhe o allogeniche costituisce un punto critico nei trial clinici. È stato dimostrato che le ASC, analogamente alle BMSC, non esprimono antigeni leucocitari (HLA)-DR [23], essendo di conseguenza meno immunogeniche di altri tipi di cellule. Le ASC non provocano inoltre reazione linfocitica crociata quando coltivate con monociti allogenici prelevati da sangue periferico [24-26], non stimolano risposta immune nel ricevente e sopprimono la risposta linfocito-T citotossica mediata *in vivo* [24] permettendo così trapianti allogenici o potenzialmente, anche xenogenici.

Scopo del lavoro

Lo scopo di questa ricerca è l'isolamento, la caratterizzazione e la differenziazione in senso osteogenico di cellule staminali mesenchimali ottenute da tessuto adiposo (ASC). La differenziazione delle ASC seminate sia su *monolayer* che su *scaffold* sarà valutata con i seguenti metodi:

- dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina;
- valutazione dell'espressione dell'mRNA codificante per alcune proteine specifiche del tessuto osseo come fosfatasi alcalina, collagene di tipo I, RUNX 2 e osteocalcina (BGLAP) mediante RT/PCR;
- studio dell'andamento nel tempo della espressione del gene fosfatasi alcalina con *real time* RT-PCR;
- osservazione al microscopio elettronico a scansione delle cellule cresciute e differenziate sugli *scaffold* di titanio;
- colorazione di von Kossa sulle colture in *monolayer* per evidenziare la deposizione di fosfato di calcio nella matrice secreta dalle cellule differenziate.

Materiali e metodi

Preparazione delle cellule staminali (ASC) derivate da tessuto adiposo umano

Il tessuto adiposo sottocutaneo era prelevato in regione peritrocanterica, previo consenso informato, da pazienti sottoposti ad intervento chirurgico di protesi d'anca. Il tessuto finemente sminuzzato era incubato in terreno DMEM contenente antibiotici e anfotericina in presenza di collagenasi di tipo II 0.01% per 1 h a 37° C in un bagno termostato agitante. Al termine dell'incubazione, la sospensione cellulare era filtrata su filtro con pori di 100 µm per eliminare i detriti tessutali grossolani non ben digeriti. Dopo il blocco della collagenasi con l'aggiunta di 5 volumi di terreno DMEM la sospensione cellulare era centrifugata a 1200 rpm per 10 min a 4°C. Il *pellet* era risospeso in terreno DMEM e nuovamente centrifugato. Il *pellet* risospeso era quindi trattato per 10 min a 4°C con soluzione di lisi (NH₄Cl 0.15M, KHCO₃ 10 mM, EDTA-Na₂ 0.1 mM, pH 7.22) per eliminare i globuli rossi. Dopo l'aggiunta di 5 volumi di terreno DMEM, la sospensione era ulteriormente centrifugata e il *pellet* ottenuto contenente le cellule staminali mesenchimali (ASC) risospeso in terreno di crescita completo (DMEM-F12 HAM, FBS 10%, antibiotici e anfotericina).

Coltura cellulare

Le cellule risospese erano piastrate in fiasche per coltura cellulare e poste in termostato a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5%. Ogni tre giorni il terreno era rinnovato. Al raggiungimento della confluenza le cellule erano staccate dalla fiasca con trattamento con tripsina per 5 min, poi centrifugate per 10' a 1200 rpm e seminate nuovamente in fiasca alla densità di 10x10³/cm². Questo passaggio era ripetuto tre volte. Al terzo passaggio le ASC erano seminate su *monolayer* e su *scaffold*. Per la crescita su *monolayer*, 5x10³/cm² cellule erano seminate su piastre di polistirene in terreno di crescita completo. Per la crescita su *scaffold*, le ASC (5x10⁵ cellule in 50 µl di sospensione) erano deposte sugli *scaffold* messi in *multi-well* da 12 pozzetti e lasciate a 37°C per 2 ore per consentire la loro adesione alla struttura e quindi era aggiunto terreno di crescita completo. Entrambe le colture erano poste in incubatore in atmosfera di CO₂ a 37°C e i terreni erano cambiati ogni tre giorni.

Scaffold

Sono state utilizzate due tipi di *scaffold*:

1. *Scaffold* di titanio trabecolare, caratterizzato da una struttura innovativa multiplanare esagonale simile a quella dell'osso trabecolare, con morfologia e dimensioni ottimizzate per facilitare la vascolarizzazione e quindi l'osteointegrazione. Il diametro medio dei pori del costruito è 640 µm con una porosità del 65%; gli *scaffold* utilizzati erano di forma cilindrica con una altezza di 6 mm e un diametro di 12 mm.
2. *Scaffold* biomimetico, costituito da un dispositivo medico impiantabile, riassorbibile, non attivo, con funzione di sostituto osteocondrale composto da collagene di tipo I ed idrossiapatite biomimetica. Questo materiale è in forma di matrice composita 3D a gradiente, con una superficie liscia che riproduce la cartilagine e uno strato profondo che riproduce la struttura ossea sub-condrale. Dal dispositivo originale erano ritagliati *scaffold* di forma rettangolare di 0.5x0.7 mm. Le cellule erano seminate sulla superficie che riproduce la struttura ossea sub-condrale.

Analisi dei marker di superficie CD73/90/45

Le ASC, dopo il terzo passaggio in tripsina, erano incubate con anticorpi monoclonali specifici per CD73, CD90, e CD45 coniugati con fluorescina isotiocianato (FITC) o con ficoeritrina (PE) per 30 min a 4°C. Le popolazioni cellulari erano centrifugate, risospese in PBS ed analizzate con un citofluorimetro a flusso, e i dati elaborati con il *software* CellQuest. La fluorescenza aspecifica era valutata incubando le cellule con anticorpo non reattivo coniugato a fluorocromo.

Differenziazione osteogenica delle cellule

La differenziazione osteogenica era ottenuta sostituendo il terreno di crescita con terreno osteogenico: alle colture in *monolayer* quando le cellule avevano raggiunto la confluenza, alle colture su *scaffold*, dopo una settimana dalla semina sullo *scaffold*. Il terreno osteogenico aveva la seguente composizione: DMEM-F12 HAM, FBS 15%, beta-glicerofosfato 10 mM, desametasone 100 nM, acido ascorbico 0.05 mM, antibiotici e anfotericina. Il terreno era cambiato due volte alla settimana. Opportune cellule di controllo, sia su *monolayer* che su *scaffold*, erano coltivate per lo stesso periodo con il terreno di crescita completo.

Saggio del metil tetrazolio (MTT)

La vitalità e la proliferazione cellulare erano valutate con il saggio del metil tetrazolio. Per le colture in 3D, dopo 7 giorni dalla semina (tempo 0) e dopo 10 e 21 giorni dal differenziamento gli *scaffold* erano lavati con abbondante PBS e trasferiti in nuove *multi-well*; per le colture su *monolayer*, alla confluenza (tempo 0) e dopo 7, 14, 21 e 28 giorni dal differenziamento le piastre erano lavate con PBS. Ai tempi di coltura stabiliti, un'aliquota di PBS contenente sale bromuro di tetrazolio [3-(4,5-dimethylthiazolyle)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] alla concentrazione di 1 mg/ml di terreno di coltura era aggiunta ad ogni campione e i campioni incubati per 4 h al buio a 37°C in atmosfera di CO₂ 5%. La soluzione di MTT era quindi aspirata e il formazano prodotto solubilizzato con isopropanolo e l'assorbanza letta a 570 nm. I risultati erano espressi come D.O.

Criteri di valutazione della differenziazione osteogenica

Dosaggio della fosfatasi alcalina

L'attività della fosfatasi alcalina delle cellule cresciute su *monolayer* e su *scaffold* in presenza di terreno di crescita e osteogenico era valutata con il metodo di Murer *et al.* [27]. Il contenuto in proteine delle sospensioni cellulari era determinato con il metodo di Lowry *et al.* [28].

Isolamento dell'RNA e RT-PCR

L'RNA totale era estratto dalle cellule cresciute su *monolayer* e su *scaffold* dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di coltura utilizzando l'RNA-Bee™ Isolation Solvent (Tel-Test, Inc., TX, USA). Dall'RNA (1 µg) è stato sintetizzato cDNA a singolo frammento usando gli esameri *random* e la trascrittasi inversa M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA). L'RT-PCR (metodo) era condotta su 2.5 µl di cDNA usando i *primer* specifici per ALP, Coll I, Runx2 e BGLAP (Tabella 1). L'RT-PCR per tutti i trascritti era normalizzata usando come geni *house-keeping* GUSB (Hs_GUSB_1_SG, QuantiTect® Primer Assay QT00046046, Qiagen) e GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, Quanti Tect® Primer Assay QT00079247, Qiagen). I prodotti di PCR erano separati mediante elettroforesi su gel di Agarosio, colorati con etidio bromuro e acquisiti con il sistema di acquisizione d'immagini Image Master VDS (Amersham Biosciences Europa, Italia). I pesi molecolari dei prodotti erano controllati usando il marcatore di peso molecolare DNA V (Roche Molecular Biochemicals, Italia).

Saggio quantitativo con real time RT-PCR (qRT-PCR) per fosfatasi alcalina

La RT-PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) era eseguita usando 1 µl di cDNA, e *primers* specifici, elencati in Tabella 1. È stato utilizzato il MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec) seguendo le istruzioni fornite dalla ditta e utilizzando lo strumento Rotor Gene 6000 (Corbett). Le condizioni di reazione erano le seguenti: denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti; 40 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi; appaiamento a 58°C per 30 secondi, ed estensione a 72°C per 40 secondi. La reazione di PCR è stata normalizzata usando GUSB come gene *house-keeping* (Hs_GUSB_1_SG, QuantiTect® Primer Assay QT00046046, Qiagen). Le quantità relative di mRNA sono state calcolate con il metodo della quantificazione comparativa e i risultati espressi come *fold change* rispetto al valore al giorno 7.

Colorazione di von Kossa

La mineralizzazione della matrice extracellulare deposta dalle cellule su *monolayer* era valutata con la colorazione di Von Kossa dopo 14 e 21 giorni di differenziamento. Per questa analisi, le cellule cresciute e differenziate su vetrini portaoggetti posti in piastrine per colture cellulari erano fissate con una soluzione di etanolo 50% e formaldeide 18% per 30 minuti. Quindi le colture erano incubate con una soluzione di nitrato d'argento 5% sotto raggi UV per 30 minuti, lavate con H₂O distillata e quindi incubate con una soluzione di sodio tiosolfato per 2-5 minuti. I vetrini erano osservati al microscopio ottico Olympus BX50 e le immagini acquisite con una telecamera digitale Nikon sight DS-L2.

Indagine Morfologica mediante Microscopia Elettronica a scansione (SEM)

Gli *scaffold* sono stati osservati al tempo 0 e dopo 21 giorni di differenziamento, per valutare la biocompatibilità del materiale e la produzione di matrice extracellulare. La fissazione degli *scaffold* è stata effettuata con glutaraldeide 2.5% e Tampone Na cacodilato a pH 7.4 per circa 2 ore. Dopo l'immersione dei campioni in solo Tampone Na cacodilato per 30 minuti è stato effettuato il processo di disidratazione con la scala degli alcoli (50°-100°) per circa 15' ciascuno. Successivamente i campioni essiccati all'aria erano metallizzati con oro (grado di purezza 99.9%), sotto un'atmosfera di argon (Sputter coater, Balzer) in modo da poter permettere un'adeguata ricopertura anche della struttura porosa interna. Le osservazioni erano effettuate con un microscopio elettronico a scansione, Cambridge Stereoscan, operante a 20 kV.

Immunofluorescenza

Le colture di cellule in *monolayer* erano fissate in etanolo al 70% a -20° per 10', lavate con PBS 0,1 M e bloccate con BSA al 3% in PBS per 30' a temperatura ambiente. Le cellule erano quindi incubate per 2 h con anticorpi specifici anti-osteopontina e osteocalcina, proteine della matrice extracellulare, lavate con PBS e incubate per 1 h con anticorpo secondario fluorescente. I nuclei erano colorati con DAPI per studiare la distribuzione cellulare.

Analisi Statistica

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard. La significatività delle differenze delle medie era valutata utilizzando il test *t* di Student.

Risultati

Analisi dei marker di superficie

L'analisi al citofluorimetro mostrava che più del 95% delle ASC al terzo passaggio esprimevano i marcatori di staminalità mesenchimale CD73 e CD90 ed erano negative per l'antigene di superficie CD45, tirosin-fosfatasi di membrana, marcatore delle cellule staminali ematopoietiche (Figura 1).

Saggio del metil tetrazolio (MTT)

Nelle colture su *monolayer* la D.O. aumentava nel tempo, con un andamento più ripido nei primi 21 giorni e maggiore per le ASC cresciute in terreno osteogenico rispetto a quelle in terreno di crescita a partire dai 14 giorni di coltura (Figura 2). Le ASC seminate e cresciute su entrambi i tipi di *scaffold* in presenza di terreno osteogenico mostravano un aumento della proliferazione e della vitalità dopo 25 giorni di coltura rispetto al valore misurato al tempo 0 (7 giorni dalla semina e prima del differenziamento) (Figura 3).

Dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP)

L'attività della fosfatasi alcalina era significativamente maggiore ($p < 0.05$) nelle colture cellulari in terreno osteogenico rispetto a quelle in terreno di crescita, sia su *monolayer* che su *scaffold* (Figure 4 e 5). In presenza di terreno osteogenico, l'attività della ALP aveva un andamento crescente nel tempo, a dimostrazione della progressiva differenziazione in senso osteoblastico delle ASC con una attività massima dopo 28 giorni di coltura (Figure 4 e 5). L'attività della ALP delle cellule cresciute su *scaffold* di titanio trabecolare in presenza del terreno di crescita aumentava nel tempo, pur rimanendo sempre inferiore a quella delle ASC cresciute in presenza del terreno osteogenico (Figura 4).

Studio dell'espressione genica

Le ASC cresciute su *scaffold* di titanio trabecolare in presenza del terreno di crescita esprimevano marcatamente l'mRNA codificante per ALP e Collagene di tipo I e in minor misura quello per Runx-2, ma non quello di osteocalcina (Figura 6B). Le ASC cresciute su *scaffold* di titanio e *scaffold* biomimetico in presenza di terreno osteogenico, esprimevano gli mRNA di tutte le proteine valutate (Figure 6A e 7).

Andamento nel tempo dell'espressione dell'mRNA per ALP

L'andamento nel tempo dell'espressione dell'mRNA codificante per ALP è stata valutata nelle ASC seminate su *monolayer* e su *scaffold* di titanio trabecolare e coltivate in terreno di crescita e osteogenico mediante saggio quantitativo con *real time* RT-PCR (qRT-PCR).

Nelle colture su *monolayer* l'espressione dell'mRNA della ALP delle ASC in terreno di crescita diminuiva progressivamente nel tempo; nelle ASC cresciute su *scaffold* sempre in presenza di terreno di crescita c'era un iniziale incremento di circa due volte dopo 14 giorni di coltura che tornava al valore di partenza a 21 giorni dalla semina (Figura 8A). L'espressione dell'mRNA delle cellule coltivate in presenza di terreno osteogenico aumentava di circa 10 volte dopo 14 e 21 giorni nelle colture su *monolayer* e fino a 25 volte in quelle su *scaffold* dopo 21 giorni (Figura 8B).

Colorazione di von Kossa

Dopo 14 giorni di coltura su *monolayer* in presenza di terreno osteogenico si metteva in evidenza la presenza di alcuni piccoli granuli di sali di calcio (Figura 9B), che aumentavano di dimensioni dopo 21 giorni (Figura 9C), a dimostrazione della progressiva mineralizzazione della matrice extracellulare.

Indagine mediante Microscopia Elettronica a scansione (SEM)

La figura 10 mostra uno *scaffold* di titanio trabecolare privo di cellule in cui è evidente la struttura dello *scaffold* con la presenza di pori del diametro di 640 μm , mentre dopo 28 giorni di coltura in terreno osteogenico lo *scaffold* appare completamente rivestito dalle ASC e dalla matrice extracellulare da esse depositata. Le ASC creano ponti di matrice extracellulare che collegano cellule vicine all'interno dei pori fino a chiudere in alcune zone il poro stesso (Figura 11).

Discussione

Il tessuto adiposo sottocutaneo è una fonte di cellule staminali mesenchimali che esprimono i *marker* specifici di staminalità mesenchimale come CD29, CD166, CD105, CD34 e CD45, comunemente usati come *marker* delle cellule staminali della linea emopoietica o delle cellule progenitrici endoteliali, sono invece negativi. Per quanto riguarda l'espressione di CD34, ci sono dati discordanti in letteratura: secondo Oedayrajsingh Varma [29] e Mitchell [20] le ASC possono esprimere questo *marker*, mentre per altri ricercatori queste cellule sono negative; è possibile che nei primi passaggi in coltura alcune cellule ematopoietiche siano ancora presenti [30] e pertanto la positività al *marker* è dovuta alla loro presenza.

Le ASC preparate nel nostro laboratorio erano positive per i *marker* di staminalità mesenchimale CD73 e CD90 e negative per CD45, *marker* delle cellule ematopoietiche, in accordo con Tocci [31]. L'aggiunta di fattori di crescita al terreno di coltura può accelerare la velocità proliferativa dei preadipociti *in vitro* e può indurre la differenziazione cellulare in osteoblasti come dimostra la morfologia simil-osteoblastica, l'espressione della fosfatasi alcalina, la formazione di una matrice extracellulare mineralizzata, e la presenza di proteine della matrice coinvolte nei processi osteogenici [32]. Le ASC che abbiamo utilizzato oltre ad avere caratteristiche di staminalità simili a quelle riportate in letteratura, erano in grado di rispondere alla presenza di fattori osteogenici differenziandosi in senso osteoblastico. Tutti i parametri che sono stati valutati sono risultati positivi: le ASC esprimevano una attività fosfatasi alcalina che aumentava nel tempo ed era significativamente maggiore nelle ASC coltivate in terreno osteogenico rispetto a quelle coltivate in normale terreno di crescita, sia su *monolayer* che su *scaffold*. La fosfatasi alcalina libera fosfato e trasforma il pirofosfato in fosfato che può essere depositato nella matrice extracellulare; è quindi un *marker* del differenziamento osteoblastico ampia-

mente utilizzato [33]. L'indagine morfologica al microscopio elettronico a scansione ha messo in evidenza che le ASC cresciute su *scaffold* di titanio producevano una abbondante e omogenea matrice extracellulare. La deposizione di calcio nella matrice extracellulare è stato evidenziato con la colorazione di von Kossa sulle ASC cresciute su *monolayer* e differenziate con terreno osteogenico. La mineralizzazione della matrice è già presente dopo 14 giorni di differenziamento, ma diventa marcata dopo 21 giorni.

Questa ricerca è stata condotta per valutare anche la capacità delle ASC di aderire, proliferare e differenziare quando seminate su *scaffold* tridimensionali. Sono stati provati due diversi tipi di *scaffold*: titanio trabecolare e un sostituto osteocondrale a base di collagene di tipo I di origine equina e idrossiapatite biomimetica, con proprietà chimiche, chimico-fisiche e biologiche equivalenti a quelle della componente minerale dell'osso umano. La crescita delle ASC su *scaffold* tridimensionali in presenza di terreno osteogenico, che ne induce la differenziazione verso il fenotipo osteoblastico, avviene in condizioni più simili a quelle che si presentano *in vivo* rispetto alle colture *monolayer*. Gli studi effettuati in merito hanno evidenziato l'importanza delle caratteristiche della superficie del materiale per garantire un ambiente adeguato in cui le cellule possano proliferare. Una superficie porosa dello *scaffold* con pori di dimensioni comprese tra 400 e 640 μm supporta le cellule agendo da matrice extracellulare (ECM) temporanea, condizionando le caratteristiche di adesività, crescita e differenziazione cellulare [34]. Anche il tipo di materiale con cui è costruito lo *scaffold* influenza le reazioni cellulari di adesione, migrazione, proliferazione, differenziazione e apoptosi, inducendo cambiamenti nel citoscheletro e condizionando così l'interazione tra le proteine della ECM e il citoplasma cellulare. Il titanio trabecolare ha il vantaggio di avere una elevata resistenza meccanica e una struttura porosa con pori piuttosto grandi che quindi agevolano la crescita delle cellule facilitando lo scambio dei nutrienti. È un materiale che è già ampiamente utilizzato in chirurgia ricostruttiva. Il sostituto osteocondrale ha invece il vantaggio di essere biomimetico e integrabile come collagene nel tessuto nativo, e di fornire un substrato più simile alla matrice extracellulare per l'adesione iniziale delle cellule.

Le ASC da noi utilizzate hanno dimostrato, con il saggio dell'MTT, di poter aderire e proliferare indifferentemente su entrambi i tipi di *scaffold*. Inoltre le ASC in presenza di terreno osteogenico erano in grado di differenziarsi in senso osteoblastico come dimostrato dagli studi di espressione genica effettuati con la tecnica della RT-PCR. Le ASC cresciute su entrambi i tipi di materiale esprimevano tutti gli mRNA delle proteine specifiche della matrice ossea extracellulare considerate: ALP, Collagene di tipo I, Runx-2 e osteocalcina. Da sottolineare che anche le ASC cresciute sugli *scaffold* di titanio trabecolare in assenza di fattori osteogenici erano in grado di esprimere gli mRNA di ALP, Collagene di tipo I, Runx2, ma non dell'osteocalcina. Si può ipotizzare che il titanio trabecolare abbia un potenziale osteoinduttivo, ma che non sia in grado di favorire la mineralizzazione quando non sono presenti substrati donatori di fosfato nel terreno di coltura, come il β -glicerofosfato.

Tabelle e figure

Tabella 1. Sequenza dei *primer* per la reazione di trascrittasi inversa-polimerasi (RT-PCR).

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	cDNA (Nucleotidi)
Collagene tipo I [35]	TGTAAGCGGTGGTGGTTATG	GGTAGCCATTTCTTGGAAG	451
Collagene tipo I [36]	CAGCCGCTTCACCTACAGC	TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC	83
BGLAP	TACCTGTATCAATGGCTGG	GAGTTTATTTGGGAGCAGCT	294
BGLAP	CTCACACTCCTCGCCCTATT	TCTCTTCACTACCTCGCTGC	135
Runx-2c	GGACGAGGCAAGAGTTTCAC	TGCCTGCCTGGGGTCTGTAA	300
ALP[37]	AGCCCTTCACTGCCATCCTGT	ATTCTCTCGTTCACCGCCAC	68

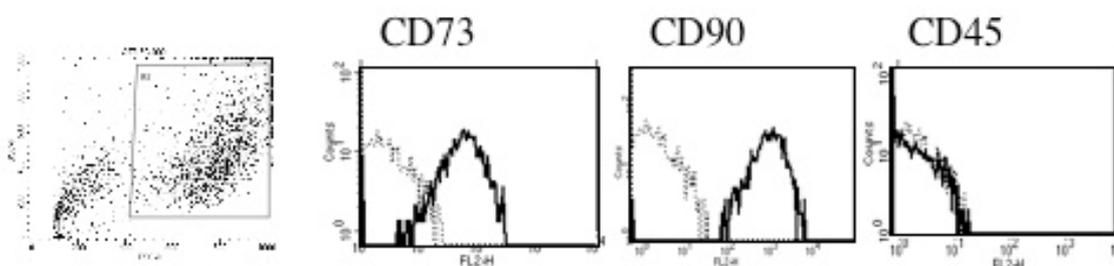


Figura 1. Caratterizzazione citofluorimetrica delle ASC ottenute da tessuto adiposo sottocutaneo umano dopo il terzo passaggio. Le cellule erano positive ai *marker* di staminalità mesenchimale CD 73 e CD 90, e negativi al *marker* delle cellule progenitrici della linea ematopoietica CD 45.

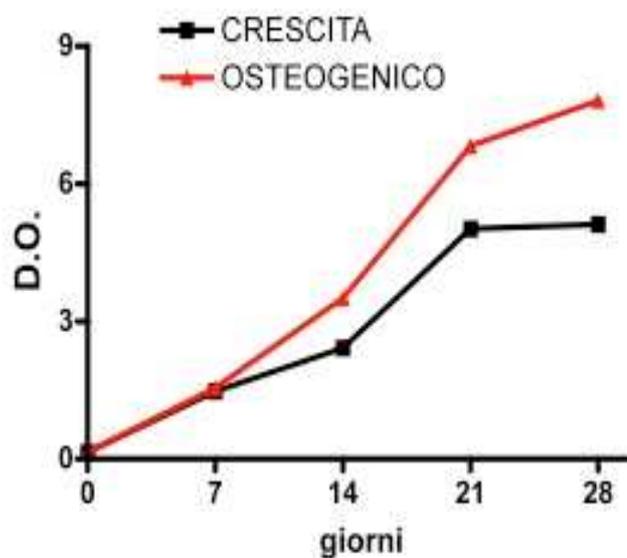


Figura 2. Andamento nel tempo della crescita delle ASC su *monolayer* in presenza di terreno di crescita e osteogenico. Ogni dato è la media di 3 diverse popolazioni cellulari.

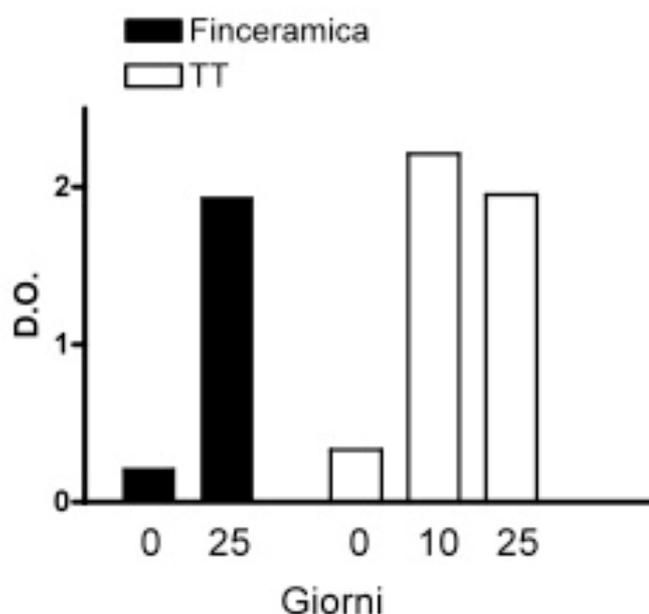


Figura 3. Vitalità e proliferazione delle ASC seminate e cresciute su *scaffold* di titanio trabecolare e biomimetico in presenza di terreno osteogenico.

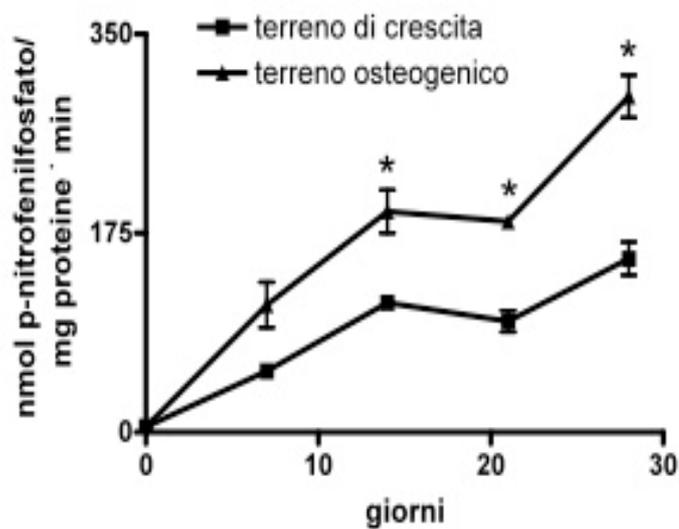


Figura 4. Andamento nel tempo dell'attività della fosfatasi alcalina delle ASC seminate e cresciute su *scaffold* di titanio trabecolare in presenza di terreno di crescita e di terreno osteogenico. Ogni dato è la media \pm e.s. di 3 diverse preparazioni cellulari. Quando e.s. non è presente è compreso nelle dimensioni del simbolo (Abbreviazioni: * $p \leq 0.05$ rispetto al terreno di crescita).

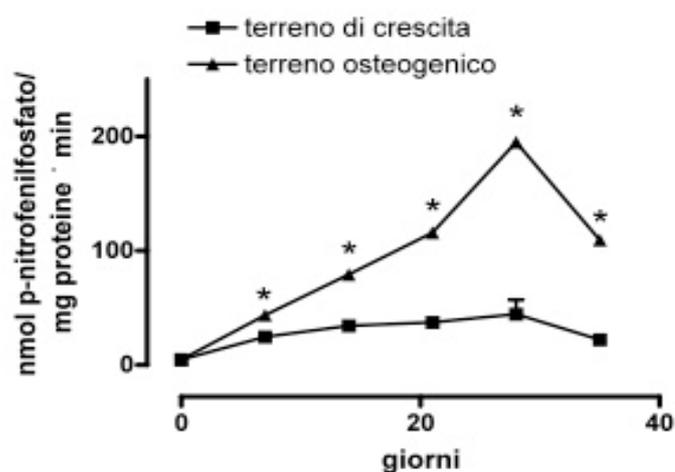


Figura 5. Andamento nel tempo dell'attività della fosfatasi alcalina delle ASC seminate e cresciute su *monolayer* in presenza di terreno di crescita e di terreno osteogenico. Ogni dato è la media \pm e.s. di 3 diverse preparazioni cellulari. Quando e.s. non è presente, è compreso nelle dimensioni del simbolo (Abbreviazioni: * $p \leq 0.05$ rispetto al terreno di crescita).

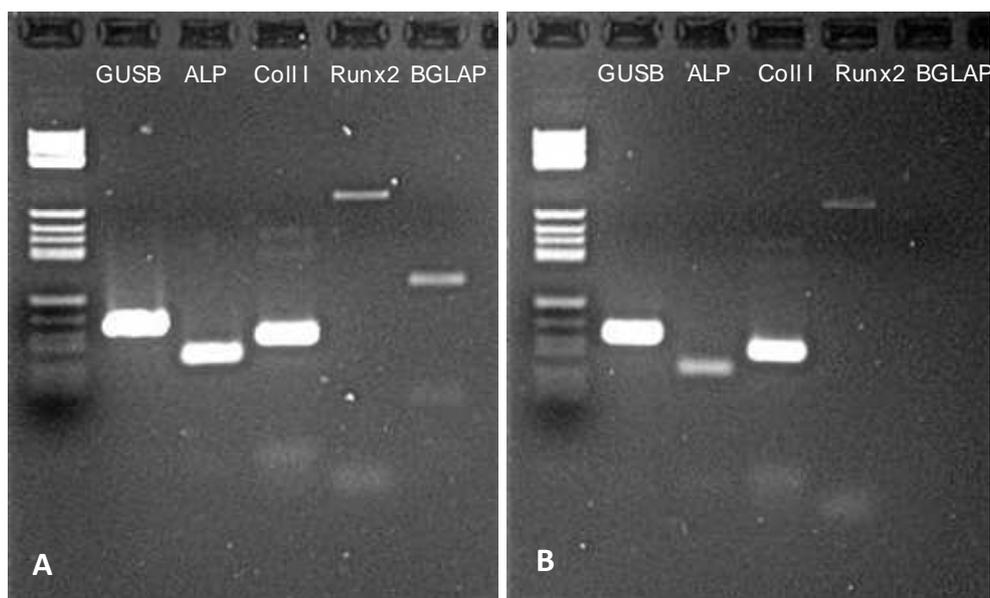


Figura 6. Espressione dell'mRNA di ALP, Collagene tipo I, Runx-2, osteocalcina (BGLAP) delle cellule seminate su *scaffold* di titanio trabecolare e coltivate per 28 giorni in presenza di terreno osteogenico (A) e di crescita (B).

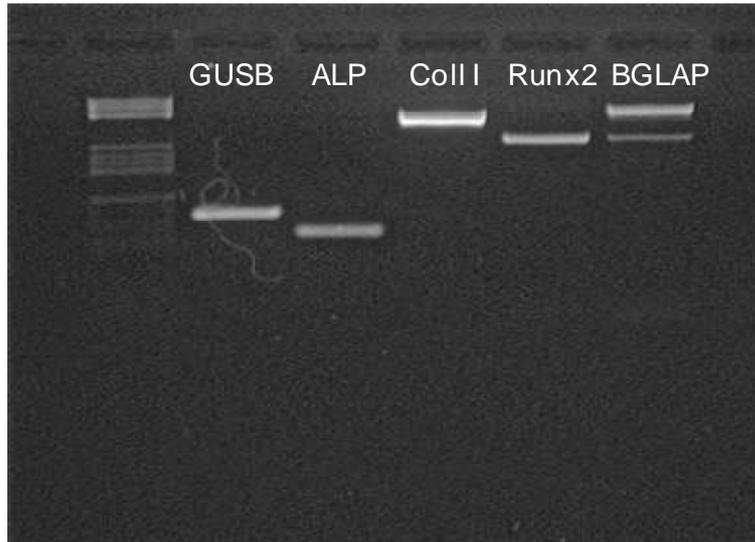


Figura 7. Espressione dell'mRNA di ALP, Collagene di tipo I, Runx-2, osteocalcina (BGLAP) delle cellule seminate su *scaffold* biomimetico e differenziate per 28 giorni in presenza di terreno osteogenico.

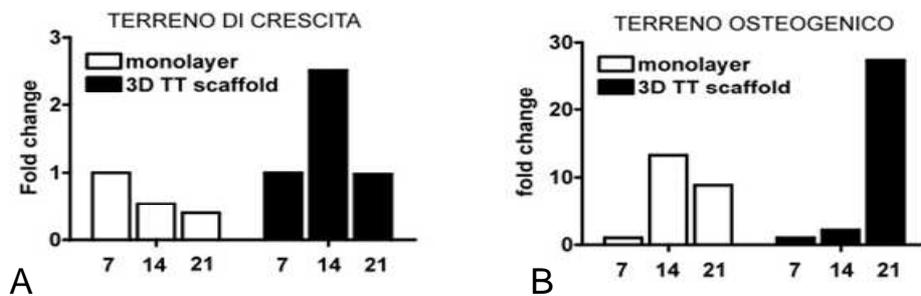


Figura 8. Andamento nel tempo della espressione dell'mRNA per ALP su ASC coltivate su *monolayer* e *scaffold* di titanio in presenza di terreno di crescita e terreno osteogenico.

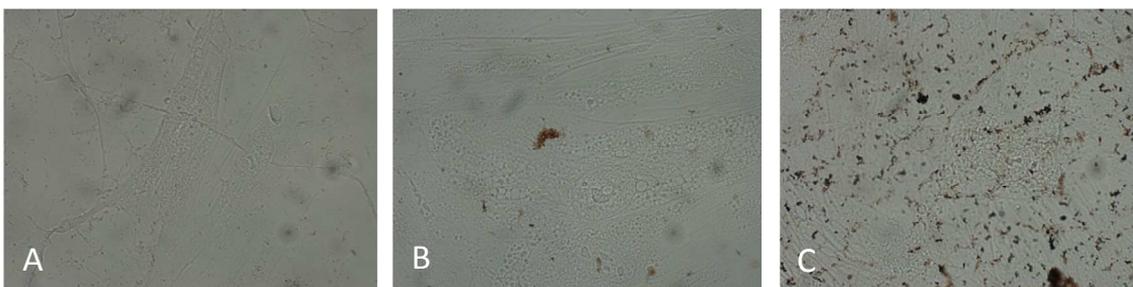


Figura 9. ASC su *monolayer* al tempo 0 (A); ASC su *monolayer* coltivate in presenza di terreno osteogenico per 14 giorni (B); ASC su *monolayer* coltivate in presenza di terreno osteogenico per 21 giorni (C).

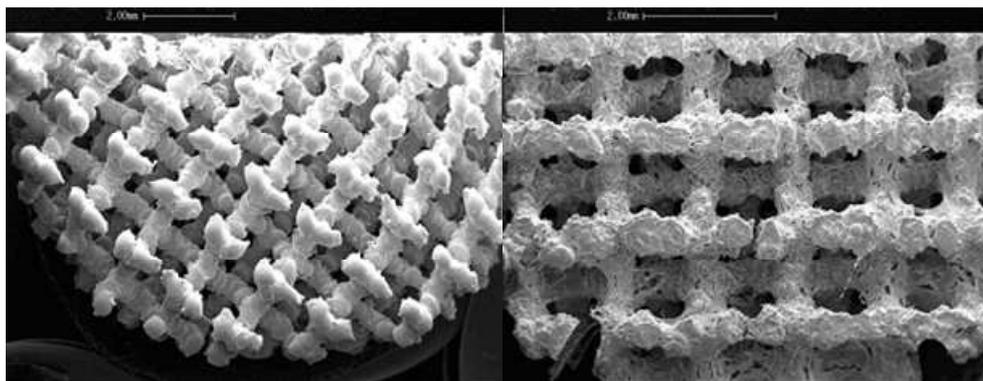


Figura 10. Microscopia Elettronica a scansione (SEM) di scaffold di titanio trabecolare. A sinistra scaffold privo di cellule; a destra scaffold con ASC adese alla superficie e all'interno dei pori (Ingrandimento 16x).

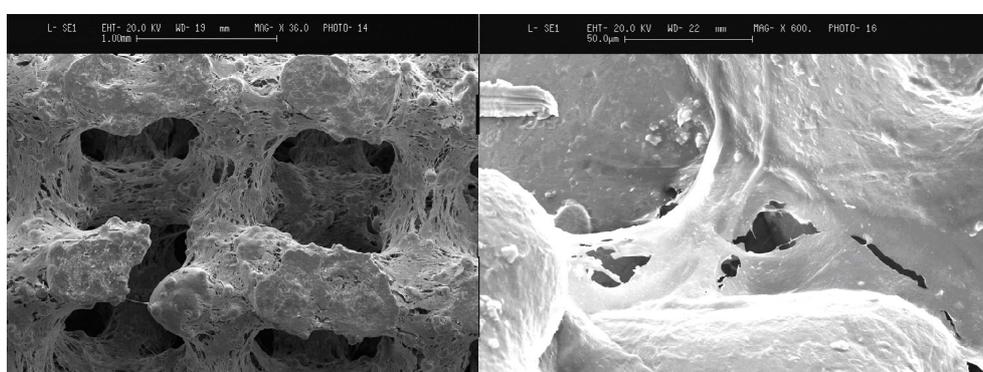


Figura 11. SEM di ASC cresciute sulla superficie e all'interno degli scaffold di titanio trabecolare in presenza di terreno osteogenico per 28 giorni (Ingrandimenti: 36x a sinistra e 600x a destra).

Bibliografia

1. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;1:429-435.
2. Romanov Yu A, Darevskaya AN, Merzlikina NV et al. Mesenchymal Stem cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Characterization, and Differentiation Potentialities. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2005;3:158-163.
3. Dicker A, Le Blanc K, Åstrom G et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental Cell Research* 2005;308:283-290.
4. Wagner W, Wein F, Seckinger A et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cordblood. *Exp Hematol* 2005;33:1402-1416.
5. Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:311-324.
6. Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsdal K et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Molecular Biology of the Cell* 2005 16:1131-1141.
7. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stroma cells. *Tissue Eng* 2001;7:729-741.
8. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS et al. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 2004;10:371-380.
9. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:763-769.
10. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 2006;54:1222-1232.
11. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:1922-1931.

12. Safford KM, Hicok KC, Safford SD et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:371-379.
13. Safford KM, Safford SD, Gimble JM et al. Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol* 2004;187:319-328.
14. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:199-209; discussion 210-211.
15. Planat-Benard V, Menard C, Andre M et al. Differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004;94:223-229.
16. Rangappa S, Fen C, Lee EH et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003;75:775-779.
17. Song YH, Gehmert S, Sadat S et al. VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:999-1003.
18. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
19. Fraser JK, Wulur I, Zeni A et al. Fat tissue an under appreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 2006;24:150-153.
20. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated markers. *Journal of Cellular Physiology* 2006;208:64-67.
21. Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic Potential and Future Clinical Perspective of Human Processed Lipoaspirate Cells. *Journal of Nippon Medical School* 70:1:300-306.
22. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO et al. Adipose-derived stromal cells heal critical-size mouse calvarian defects. *Nature Biotechnology* 2004;22:560-567.
23. Strem BM, Hicok KC, Zhu M et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005;54:132-141.
24. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;100:1249-1260.
25. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006;24:1246-1253.
26. Puissant B, Barreau C, Bourin P et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005;129:118-129.
27. Murer H, Ammann E, Biver J et al. The Surface membrane of the small intestinal epithelial cell. I localization of adenylyl cyclase. *Biochim Biophys Acta* 1976;433:509-519.
28. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:443-449.
29. Oedayrajsingh Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006;8:166.
30. Yanxia Z, Tianqing L, Kedong S et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 2008;26:664-675.
31. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 2003;4:92-96.
32. Elabd C, Chiellini C, Massoudi A et al. Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;361:342-348.
33. Luu HH, Song WX, Luo X et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007;25:665-667.
34. Evans ND, Gentleman E, Polak JM. Scaffolds for stem cells. *Mater Today* 2006;9:26-33.
35. Makela JK, Vuorio T, Vuorio E. Growth-dependent modulation of type I collagen production and mRNA levels in cultured human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1990;1049:171-176.
36. Frank Frank O, Heim M, Jakob M et al. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 2002;85(4):737-746.
37. Ferreira-Tojais N, Bourget C, Bareille R et al. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells J. *Cell Biochemistry* 2009;106:390-398.