



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE
INDIRIZZO: PATOLOGIA E CLINICA DELL'APPARATO
LOCOMOTORE E DEI TESSUTI CALCIFICATI

CICLO XXVI°

COORDINATORE Prof. Giacomo Laffi

**“COLTURE *IN VITRO* DI CELLULE STAMINALI
MESENCHIMALI UMANE DA TESSUTO ADIPOSO E DA
MIDOLLO OSSEO: ALLESTIMENTO, CARATTERIZZAZIONE
ED EFFETTI DI Sr^{2+} SULLA PROLIFERAZIONE E
DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA”.**

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

Dottorando

Dott.ssa Valeria Nardone

Tutore

Prof.ssa Maria Luisa Brandi

Coordinatore

Prof. Giacomo Laffi

Anni 2011/2013

A mio marito Nicola

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 CELLULE STAMINALI

1.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

1.3 CELLULE STAMINALI ADULTE

1.4 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA MIDOLLO OSSEO E DA TESSUTO ADIPOSO E LORO CARATTERIZZAZIONE

1.5 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NELLA RIGENERAZIONE OSSEA:

1.5.1 TESSUTO OSSEO

1.5.2 RIMODELLAMENTO OSSEO

1.5.3 IMPIEGO TERAPEUTICO DELLE MSCs

1.6 RANELATO DI STRONZIO E SUO MECCANISMO D'AZIONE

2. SCOPO DELLA TESI

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

3.1.1 MATERIALI

3.1.2 METODICA DI ISOLAMENTO DELLE hMSCs DA TESSUTO ADIPOSO

3.1.3 METODICA DI ISOLAMENTO DELLE hMSCs DA MIDOLLO OSSEO

3.2 CURVE DI CRESCITA

3.2.1 DEFINIZIONI

3.2.2 CINETICA DI UNA POPOLAZIONE IN CULTURA

3.2.3 CURVA DI CRESCITA: ALLESTIMENTO E CONTEGGI

3.2.4 ANALISI STATISTICA

3.3 CARATTERIZZAZIONE E VALUTAZIONE DELLA MULTIPOTENZA DELLE LINEE CELLULARI

3.3.1 DIFFERENZIAZIONE ADIPOGENICA

3.3.1.1 Materiali

3.3.1.2 Metodica

3.4 DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA

3.4.1 Materiali

3.4.2 Metodica

3.5 COLORAZIONE CITOCHIMICA DELL'ALP

3.5.1 Materiali

3.5.2 Metodica

3.6 COLORAZIONE ISTOCHEMICA DEI DEPOSITI DI HA

3.6.1 COLORAZIONE CON ALIZARINA RED S

3.6.1.1 Materiali

3.6.1.2 Metodica

3.6.2 COLORAZIONE CON CALCEINA

3.6.2.1 Materiali

3.6.2.2 Metodica

3.7 MICROSCOPIA CONFOCALE A SCANSIONE LASER

3.8 DOSAGGI

3.8.1 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DELL'ALP SUL SOPRANATANTE DI
CELLULE IN CULTURA MEDIANTE LETTORE DI PIASTRE

3.8.1.1 Materiali

3.8.1.2 Metodica

3.8.2 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DI HA

3.8.2.1 Materiali

3.8.2.2 Metodica

4. RISULTATI

4.1 ANALISI DELLA CRESCITA CELLULARE IN PRESENZA DI Sr^{2+}

4.2 VALUTAZIONE DELLA MULTIPOTENZA

4.3 DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA

4.3.1 ATTIVITA' ENZIMATICA DELL'ALP

4.3.2 FORMAZIONE DEI DEPOSITI DI HA

4.4 DOSAGGI

4.4.1 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DI ALP SUL SOPRANATANTE DI
CELLULE IN CULTURA

4.4.2 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DI HA

5. COLCUSIONI

6. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 CELLULE STAMINALI

Uno dei campi più interessanti e promettenti della ricerca biomedica e biotecnologica degli ultimi anni è quello legato allo studio delle cellule staminali. Esse sono presenti durante tutto l'arco della vita di un individuo e, grazie al loro potere differenziativo, svolgono un ruolo importante sia nello sviluppo da embrione a organismo pluricellulare, mediante la costruzione di tessuti ed organi dotati di una propria funzione specifica, sia, a tutte le età, nei fenomeni riparativi di parti lesionate od esaurite per il processo di invecchiamento cellulare.

Una delle caratteristiche primarie delle cellule staminali è quella di essere cellule altamente indifferenziate. Con il termine “indifferenziate” si indica l'assenza di caratteristiche morfologiche, antigeniche e funzionali che sono invece tipiche delle cellule mature o differenziate a cui le cellule staminali danno origine.

Le cellule staminali hanno due caratteristiche fondamentali:

- la capacità di auto-rinnovarsi (self-renewal, dando origine a nuove cellule staminali);
- la potenzialità di differenziare in vari tipi cellulari in risposta ad opportuni stimoli ed in determinate condizioni sia fisiologiche che sperimentali (1,2).

In base alle loro potenzialità differenziative, le cellule staminali possono essere classificate in:

- **Cellule Staminali Totipotenti:** cellule staminali in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale, dando infatti origine a tutti i tessuti

di un organismo, incluse le cellule germinali (3). Queste cellule derivano da embrioni allo stadio di 4-8 cellule, dopo 1-3 giorni dalla fecondazione;

- **Cellule Staminali Pluripotenti:** cellule embrionali allo stadio di blastocisti, dopo 4-14 giorni dalla fecondazione. Queste cellule sono capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre diversi foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma); sono in grado di dare origine a tutti i tessuti, ma non alle cellule germinali;
- **Cellule Staminali Germinali:** sono cellule staminali pluripotenti (cellule riproduttive progenitrici). Nell'embrione post-impianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se difficile è il loro isolamento. Queste cellule rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi e compaiono nell'embrione di topo e umano, alla 1° e 3° settimana di sviluppo, rispettivamente. Se isolate, queste cellule sono in grado, come le cellule staminali embrionali, di replicarsi illimitatamente *in vitro* mantenendo capacità differenziative pluripotenti;
- **Cellule Staminali Multipotenti:** sono cellule presenti nell'individuo adulto che hanno la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in coltura, ma non quella di rinnovarsi in modo illimitato, hanno capacità riproduttiva e differenziativa limitata solo verso alcuni stipiti cellulari, infatti differenziano in tessuti diversi ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale. Le prime cellule staminali multipotenti studiate sono state quelle ematopoietiche estratte dal midollo osseo. Tali cellule sono progenitrici di tutta la parte corpuscolata del sangue e del sistema immunitario (4). Tra le cellule staminali adulte sono comprese anche le cellule staminali fetali o FSCs (Fetal Stem Cells), presenti negli abbozzi degli organi fetali e le staminali neonatali o NSCs (Neonatal Stem Cells), isolabili dal cordone ombelicale e dal liquido amniotico.

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

1.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule Staminali Embrionali Umane (*human Embryonic Stem Cells* o hESCs) furono descritte per la prima volta nel 1998 dopo essere state isolate dalle masse cellulari interne di blastocisti umane, donate a scopi di ricerca. La blastocisti assume quindi un ruolo fondamentale nel campo della ricerca delle cellule staminali embrionali (ESCs) e della medicina rigenerativa, in quanto dalla sua componente definita Inner Cell Mass (ICM) sono comunemente isolate le hESCs, cellule pluripotenti che se coltivate *in vitro* in presenza di fibroblasti, citochine e LIF (*leukemia inhibitory factor*) (5), possono moltiplicarsi sino a formare delle colonie di cellule ESCs, le quali, se mantenute in condizioni ottimali, continueranno a proliferare rimanendo indifferenziate ed in uno stato diploide, se invece le condizioni di coltura verranno modificate, tenderanno a differenziarsi spontaneamente. Per quanto riguarda il potenziale differenziativo le hESCs, possono formare, *in vitro*, i Corpi Embrioidi (o *Embryoid Bodies*, EBs, aggregati multicellulari tridimensionali, composti da cellule differenziate ed indifferenziate) composti da una notevole varietà di tipi cellulari morfologicamente diversi (6): cardiomiociti con contrazione ritmica, cellule neuronali con assoni e dendriti in crescita, cellule mesenchimali ed altri tipi cellulari (processo che non avviene *in vivo*). E' necessario sottolineare che uno dei problemi di più difficile risoluzione è legato alla straordinaria capacità proliferativa delle cellule ESCs che *in vivo* possono formare tumori o differenziarsi in tipi cellulari non desiderati, mentre *in vitro* è possibile dirigere la differenziazione delle ESCs verso uno specifico tipo

cellulare. Infatti, numerosi studi hanno dimostrato che quando le cellule ESCs vengono iniettate *in vivo* in blastocisti ospiti o in topi SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) (7) formano teratomi benigni composti da tessuti originati da cellule altamente differenziate e rappresentative dei tre foglietti germinali (ectoderma: epiteli neuronali; mesoderma: osso, cartilagine, muscolo striato, tubuli renali; endoderma: epiteli intestinali).

1.3 CELLULE STAMINALI ADULTE

Le cellule staminali adulte, *Adult Stem Cells*, sono cellule indifferenziate localizzate nei tessuti di un organismo adulto con capacità di self-renewal e di differenziare in cellule specifiche appartenenti a linee cellulari dello stesso foglietto germinativo. Le *Adult Stem Cells* persistono durante la vita di un individuo e la loro funzione fisiologica consiste nel mantenere e riparare il tessuto nel quale si trovano, in risposta ad eventi traumatici o al naturale turnover cellulare (8).

Le cellule staminali adulte sono note fin dagli anni sessanta quando si scoprì la presenza di due diversi tipi di cellule staminali all' interno del midollo osseo:

- le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che danno origine ai vari tipi di cellule del sangue.
- le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells o MSCs) o cellule stromali del midollo osseo che danno origine a osteociti, condrociti, adipociti e altre cellule del tessuto connettivo (9-11).

La presenza di tali cellule è stata scoperta anche in organi considerati da sempre privi di capacità rigenerativa come il cervello e il cuore (12,13).

Le cellule staminali adulte sono state trovate in quasi tutti gli organi ad esempio nel midollo osseo, nei vasi sanguigni, nello scheletro, nei muscoli, nella polpa dentale, nella pelle e nel fegato, ecc., ma il numero di queste cellule è molto basso. All'interno di questi organi le cellule staminali risiedono in particolari micro-ambienti chiamati nicchie. Nella "nicchia" il numero di cellule staminali rimane costante e, in tale sede, le cellule si auto mantengono in stato quiescente, finché non vengono attivate da stimoli proliferativi da parte del tessuto, ad esempio in caso di danno tissutale, con conseguente proliferazione e migrazione delle cellule staminali all'esterno della nicchia andando incontro al differenziamento (14,15). Queste nicchie protettive contengono anche diversi tipi di cellule specializzate che secernono particolari fattori e organizzano la matrice extra-cellulare in modo tale da permettere alle cellule staminali stesse di mantenere la capacità di self-renewal o di andare incontro ad un eventuale differenziamento. Inizialmente si credeva che la capacità differenziativa delle cellule staminali adulte fosse piuttosto limitata e che potessero dare origine solo a cellule con caratteristiche strutturali e funzionali specifiche del tessuto di appartenenza. Diversi esperimenti hanno dimostrato invece che alcuni tipi di cellule staminali adulte sono multipotenti cioè in grado di differenziare in diversi tipi cellulari.

1.4 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA MIDOLLO OSSEO E DA TESSUTO ADIPOSO E LORO CARATTERIZZAZIONE

Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs) sono una popolazione di cellule staminali adulte non ematopoietiche, dotate di potenziale di self-renewal a lungo termine, inizialmente isolate dal midollo osseo come elementi aderenti, altamente proliferanti e in grado di differenziare in vari tipi cellulari di origine mesenchimale

quali condrociti, osteoblasti, adipociti e mioblasti (16). Queste cellule sono state riconosciute per la prima volta più di 40 anni fa da Friedenstein A.J. et al., che descrivevano una popolazione di cellule di midollo osseo di aspetto simile ai fibroblasti, in grado *in vitro* di differenziare in cellule tipiche della linea mesenchimale (17) mediante l'utilizzo di terreni specifici (18). Negli ultimi anni è stata dimostrata anche la loro capacità di differenziare, *in vitro* e *in vivo*, in cellule neuronali (19), epatociti (20), cellule muscolari scheletriche (21), cellule cardiache (22).

Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) sono state successivamente identificate anche in altri tessuti, quali muscolo, tessuto connettivo, tessuto adiposo e diversi tessuti fetali. Anche il fluido amniotico e la placenta sono risultati essere ricchi di MSCs (23,24). Alcuni fattori tissutali, inoltre, come il *basic fibroblast growth factor* (bFGF) o l'*heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor* (hb-EGF), sembrano in grado non solo di incrementare la proliferazione, ma anche d'interferire con la capacità differenziativa delle MSCs, mantenendole nello stato di multipotenzialità (25).

Le MSCs adulte vengono isolate ed espanse *ex vivo*, da agoaspirati di midollo osseo e sono caratterizzate da una morfologia eterogenea. In particolare, le MSCs poste in coltura vengono isolate sfruttando la loro capacità di aderire alla plastica e sono facilmente identificabili in quanto formano colonie di cellule aderenti caratterizzate dalla tipica morfologia fibroblastoide.

Le cellule staminali (*Stem Cells, SCs*) da midollo osseo (*Bone Marrow Stem Cells, BMSCs*) si dividono in due popolazioni con distinta progenie:

- cellule staminali emopoietiche (HSCs)
- cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BMMSCs)

Le MSCs, cellule pluripotenti, rappresentano circa 0,001-0,01% della popolazione di cellule nucleate del midollo osseo e hanno capacità differenziative verso la linea fibroblastica, osteoblastica, adipocitaria, condrocitaria, mioblastica (16,26).

Le MSCs rappresentano le candidate ideali per lo sviluppo di future terapie cellulari e geniche in quanto:

- sono facilmente ottenibili da tessuti adulti e quindi il loro utilizzo non presenta problematiche di carattere etico, a differenza delle staminali embrionali;
- possono essere espanse rapidamente *in vitro* per numerose generazioni, senza perdere il fenotipo o la capacità differenziativa;
- presentano scarsa immunogenicità in quanto sono in possesso di un fenotipo superficiale scarsamente riconosciuto dalle cellule di tipo T (assenza di MHC II) (27) con conseguente scarsa reazione di rigetto nei trapianti autologhi ed allogenici (28);
- sono in grado di migrare verso i tessuti danneggiati e i siti d'infiammazione.

Nonostante la maggior parte dei dati pubblicati si riferiscono a colture cellulari ottenute da midollo osseo, si sta raccogliendo un sempre maggior numero di informazioni sulle MSCs ottenute da fonti alternative come ad esempio il tessuto adiposo. Queste cellule condividono, *in vitro*, molte delle caratteristiche delle MSCs da midollo osseo: l'aderenza alla plastica, la morfologia fibroblastoide, la formazione di CFU-F (Fibroblast Colony-Forming Units), alcuni markers superficiali ed il potenziale differenziativo in senso osteogenico, adipogenico e condrogenico in seguito ad appropriati stimoli.

I possibili futuri vantaggi dell'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo (ADSCs) derivano dalla loro maggiore abbondanza rispetto alle BMMSCs nel tessuto di origine: il rapporto di BMMSCs nel midollo osseo è

approssimativamente di 1 su 25000-100000 cellule nucleate, mentre la frequenza di ADSCs nel tessuto adiposo è di circa il 2% delle cellule nucleate (29). Per di più, mentre il midollo osseo può essere ottenuto in quantità limitata, il tessuto adiposo è solitamente ottenibile in abbondanza. Un altro aspetto importante è la sicurezza della procedura del prelievo del tessuto, che è nettamente superiore per il prelievo di tessuto adiposo (liposuzione) rispetto a quello di midollo osseo che viene effettuato mediante una procedura notevolmente invasiva (ago aspirato).

Per l'abbondanza ed accessibilità delle ADSCs, pertanto, l'utilizzo delle cellule staminali di origine adiposa risulta preferibile a quelle di midollo osseo sebbene la potenzialità terapeutica delle ADSCs e delle BMMSCs sia virtualmente identica. Le ADSCs quindi sembrano rappresentare una valida fonte di cellule progenitrici mesodermiche da utilizzare nella terapia cellulare e genica e nella riparazione tissutale. In particolare, al fine di poter arrivare al loro utilizzo terapeutico, le ADSCs possono essere utilizzate come un prezioso modello sperimentale per studiare i meccanismi a cui sono soggette le regolazioni della differenziazione (30,31).

Attualmente, non esiste una definizione comunemente accettata di cellula staminale mesenchimale. Gli unici criteri fissati dall'International Society for cellular therapy, per poter definire una cellula staminale mesenchimale sono rappresentati dalla loro capacità di aderire alla plastica e dall'espressione positiva e negativa di determinati antigeni che devono o meno essere espressi sulla superficie delle cellule stesse. È stato dimostrato in numerosi studi di caratterizzazione su diversi antigeni di superficie cellulare quali marcatori non vengono espressi dalle MSCs, mentre non è stato possibile raggiungere un consenso univoco per quanto riguarda la determinazione di un marcatore positivo che sia in grado di identificarle in maniera inequivocabile. Unanime è il consenso che nell'uomo adulto le MSCs non esprimono i marcatori ematopoietici quali: CD11 (granulociti), CD14 (macrofagi), la glicoforina A (un marcatore eritroide),

CD34 (marcatore precoce di staminali ematopoietiche), CD45 (marcatore della linea ematopoietica); non esprimono i marcatori endoteliali come il CD31, mentre esprimono alcuni marcatori stromali quali: CD29 o subunità β del recettore per la fibronectina, CD44 (molecola di adesione cellulare), CD71 (recettore per la Transferrina), CD73 (SH3/4, ecto-5' nucleotidasi di membrana) (32) CD90 (Thy-1) (33), CD105 (SH2, endoglina, evidenziata per la prima volta da Haynesworth 1992) (34), CD106 (VCAM-1, molecola di adesione per cellule vascolari) e CD166 (ALCAM, molecola di adesione per leucociti) (35). Le MSCs, anche dopo espansione *in vitro*, mantengono l'espressione di antigeni di superficie come il CD105, CD90, CD73 e CD44, marcatori risultati uniformemente e fortemente espressi sulle MSCs isolati da tessuti di diversa origine (36,37). Uno dei primi lavori di fenotipizzazione delle MSCs è stato effettuato da midollo osseo umano nel 1991 da Simmons et al.,(38) evidenziando la presenza dell'antigene STRO-1, una proteina di superficie cellulare espressa sulle cellule stromali midollari e sui precursori eritroidi, tale marcatore non risulta però essere espresso nelle MSCs del sangue periferico (39).

Come accennato precedentemente, il fenotipo delle MSCs non è sempre univoco e la variabilità con cui certi antigeni vengono più o meno espressi può:

- essere influenzata da fattori secreti da altre cellule presenti nei passaggi iniziali durante l'isolamento *in vitro* (40);
- dipendere dal grado di differenziamento delle MSCs (33);
- dipendere dall'ambiente in cui esse crescono: *in vitro* l'espressione di alcuni marker non sempre è correlata con la loro espressione *in vivo* (41).

Esiste, inoltre, una variabilità di espressione dei marker dovuta al tipo di tessuto dal quale le MSCs vengono isolate, al metodo di isolamento e di coltura ed alle diverse specie animali dalle quali vengono estratte (42,43).

1.5 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NELLA RIGENERAZIONE OSSEA:

1.5.1 TESSUTO OSSEO

L'osso è un tessuto connettivo specializzato che, insieme alla cartilagine, costituisce il sistema scheletrico. Questi tessuti svolgono tre funzioni: meccanica, come supporto e sito di attacco per i muscoli della locomozione; protettiva, per organi vitali e midollo spinale; metabolica, come riserva di ioni, specialmente calcio e fosfato, per il mantenimento dell'omeostasi minerale sistemica essenziale per la vita. Nell'osso, come in tutti i tessuti connettivi, i costituenti fondamentali sono le cellule e la matrice extracellulare, qui particolarmente abbondante, composta di fibre collagene e proteine non collageniche, e con la proprietà di diventare calcificata. La struttura ossea è composta da tessuto connettivo fortemente mineralizzato, infatti la sostanza intercellulare è impregnata di cristalli minerali, composti in prevalenza di ioni fosfato e calcio. L'osso è attraversato dai dotti sanguigni e linfatici. La sostanza minerale è rappresentata da idrossiapatite (idrossifosfato di calcio), che costituisce circa il 70% delle ossa, e con la quale l'osso partecipa all'omeostasi del calcio e del fosfato, (44,45). Il tessuto osseo rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo. La deposizione del calcio e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici di questo ione. Per la presenza di minerali e per la distribuzione e l'abbondanza delle componenti organiche della sostanza intercellulare il tessuto osseo è contemporaneamente rigido ed elastico, con spiccate proprietà meccaniche di durezza e resistenza alla pressione, alla torsione e alla trazione; si tratta di un tessuto estremamente dinamico sottoposto a continuo rimodellamento, caratterizzato da fasi di produzione e riassorbimento della matrice mineralizzata. La sostanza organica presente nell'osso è costituita principalmente da collagene tipo 1 e da

proteine non collageniche, in particolare da osteocalcina, sintetizzate dagli osteoblasti. Le cellule ossee coinvolte nelle varie fasi del metabolismo osseo, si suddividono in tre fondamentali categorie:

- gli **osteoclasti** sono grosse cellule plurinucleate responsabili del riassorbimento osseo che, aderendo alla struttura mineralizzata, sono in grado di rimuoverla mediante acidificazione e digestione enzimatica, scindendo gli ioni calcio (Ca) e fosfato (P) dalla matrice ossea. Gli osteoclasti derivano da cellule monocitiche o macrofagiche che si sono differenziate da cellule di origine ematopoietica. I precursori degli osteoclasti sono detti *preosteoclasti*, questi vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui deve avvenire il riassorbimento osseo, qui giunti migrano nel tessuto osseo, si fondono insieme, dando origine a cellule polinucleate, gli osteoclasti attivi, capaci di dissolvere la componente minerale e digerire le componenti organiche del tessuto, mediante acidificazione dell'ambiente e la liberazione di enzimi lisosomiali, quali fosfatasi acida tartrato resistente e collagenasi. Alla conclusione della fase di riassorbimento osseo, l'osteoclasto muore per apoptosi ed è poi rapidamente rimosso per fagocitosi.
- gli **osteoblasti** sono cellule deputate all'attività anabolica in quanto in grado di secernere molecole che modulano la deposizione di nuove fibre proteiche (collagene e osteocalcina) e di effettuare la deposizione della componente minerale idrossiapatite (HA) insieme alla componente organica. Gli osteoblasti esprimono i recettori per il paratormone. Derivano da cellule progenitrici originate dalle MSCs presenti nel midollo osseo e diverse molecole ormonali e non ormonali possono stimolare la differenziazione degli osteoblasti dai precursori staminali. Gli osteoblasti attivi si trovano sempre a foderare lo strato di matrice ossea che essi stanno producendo prima che essa sia calcificata; il tessuto osteoide esiste proprio a causa dell'intervallo di tempo esistente tra la

formazione della matrice organica e la sua successiva calcificazione (il periodo di maturazione dell'osteoido), che è approssimativamente 10 giorni. Non appena gli osteoblasti vengono circondati da osteoido di nuova sintesi, essi divengono osteociti e sono sostituiti da un nuovo strato di osteoblasti che formano un successivo strato di matrice.

- gli **osteociti** sono le cellule più abbondanti del tessuto osseo. Si tratta di cellule derivate da osteoblasti che, rimasti intrappolati nel tessuto osseo calcificato dopo aver rilasciato matrice ossea, sono diventate cellule all'apparenza quiescenti. Sono contenuti in piccole escavazioni all'interno della matrice interconnesse tra loro da canalicoli che sfociano in vasi sanguigni nel canale di Havers. La funzione degli osteociti è quella di partecipare al rimodellamento osseo in risposta a stimoli di varia natura, principalmente meccanici, a seguito dei quali attivano gli osteoblasti e gli osteoclasti. Inoltre l'osteocita, in caso di trauma o frattura ossea, può riprendere la sua attività sintetica, dopo essersi liberato dalla matrice, ritrasformandosi quindi in un osteoblasto.

Il prevalere dell'attività di uno dei due tipi cellulari, tra osteoblasti ed osteoclasti, è il principale fattore in grado di differenziare le fasi di crescita (neoformazione), mantenimento (rimodellamento) o demineralizzazione (riassorbimento) dello scheletro. Il massimo livello di densità ossea, sia negli uomini che nelle donne, è solitamente raggiunto intorno ai vent'anni d'età, mentre, dopo i trenta, inizia di norma la sua diminuzione, causata da una sproporzione crescente nei processi coinvolti nella rigenerazione del tessuto osseo, caratterizzata da un'aumentata attività osteoclastica. Nella maggior parte dei casi questo fenomeno non è legato ad una scarsa assunzione di Ca, ma piuttosto ad altri fattori, prevalentemente endocrini e metabolici, in grado di influenzare l'attività di osteoblasti ed osteoclasti. La regolazione dei processi di rimodellamento è affidata infatti ad un meccanismo ormonale, che coinvolge l'ormone

paratiroideo, la vitamina D e la calcitonina. Altri regolatori ormonali del rimodellamento osseo comprendono gli ormoni sessuali (estrogeni, testosterone), gli ormoni tiroidei, i corticosteroidi (tra cui il cortisone), l'insulina e i diversi fattori di crescita.

1.5.2 RIMODELLAMENTO OSSEO

Gli osteoclasti riassorbono il tessuto osseo sotto il controllo di ormoni o fattori di crescita (46), mentre gli osteoblasti, stimolati dal contatto con osteoclasti e da fattori solubili, secernono matrice ossea, dando inizio alla formazione di nuovo osso (47). È comunque il prevalere dell'azione degli osteoclasti su quella degli osteoblasti a determinare la graduale demineralizzazione e la conseguente fragilità ossea. Le molecole responsabili dell'interazione tra questi diversi tipi cellulari, e quindi dell'equilibrio tra i due processi, sono state scoperte recentemente. Si tratta di numerose citochine proinfiammatorie (IL-6, TNF-alpha e IL-1 che stimolano l'osteoclastogenesi), e di proteine come l'osteoprotegerina (OPG), il recettore attivatore dell' NFkB (RANK) e il RANK Ligand (RANKL), che rappresentano una triade chiave della biologia dell'osso (**figura 1**).

In particolare, il TNF-alpha, IL-1 e IL-6 sono in grado di aumentare la proliferazione, la differenziazione dei precursori osteoclastici e la loro attività, risultando quindi potenti stimolatori del riassorbimento osseo *in vitro* e *in vivo* (48).

L'OPG è un peptide di 380 AA, appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF. Questa proteina è secreta dagli osteoblasti e presenta 7 domini strutturali; nei primi 4 domini (N-terminali) si ha abbondanza di cisteine essenziali per l'inibizione dell'osteoclastogenesi. I domini 5 e 6 (regione C-terminale) contengono 2 regioni omologhe che presentano omologie con delle regioni citoplasmatiche di alcuni mediatori apoptotici. Il dominio 7 è un dominio capace di legare parecchi proteoglicani

(49,50). La funzione dell'OPG nel metabolismo osseo è quella di sequestrare e legarsi a RANKL in modo da non permetterne il legame con RANK, inibendo in questo modo la maturazione degli osteoclasti, mediata da RANKL. (51-55).

Il RANKL è un peptide di 317 AA ed è espresso principalmente sulla membrana cellulare degli osteoblasti. Esso interagisce con RANK determinando il reclutamento dei progenitori degli osteoclasti, la loro fusione a formare le cellule multinucleate, la loro differenziazione in osteoclasti maturi, la loro interazione con l'interfaccia ossea e la loro sopravvivenza, inibendone l'apoptosi (54) come ampiamente dimostrato da numerosi studi *in vitro* (56,57).

Il RANK è un peptide di 616 AA formato da una parte segnale di 28 AA, un dominio extracellulare e un dominio intermembrana di 21 AA con dominio C-terminale citoplasmatico. È espresso in cellule della linea monocito/macrofagica, sui preosteoclasti, sulle cellule B e T e sulle cellule dendritiche (58,59). Nel tessuto osseo, l'attivazione di RANK è fondamentale nel processo di differenziazione degli osteoclasti. L'attivazione di RANK è data dal legame con il suo ligando, il RANKL: l'attivazione trasmette il segnale tramite il secondo messaggero TNF Receptor Associated Factor 6 (TRAF6), che provoca l'attivazione del sistema nuclear factor (NF)- κ B; questo, traslocando nel nucleo promuove la trascrizione dei geni fondamentali nei processi di proliferazione e di differenziazione degli osteoclasti promuovendo il riassorbimento dell'osso (53).

Nel caso in cui vi sia un'alterazione dell'equilibrio dinamico di costruzione e distruzione dell'osso, si possono determinare importanti malattie metaboliche del tessuto osseo. Una malattia tra le più diffuse è l'osteoporosi, patologia sistemica dell'apparato scheletrico legata a vari fattori come età, abitudini di vita e nutrizionali, fattori di rischio genetici; tale patologia è caratterizzata dalla progressiva riduzione della densità minerale ossea e da un deterioramento della microarchitettura del tessuto

osseo; le ossa diventano quindi più fragili e sono esposte ad un maggior rischio di frattura per traumi, anche minimi. La sua rilevanza è legata alla sua diffusione: l'incremento della vita media che ha caratterizzato gli ultimi decenni ha fatto salire il numero degli individui a rischio di osteoporosi e la tendenza appare inesorabilmente in aumento.

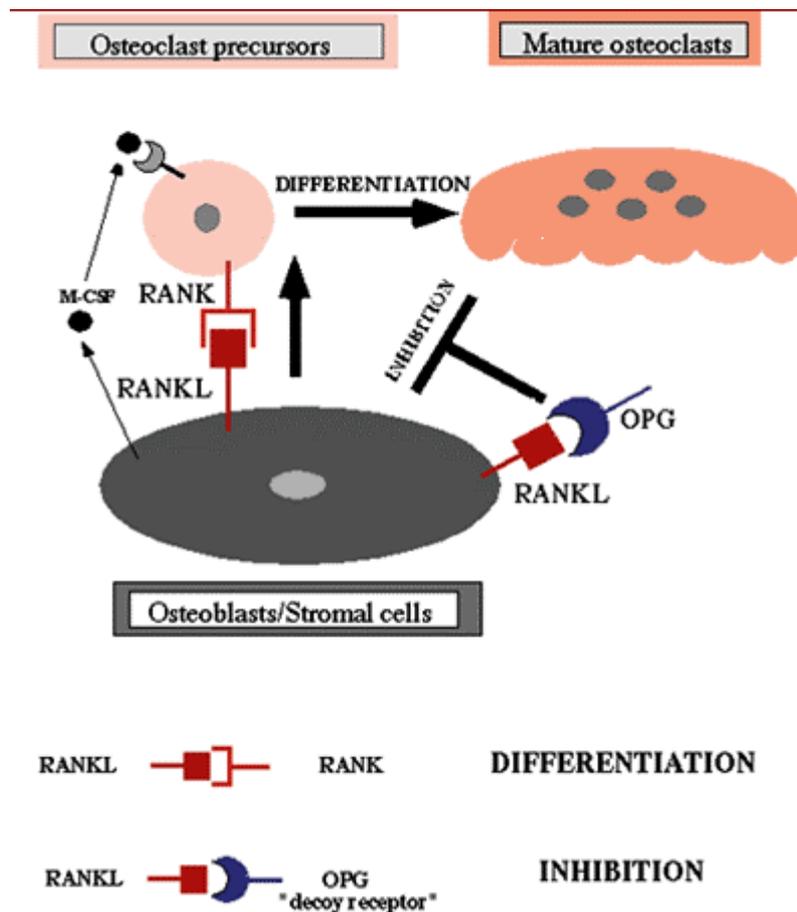


Fig. 1. Il legame RANK-RANKL promuove la differenziazione da preosteoclasta ad osteoclasta maturo, con riassorbimento osseo. OPG impedisce il legame tra RANK-RANKL

1.5.3 IMPIEGO TERAPEUTICO DELLE MSCs

Un ruolo fondamentale nello sviluppo di possibili terapie cellulari nell'ambito della riparazione tissutale, in particolare nelle terapie osteoarticolari, è rappresentato dall'uso delle hMSCs, in quanto sono reperibili in diversi tessuti nell'adulto e non creano problemi di natura etica.

L'interazione tra MSCs e biomateriali rappresenta un'innovazione nel campo dell'ingegneria tissutale il cui principale obiettivo consiste nella sostituzione di piccole parti di un tessuto danneggiato con l'aiuto di scaffold in combinazione con cellule staminali provenienti dallo stesso individuo.

Lo scaffold per la rigenerazione ossea deve rispondere a ben determinati criteri, come biocompatibilità, biodegradabilità e proprietà meccaniche simili al tessuto da riparare.

In campo ortopedico, l'interazione tra cellule staminali e scaffold deve garantire, soprattutto nelle fasi iniziali di guarigione, una buona differenziazione cellulare osteogenica associata ad un'adeguata resistenza strutturale del supporto utilizzato, senza però dare reazioni indesiderate nel punto d'impianto (60).

Numerosi dati in letteratura dimostrano l'utilità delle MSCs nell'ambito della medicina rigenerativa, in particolare nel campo dell'ingegneria tissutale ossea (61-63) e cartilaginea (64,65).

Studi *in vivo* hanno dimostrato il potenziale osteogenico delle BMMSCs, le quali sono state seminate su matrici extracellulari, come idrossiapatite, ed impiantate *in vivo* in topi immunodeficienti, ottenendo la formazione di tessuto osseo (66).

Altri studi su modelli animali di ratto e di cane che presentavano difetti ossei segmentari di notevole entità (67-71) hanno confermato la capacità delle MSCs di differenziare in osteoblasti con formazione di tessuto osseo nuovo.

In un modello murino di osteogenesi imperfetta, una malattia congenita dei tessuti mesenchimali, caratterizzata da difetto di ossificazione, sono state infuse BMMSCs con conseguente formazione di tessuto osseo e cartilagineo funzionale normale a partire da cellule trapiantate (72).

Altri studi su modelli animali hanno dimostrato che l'iniezione *in situ* o l'impianto diretto rappresentano la via più efficace di somministrazione delle MSCs per indurre rigenerazione e riparazione locale dei tessuti ossei cartilaginei o tendinei (73,74).

Attualmente, l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sull'uso delle MSCs, in particolare delle BMMSCs e delle ADSCs, in combinazione con biomateriali caricati con fattori bioattivi, quali proteine biologicamente attive, fattori di crescita, farmaci, come ad esempio lo stronzio, che grazie alla loro struttura 3D sono in grado sia di favorire l'attecchimento delle cellule, sia di rilasciare nel tempo tali fattori bioattivi, con conseguente induzione della proliferazione e/o differenziazione cellulare (75).

1.6 RANELATO DI STRONZIO E SUO MECCANISMO D'AZIONE

Lo stronzio (Sr) è un elemento alcalino terroso come il Calcio, ed ha un comportamento chimico simile a quest'ultimo. Sr è stato scoperto per la prima volta in miniere della Scozia nel tardo 1700, ed è stato classificato come un *bone seeking agent*.

Lo Stronzio Ranelato (SR) è un farmaco utilizzato nel ridurre l'incidenza di fratture ossee in soggetti osteoporotici ed è l'unico nel suo genere ad avere un duplice effetto sul rimodellamento osseo, in quanto è in grado di stimolare la produzione di osso da parte degli osteoblasti e di inibire il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti (76).

Lo SR (Protelos; Servier Laboratories, France) è composto da due cationi di Sr^{2+} , che rappresentano la componente farmacologicamente attiva, ed un anione di ranelato, che agisce come *carrier* (77) conferendo così al farmaco una maggiore biodisponibilità.

Studi in modelli animali hanno confermato questo duplice effetto, dimostrando come sali di stronzio possono inibire la formazione di osteoclasti e incrementare la solidità dell'osso e la formazione dello stesso (78,79) senza incidere sulla mineralizzazione ossea (4, 80). Per determinare la precisa azione di SR su osteoblasti e osteoclasti, sono stati condotti esperimenti *in vitro* su questi due tipi cellulari. In diversi laboratori è stato osservato che lo SR stimola la replicazione delle cellule osteoprogenitrici e la loro differenziazione in osteoblasti maturi con la produzione di marcatori differenziativi osteoblastici come la fosfatasi alcalina (ALP) in osteoblasti primari murini, mentre inibisce la formazione di osteoclasti e il riassorbimento osseo (80,81). Sebbene tutti questi risultati aiutino a spiegare la diminuzione del rischio di fratture con la somministrazione di SR, non sono ancora stati individuati i motivi certi per cui questo farmaco abbia effetto contemporaneamente sul riassorbimento e sulla formazione. Studi recenti suggeriscono che lo SR agisce sul riassorbimento in maniera indiretta, attraverso la modulazione dell'espressione dell'attivatore recettoriale RANKL e dell' OPG che sono conosciuti come regolatori della formazione e dell'attività osteoclastica (80,82). Dati su cellule osteoblastiche primarie umane *in vitro* suggeriscono che dopo 24 ore di incubazione con lo SR, a concentrazioni crescenti da 0,01 mM a 2mM, si abbia un significativo aumento concentrazione-dipendente dell'espressione del mRNA, codificante per OPG, in seguito ad una valutazione con qRT-PCR e, inoltre, con metodica ELISA è stato dimostrato un incremento significativo anche della proteina stessa. A questo effetto si aggiunge una simultanea *down* – regolazione dell'espressione del mRNA per RANKL, effetto combinato che diminuisce l'osteoclastogenesi (83,84). Sr^{2+} è stato dimostrato essere, inoltre, un

agonista del calcium sensing receptor (CaSR), in quanto elemento alcalino terroso come il calcio. CaSR è espresso dalle cellule delle paratiroidi e in altri tipi cellulari, inclusi osteoclasti e osteoblasti, per questo motivo Sr^{2+} , legandosi al CaSR, stimola la proliferazione osteoblastica, la formazione dell'osso e l'apoptosi negli osteoclasti (85,86).

Inoltre, numerosi studi in modelli animali sono stati effettuati per valutare gli effetti dello stronzio in combinazione con biomateriali sull'osteogenesi (87-91), confermando la capacità dello Stronzio di promuovere l'osteoiduzione mediante produzione di ALP e HA delle MSCs. Lo SR è dunque un agente anti-osteoporotico di ultima generazione, la cui efficacia contro le fratture è stata dimostrata ancora in vari studi clinici (92). Altri studi eseguiti su biopsie ossee trans iliache di donne osteoporotiche in post-menopausa hanno valutato invece l'impatto dello SR sulla qualità dell'osso dopo tre anni di trattamento, dimostrando che Sr^{2+} è diffuso eterogeneamente nelle ossa nuove e che le qualità minerali del tessuto osseo sono state completamente mantenute, sostenendo la sicurezza di questo agente a livello del tessuto osseo (93,94).

2. SCOPO DELLA TESI

La moderna medicina rigenerativa dell'osso, indispensabile nei casi clinici di perdita di tessuto osseo per motivi meccanici e/o patologici, si avvale dell'ingegneria tissutale, settore innovativo delle discipline mediche, che comprende ed applica i più recenti progressi fatti nel campo della biologia molecolare, della biochimica, dell'ingegneria, della scienza dei materiali e della medicina di trapianti, ma che presenta numerosi problemi clinici, difficilmente superabili con un approccio unidirezionale. Per questa ragione sono state investigate nuove soluzioni nel campo dell'ingegneria tissutale che potrebbero superare tali problematiche ed avere un riscontro positivo anche in ambito clinico. Tali soluzioni prevedono l'utilizzo combinato di popolazioni di cellule progenitrici e fattori bioattivi (farmaci) in combinazione con materiali biocompatibili naturali o sintetici.

Normalmente, per testare *in vitro* le interazioni cellula-farmaco sono utilizzate MSCs, isolate ed espanse *ex-vivo* da agoaspirati di midollo osseo (BMMSCs), ma le ADSCs, grazie alle loro maggiore abbondanza ed accessibilità, possono risultare preferibili.

Questo lavoro di tesi si propone inizialmente di allestire colture cellulari di cellule mesenchimali staminali, sia da biopsie di tessuto adiposo sia da biopsie di midollo osseo, rispettivamente in numero di dieci e cinque da soggetti sani e caratterizzarle nella loro multipotenza valutando la capacità differenziativa adipogenica ed osteogenica, e successivamente di analizzare l'effetto dello ione Sr^{2+} sull'attività proliferativa e sulla differenziazione osteogenica di tali linee cellulari, utilizzando come controllo positivo la linea continua osteoblast-like SaOS-2, derivata da osteosarcoma umano.

Nello specifico, il progetto sarà quindi suddiviso nelle seguenti fasi:

1) allestimento e caratterizzazione di colture delle hADSCs e delle hBMMSCs;

- 2) valutazione della vitalità e della proliferazione delle hADSCs e delle hBMMSCs cresciute in assenza/presenza di Sr^{2+} ;
- 3) induzione osteogenica delle hADSCs e delle hBMMSCs;
- 4) valutazione dello stadio differenziativo mediante colorazioni citochimiche ed analisi di specifici marker in microscopia confocale a scansione laser (LSCM);
- 5) valutazione quantitativa della produzione di ALP e HA mediante dosaggi fluorimetrici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

3.1.1 MATERIALI

- **Terreno di coltura di McCoy** (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*), pH 7.4, (tamponato con HEPES o fosfato), sterile, conservato a +4°C
- **Terreno Ham's F12 modificato secondo Coon** (*Sigma Aldrich*), sterile, conservato a +4°C
- **Fetal Bovine Serum** (FBS, *origine Australiana, BioWhittaker, Cambrex, Belgio*)
- **Antibiotici:** penicillina 100 IU/ml + streptomina 100 µg/ml (*Sigma Aldrich*), sterili, conservati a +4°C
- **Collagenasi di tipo I** (C-0130, *Sigma Aldrich*, attività >125CDU/mg, dove 1 CDU (Collagen Digestion Unit) libera peptidi da collagene in quantità equivalente, valutata mediante colorazione con ninidrina, a 1 µmole di leucina in 5 ore a pH 7.4 a 37°C in presenza di ioni calcio, conservata a -20°C
- **Dimetilsolfossido** (DMSO), conservato a temperatura ambiente (RT)
- **Bisturi e pinze a punta ricurva**, sterili
- **Filtri a rete da 230 µm**, sterili
- **Piastre da 10 cm di diametro per colture cellulari**, sterili
- **Provette da 15 ml con tappo a vite**, sterili
- **Pipette da 10 ml**, sterili

3.1.2 METODICA DI ISOLAMENTO DELLE hMSCs DA TESSUTO ADIPOSO

Le colture primarie di cellule e le successive linee cellulari stromali umane sono state preparate a partire da tessuto adiposo sottocutaneo ottenuto da pazienti sottoposti a biopsia cutanea, previa firma di consenso informato, in accordo con il protocollo approvato dal Comitato Etico Istituzionale per studi umani.

Le biopsie di tessuto adiposo prelevate in sala operatoria sono state immediatamente poste in terreno di McCoy 5A addizionato con HEPES 22 mM,

penicillina 100 IU/ml e streptomina 100 µg/ml, a pH 7.4, trasportate in laboratorio e processate entro 1-2 ore. Dopo aver eliminato porzioni di altri tessuti e tralci fibrosi, il tessuto adiposo selezionato è stato tagliato sterilmente in piccoli frammenti (dimensione media mm 0,5 di lato) sotto cappa a flusso laminare in piastra da 10 cm di diametro. I frammenti sono stati lavati a lungo con terreno di McCoy 5A per eliminare detriti contaminanti, centrifugati a 200 x g per 10 minuti (min), risospesi in terreno Ham's F12 modificato secondo Coon ed addizionato con 20% di FBS e collagenasi di tipo I 0,3 mg/ml ed incubati per overnight a 37°C in piastre da coltura. Dopo la digestione enzimatica, il contenuto delle piastre è stato trasferito in provetta e centrifugato a 200 x g per 5 min, eliminando successivamente il sovrnatante. Dopo due lavaggi in terreno Ham's F12 modificato secondo Coon, pH 7.4 senza siero, i frammenti sono stati dispersi meccanicamente in provetta, passati attraverso un filtro sterile di acciaio inossidabile delle dimensioni di 230 µm e raccolto in tubi di plastica sterili da 50 ml. Il tessuto stromale e vascolare non digerito sedimentato sul filtro è stato scartato, mentre l'infranatante contenente la frazione di hADSCs è stato raccolto e le cellule sono state sedimentate per centrifugazione a 300 x g per 5 min. Il precipitato è stato risospeso ed incubato in un tampone di lisi (NH₄Cl 155 mM, K₂HPO₄ 5.7 mM, EDTA 0.1 mM a pH 7.3) per 2 min a temperatura ambiente (RT) e successivamente centrifugato a 300 x g per 3 min., per eliminare i globuli rossi, nel caso la contaminazione da parte di quest'ultimi sia consistente, altrimenti il campione è stato direttamente centrifugato senza passaggio in tampone di lisi. La frazione cellulare stromale-vascolare è stata risospesa, seminata in piastre da coltura da 100 mm di diametro, nel terreno di crescita (GM) così composto: Ham's F12 modificato secondo Coon addizionato con FBS 10%, penicillina 100 IU/ml, streptomina 100 µg/ml e 1 ng/ml di fattore di crescita basale dei fibroblasti (bFGF), e coltivata a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Dopo 3 giorni dalla semina della dispersione cellulare, le piastre sono state lavate per eliminare i detriti e le cellule non adese. La coltura cellulare di cellule adese (per definizione coltura primaria) è stata fatta proliferare fino alla semiconfluenza (circa $3-5 \times 10^5$ cellule/piastra), cambiando il terreno 2 volte a settimana. Al raggiungimento della semiconfluenza le colture primarie sono state subcoltivate andando, così, a costituire le linee di cellule staminali mesenchimali umane da tessuto adiposo (hADSCs), che nel laboratorio sono state indicate con la sigla PA seguita da un numero d'ordine. Successivamente, ai primi passaggi le cellule delle linee PA sono state congelate dopo averle risospese in terreno Ham's F12 modificato secondo Coon, pH 7.4 addizionato con FCS 40% e DMSO 6.5% e criopreservate in azoto (N₂) liquido fino al momento dell'utilizzo. Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule tra il terzo ed il settimo passaggio di subcoltivazione.

3.1.3 METODICA DI ISOLAMENTO DELLE MSCs DA MIDOLLO OSSEO

Le colture primarie di cellule e le successive linee cellulari stromali umane da midollo osseo sono state preparate a partire da midollo osseo sottocutaneo ottenuto da pazienti sottoposti a prelievo di agoaspirato, previa firma di consenso informato, in accordo con il protocollo approvato dal Comitato Etico Istituzionale per studi umani. Le biopsie di midollo osseo prelevate in sala operatoria sono state immediatamente poste in terreno di McCoy's 5A addizionato con HEPES 22 mM, penicillina 100 IU/ml e streptomycin 100 µg/ml, a pH 7.4, trasportate in laboratorio e processate entro 1-2 ore. Dopo aver sminuzzato i frammenti di osso trabecolare presenti, il campione è stato agitato vigorosamente e lasciato sedimentare a 1 x g per 1 min.

Il soprannatante è stato raccolto e trasferito in provetta, il pellet di frammenti di osso trabecolare è stato risospeso in terreno di McCoy's 5A addizionato con HEPES

22mM, penicillina 100 IU/ml e streptomina 100 µg/ml, a pH 7.4, agitato vigorosamente e lasciato sedimentare a 1 x g per 1 min.

Il sopranatante è stato raccolto e unito al precedente, il pellet è stato scartato. Il pool di sopranatanti è stato centrifugato a 300 x g per 5 min.

Il pellet è stato risospeso ed incubato in un tampone di lisi (NH₄Cl 155 mM, K₂HPO₄ 5.7 mM, EDTA 0.1 mM a pH 7.3) per 2 min a temperatura ambiente (RT) per eliminare i globuli rossi e successivamente centrifugato a 300 x g per 3 min. Dopo centrifugazione, il pellet cellulare ottenuto è stato risospeso e le cellule sono state seminate in piastre da coltura da 100 mm di diametro, nel terreno di crescita (GM) così composto: Ham's F12 modificato secondo Coon addizionato con FBS 10%, penicillina 100 IU/ml, streptomina 100 µg/ml e 1 ng/ml di fattore di crescita basale dei fibroblasti (bFGF), e coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Dopo 3 giorni dalla semina della dispersione cellulare, le piastre sono state lavate per eliminare i detriti e le cellule non adese. La coltura cellulare di cellule adese (per definizione coltura primaria) è stata fatta proliferare fino alla semiconfluenza (circa 3-5 x 10⁵ cellule/piastra), cambiando il terreno 2 volte a settimana. Al raggiungimento della semiconfluenza le colture primarie sono state subcoltivate andando, così, a costituire le linee di cellule staminali mesenchimali umane da midollo osseo (hBMMSCs), che nel laboratorio sono state indicate con la sigla MO seguita da un numero d'ordine. Successivamente, ai primi passaggi le cellule delle linee MO sono state congelate dopo averle risospese in terreno Ham's F12 modificato secondo Coon, pH 7.4 addizionato con FCS 40% e DMSO 6.5% e criopreservate in azoto (N₂) liquido fino al momento dell'utilizzo. Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule tra il terzo ed il settimo passaggio di subcoltivazione.

3.2 CURVE DI CRESCITA

3.2.1 DEFINIZIONI

Numero di generazioni: numero di raddoppi della popolazione (stimato dal numero di subcoltivazioni o passaggi) che una coltura ha avuto dal momento dell'espianto. Necessariamente contiene un'approssimazione del numero delle generazioni nella coltura primaria.

Tempo di generazione: intervallo di tempo tra due divisioni consecutive di una cellula. Più precisamente: intervallo di tempo tra un punto del ciclo di divisione cellulare e lo stesso punto del ciclo, una divisione dopo.

Curva di crescita: rappresentazione grafica della cinetica di crescita di una popolazione cellulare. Si ottiene interpolando i diversi punti rappresentati sul grafico in cui, di norma, in ascissa sono riportati i tempi (comunemente in ore) e in ordinata il numero di cellule. Riportando in ordinata il semplice numero di cellule della popolazione si ottiene una curva esponenziale, non sempre ben utilizzabile per elaborazioni successive. Si preferisce, pertanto, utilizzare il \log_{10} del numero di cellule al fine di ottenere una retta nella fase di crescita indicata come *log phase*. La curva è usualmente suddivisa in tre fasi successive: *lag phase*, *log phase* e *plateau* o *stationary phase*.

Lag phase: fase iniziale prima che cominci la crescita; può variare da alcune ore ad alcuni giorni.

Log phase: fase in cui la crescita avviene in modo costante, cioè durante la quale il tempo di duplicazione della popolazione rimane costante; è la fase della crescita esponenziale.

Plateau o stationary phase: fase finale in cui la coltura ha terminato la crescita e si trova in una situazione di alta densità cellulare; in tale fase l'effetto del fenomeno dell'inibizione da contatto è massimo.

Tempo di raddoppio (duplicazione) della popolazione cellulare: intervallo di tempo impiegato da una popolazione cellulare per raddoppiarsi durante la fase logaritmica di crescita. Tale tempo deriva dalla conta di tutte le cellule di una popolazione e quindi dalla media dei differenti tempi di generazione delle singole cellule, ed include anche l'effetto delle cellule non in crescita. Il termine non è, perciò, sinonimo di *Tempo di generazione*.

3.2.2 CINETICA DI UNA POPOLAZIONE CELLULARE IN COLTURA

Dopo la semina cellulare inizia la *lag phase*. Durante questa fase le cellule ricostruiscono le proteine di superficie e riacquistano la loro architettura cellulare tipica di cellule adese. La *lag phase* può durare da alcune ore ad alcuni giorni ed è una fase stazionaria, in cui non si ha proliferazione. Nella successiva *log phase* si ha un'attiva proliferazione con andamento esponenziale.

Nella rappresentazione dei grafici le curve esponenziali vengono generalmente rettilinizzate, utilizzando i relativi log dei valori, in modo da poter operare le opportune estrapolazioni. Per i calcoli successivi si assume che tutte le cellule di una popolazione cellulare si dividano e che lo facciano approssimativamente impiegando lo stesso tempo. In realtà questo non è sempre vero, anche se lo è per molte linee cellulari, ed in particolare per le linee continue. In **figura 2** è raffigurato il grafico della cinetica della crescita di una generica popolazione cellulare. Durante la *log phase* la popolazione cellulare cresce secondo la formula:

$$N = N_0 2^{kt} \quad (1)$$

N_0 = inoculo iniziale = numero di cellule al tempo 0 ore (t_0)

N = numero delle cellule al tempo t

t = tempo trascorso dall'inoculo, di norma espresso in ore

k = costante di regressione

Eseguendo il \log_{10} (indicato semplicemente con \log) di entrambi i termini ed applicando le proprietà dei logaritmi la formula (1) può essere scritta come:

$$\log N = \log N_0 + k t \log 2 \quad (2)$$

che corrisponde all'equazione di una retta $y = mx + c$ dove:

$$y = \log N$$

$$x = t$$

$$m = k \log 2 \quad (3)$$

$$c = \log N_0$$

È importante osservare che:

$$kt = n$$

dove n = numero di generazioni implicate nell'aumento della popolazione da N_0 a N .

Ne consegue che nel caso in cui si ha il raddoppio della popolazione cioè nel caso in cui

$$n = 1$$

$$t = T$$

dove T = tempo medio di generazione, cioè il tempo in cui una popolazione raddoppia e

$$T = 1/k$$

la formula generale diventa:

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

da cui

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

$$n = 3.322 (\log N - \log N_0) \quad (4)$$

Sostituendo $1/k$ con T nella formula (3) si ottiene:

$$m = (1/T) \times \log 2$$

$$T = (1/m) \times \log 2$$

$$T = 0.301/m \text{ (5)}$$

La formula (4) può essere utilizzata per calcolare il numero medio di duplicazioni cellulari che risultano da un dato incremento di una popolazione cellulare. La formula (5) può essere utilizzata per calcolare il tempo medio di generazione (tempo di duplicazione) della popolazione cellulare.

È bene ricordare che i calcoli precedenti sono applicabili solo alla fase di crescita esponenziale (*log phase*) e che presuppongono che tutte le cellule della popolazione si dividano e che impieghino sempre il medesimo tempo.

Ovviamente questo è un presupposto teorico, che è sicuramente valido nel caso di linee continue, costituite da popolazioni omogenee e stabili nel tempo, mentre va preso con i dovuti distinguo nel caso di linee finite. Nella pratica, se abbiamo una popolazione sufficientemente omogenea, le formule sono comunque applicabili e danno risultati medi relativi alla popolazione. Su tali risultati possono essere eseguite elaborazioni statistiche (test t, test F, test per la linearità, test per il parallelismo, determinazione del coefficiente R^2 , ecc.).

Al termine della *log phase* la pendenza della curva di crescita tende a diminuire fino a diventare un asintoto orizzontale, un *plateau*. A questo punto la proliferazione è terminata. La piastra è nuovamente a confluenza, pronta per un nuovo passaggio.

Anche la durata della *log phase* è molto variabile, dipendendo da diversi fattori:

- 1) dal tempo di duplicazione della popolazione: quanto più questo è breve, tanto più è breve la *log phase*;
- 2) dalla dimensione dell'inoculo: un numero elevato di cellule nell'inoculo farà sì che in seguito alle duplicazioni esse tendano rapidamente a raggiungere la confluenza;

- 3) dall'area della piastra/fiasca: quanto maggiore è l'area, tanto maggiore sarà il tempo necessario ad occuparla.

Affinché la *log phase* possa avvenire senza disturbi è indispensabile che fattori limitanti la crescita quali l'esaurimento delle sostanze nutritive, l'eccessiva presenza di prodotti del catabolismo (che possono avere azione tossica o alterare il pH) siano evitati. Per questo è indispensabile sostituire il terreno di coltura dopo alcuni giorni, operare cioè un cambio di terreno. Il cambio di terreno in genere viene eseguito ogni 3-4 giorni.

3.2.3 CURVA DI CRESCITA: ALLESTIMENTO E CONTEGGI

- I. È indispensabile conoscere approssimativamente il tempo di raddoppio della popolazione cellulare relativo alla linea di cui dobbiamo allestire la curva di crescita, al fine di definire l'intervallo tra una conta e l'altra. In via indicativa, si può consigliare di scegliere un intervallo paragonabile all'ipotetico tempo di raddoppio della popolazione.
- II. Per poter interpolare una buona curva si devono utilizzare almeno 5-8 punti compreso il tempo 0 (t_0), prevedendo, quindi, di analizzare la crescita della popolazione lungo un periodo di tempo che comporti 5-8 raddoppi successivi della popolazione. Per es.: per una linea cellulare che ha un tempo di raddoppio approssimativamente di 3 giorni, conviene contare le cellule ogni 3 giorni fino al 21°-27° giorno.
- III. Esiste, comunque, un limite minimo per la popolazione a t_0 , dato dalla capacità di risoluzione e sensibilità della metodica di conta cellulare. Se si utilizza una camera di Bürker, non si può oggettivamente scendere sotto una popolazione iniziale di 5.000 cellule. Una buona conta in camera di Bürker si ottiene con una media di 10 cellule/mm². Essendo lo spessore

della camera mm 0.1, la sospensione risulta di 10 cellule/mm³, cioè 100.000 cellule/cm³. Dopo essere stata raccolta e centrifugata, una popolazione cellulare può essere risospesa in un volume minimo per la successiva conta, ma scendere sotto µl 50 rischia di portare errori non trascurabili. Pertanto, con una sospensione cellulare di 100.000 cellule/cm³ in µl 50 si ha una popolazione di 5.000 cellule. A t₀ le fasi di semina, adesione, attecchimento, distacco, raccolta, risospensione in volume minimo possono portare a perdita di cellule, perdita tanto maggiore quanto minore è la popolazione. A fronte del limite ipotetico di 5.000 cellule è preferibile partire con una popolazione di 10.000 cellule.

- IV. I dati per ottenere una buona curva di crescita al fine di individuare correttamente il tempo di raddoppio della popolazione sono attendibili fin quando il fenomeno dell'inibizione da contatto è trascurabile. Già alla semiconfluenza comincia a non esserlo più, pertanto a semiconfluenza i dati sono al limite dell'attendibilità. È necessario, quindi, conoscere anche il numero di cellule a confluenza/unità di superficie (o numero di cellule a confluenza/tipo di piastra). Un esempio è riportato al successivo punto V.
- V. Da una popolazione a t₀ di 10.000 cellule dopo 7 raddoppi della popolazione si giunge ad una popolazione di 1.280.000 cellule, che si può considerare il limite indicativo per piastre da 10 cm di diametro (superficie circa 60 cm², confluenza 2.600.000 cellule, confluenza 43.000 cellule/cm², semiconfluenza 22.000 cellule/cm²). Per linee in cui la confluenza è di 6.000.000 cellule/piastra da 10 cm di diametro questo limite può salire a 3.000.000 (8 raddoppi), mentre per linee in cui la confluenza è di 1.500.000 cellule il limite si riduce a 750.000 (6 raddoppi). Con piastre da 5 cm di diametro (superficie 20 cm²) la semiconfluenza viene raggiunta prima (tra 4

e 5 raddoppi della popolazione), i punti utili per la curva sono meno, ma, in genere, sempre sufficienti. Scendere a superfici inferiori a 20 cm² è sconsigliabile, la semiconfluenza è raggiunta troppo rapidamente, si ottiene un numero insufficiente di punti per l'analisi della curva.

VI. Occorre sempre verificare preliminarmente che le cellule da utilizzare per la curva di crescita siano in condizioni ottimali di vitalità e crescita. Le cellule non devono essere sincronizzate per l'effettuazione della curva di crescita. Tale operazione è non solo inutile, in quanto la sincronizzazione sarebbe già perduta dopo due raddoppi di popolazione, ma dannosa per l'analisi della curva, in quanto ci troveremmo di fronte a disomogeneità nella popolazione tra la fase iniziale e quella successiva della crescita. È comunque importante che le cellule siano mantenute per le 48-72 ore precedenti l'inizio della curva di crescita nel medesimo terreno che sarà utilizzato come controllo durante la curva stessa. Questo terreno di solito contiene una concentrazione di FCS (1-2%) più bassa di quella del terreno di crescita standard (10%), al fine di meglio evidenziare i possibili effetti stimolatori/inibitori delle sostanze da saggiare, poiché il potente effetto stimolatore di FCS10% potrebbe mascherarli.

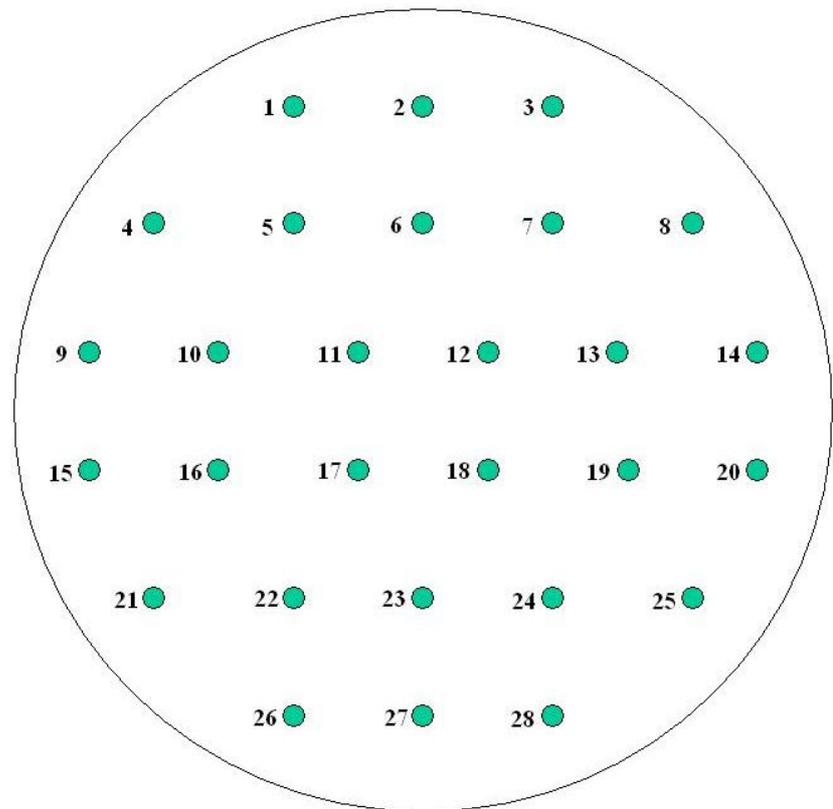
VII. Il metodo classico di conteggio in camera di Bürker può essere sostituito dal metodo di conteggio diretto in piastra, che ha i vantaggi di richiedere l'allestimento di un numero minore di piastre (solo 3-4 al posto di 18-21) e di fornire risultati più esatti e precisi, ed è, pertanto, quello da me utilizzato, come di seguito descritto ai punti 1-11.

1. Tre giorni prima dell'inizio della curva di crescita, nella piastra delle cellule che dovranno essere usate, il terreno di crescita (GM) è stato sostituito con il terreno di base (senza stimoli da saggiare) della curva

di crescita. Nel caso specifico di curve di crescita per saggiare concentrazioni scalari di Sr^{2+} il terreno di base è costituito da terreno Coon's + 1% FCS senza i fattori di induzione osteogenica (dexametasone, acido ascorbico e β -glicerolfosfato) e le cellule utilizzate sono, quindi, linee di preadipociti indifferenziate.

2. Dopo 3 giorni le cellule sono state staccate e seminate in terreno Coon's + 1% FCS con concentrazioni scalari di Sr^{2+} in piastre da 9-10 cm di diametro, utilizzando solo poche piastre, poiché la medesima piastra non viene sacrificata, ma riutilizzata per le conte successive. Per le concentrazioni scalari di Sr^{2+} è stato utilizzato semplicemente cloruro di stronzio (SrCl_2) e non SR in quanto il ranelato funge da carrier *in vivo* della componente attiva del farmaco, lo ione Sr^{2+} .
3. Il giorno successivo alla semina è stata effettuata la prima conta (tempo 0 ore) inserendo la piastra all'interno di un apposito coperchio rovesciato in cui sono state segnate diverse posizioni (sono stati preparati in laboratorio coperchi da 14, 28 e 40 posizioni); per il tempo 0 è stato utilizzato il coperchio da 40 o da 28 posizioni.

COPERCHIO DI PIASTRA CON GRIGLIA A 28 POSIZIONI



4. La piastra inserita nel coperchio grigliato è stata collocata sul tavolo del microscopio, è stata selezionata l'osservazione in contrasto di fase (obiettivo 10x, condensatore Ph1) ed è stato messo a fuoco il piano delle cellule.
5. La piastra è stata posizionata nella posizione 1 del coperchio effettuando l'operazione macroscopicamente (evitando di effettuarla guardando tramite gli oculari, al fine di evitare posizioni aggiustate con campi visivi preferenziali, che potrebbero inficiare così i risultati) e le cellule presenti nel campo visivo sono state contate.
6. L'operazione è stata ripetuta per tutti i campi della piastra.
7. Le operazioni dei punti 4-6 sono state ripetute per 3-4 piastre, al fine di ottenere i dati in triplicato-quadruplicato.

8. Le operazioni dei punti 4-7 sono state ripetute nei giorni individuati dal protocollo per la curva di crescita, andando da conte giornalieri per linee a rapida crescita a conte ogni 3-4 giorni per linee a crescita più lenta. Per ogni tempo sono state contate complessivamente almeno 1000 cellule (per il t_0 si è scesi a 500).
9. Con l'aumento del numero di cellule per campo, se necessario, è stato utilizzato il coperchio a numero di posizioni inferiore.
10. Al termine dell'esperimento di crescita è stato effettuato il calcolo del numero di cellule come segue: per ogni giorno di conta, per ogni piastra sono stati sommati i numeri di cellule/campo (con 3 piastre si sono ottenuti 3 replicati). È stato calcolato il numero di cellule per piastra, conoscendo le superfici dei campi di lettura e della piastra. Le operazioni di calcolo sono state effettuate utilizzando un foglio elettronico Excel.
11. I dati delle singole curve di crescita sono stati elaborati ottenendo le relative regressioni lineari.

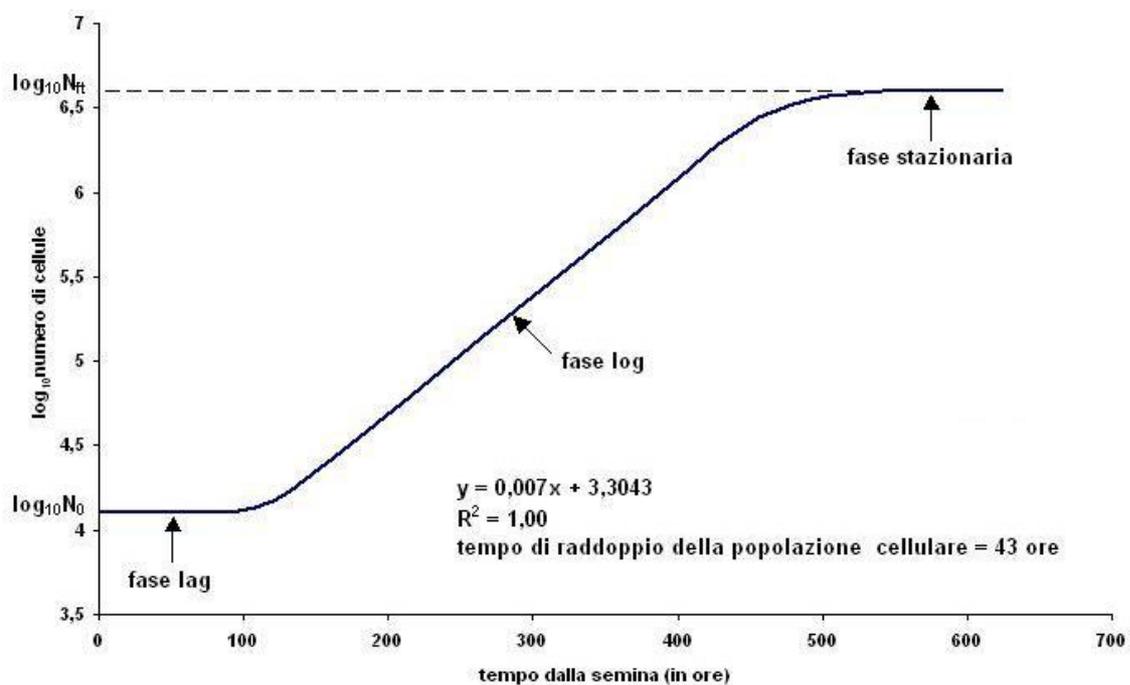


Fig. 2. Grafico della cinetica della crescita di una popolazione cellulare (teoretico).

3.2.4 ANALISI STATISTICA

I dati delle singole curve di crescita sono stati elaborati ottenendo le relative regressioni lineari; l'analisi statistica delle singole regressioni è stata effettuata mediante test per la linearità con il Test t di Student e calcolo del coefficiente di determinazione R^2 . Le regressioni delle curve di crescita ottenute a concentrazioni scalari di Sr^{2+} sono state confrontate con la curva di crescita di controllo (in terreno Coon's + 1% FCS) e la significatività valutata mediante test per il parallelismo sui coefficienti angolari delle rette di regressione con il Test t di Student.

3.3 CARATTERIZZAZIONE E VALUTAZIONE DELLA MULTIPOTENZA DELLE LINEE CELLULARI

Le linee cellulari preadipocitarie (PA) e da midollo osseo (MO) sono state caratterizzate valutando la presenza/assenza di specifici marcatori. Per verificare la multipotenza, tutte le linee cellulari sono state differenziate verso i fenotipi adipogenico

ed osteogenico mediante trattamento con specifici fattori di induzione, seguendo i criteri elaborati dal *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (95,96).

3.3.1 DIFFERENZIAZIONE ADIPOGENICA

3.3.1.1 MATERIALI

- **Dexametasone** (*Sigma Aldrich*), conservato a – 20°C
- **Insulina bovina** (*Sigma Aldrich*), conservata a – 20°C
- **Isobutilmetilxantina** (IBMX, *Sigma Aldrich*), conservata a – 20°C
- **DPBS** (*Lonza*), conservato a + 4°C
- **Formaldeide 40%**, conservata a RT
- **Formaldeide 4% in DPBS**, conservata a + 4°C
- **Oil Red O** (*Sigma Aldrich*), conservato a RT

3.3.1.2 METODICA

Per indurre la differenziazione adipogenica, le cellule PA ed MO sono state coltivate con uno specifico terreno di induzione (AM) così composto: Ham's F12 modificato secondo Coon addizionato con FBS 10%, penicillina 100 IU/ml, streptomicina 100 µg/ml, dexametasone 1 µM, insulina bovina 1 µM, IBMX 0,5 mM. Il terreno è stato cambiato 2 volte a settimana. Le cellule sono state mantenute in coltura per 20 giorni. L'espressione del fenotipo adipogenico è stata valutata mediante marcatura con il colorante Oil Red O, dopo fissazione in formaldeide 4% in DPBS per 5 minuti. Come controllo negativo sono state valutate, per gli stessi parametri, cellule PA e cellule MO non indotte. I campioni sono stati osservati con un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) e le immagini acquisite con telecamera AxioCam HRC e software AxioVision.

3.4 DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA

3.4.1 MATERIALI

- **Ham's F12 modificato secondo Coon** (*Sigma Aldrich*), conservato a + 4°C
- **FBS** (origine *Sud America, BioWhittaker*), conservato a – 20°C
- **penicillina, streptomina** (*Sigma Aldrich*), conservato a + 4°C
- **dexametasone** (*Sigma Aldrich*), conservato a – 20°C
- **acido ascorbico** (*Merck, Darmstadt, Germania*), conservato a + 4°C
- **β-glicerolfosfato** (*Sigma Aldrich*), conservato a + 4°C

3.4.2 METODICA

Le cellule PA ed MO sono state piastrate su polistirene da coltura in GM. In seguito il terreno è stato sostituito con il terreno di induzione osteogenica (OM) così composto: Ham's F12 modificato secondo Coon addizionato con FBS 10%, penicillina 100 IU/ml, streptomina 100 µg/ml, dexametasone 1 nM, acido ascorbico 0,2 mM e β-glicerolfosfato 10 mM. Il terreno è stato cambiato 2 volte a settimana.

L'espressione del fenotipo osteoblastico è stata valutata a tempi diversi dopo l'induzione, mediante la determinazione contemporanea dell'attività di ALP (colorazione citochimica) e della mineralizzazione (colorazioni con Alizarina Red S e con Calceina).

3.5 COLORAZIONE CITOCHIMICA DELL'ALP

3.5.1 MATERIALI

- **Terreno di induzione osteoblastica**, conservato a +4°C
- **DPBS** (*Lonza*), conservato a + 4°C
- **Formaldeide 40%**, conservata a RT
- **Formaldeide 4% in DPBS**, conservata a + 4°C
- **Naftolo AS-MX** (*Sigma Aldrich*) conservato a –20°C
- **Dimetilsolfossido** (DMSO), conservato a RT
- **Sale di diazonio Fast Blue BB** (*Sigma Aldrich*), conservato a –20°C
- **Sale di diazonio Fast Red Violet LB** (*Sigma Aldrich*), conservato a -20°C

- **Carmallume** (*Bio Optica, Milano Italia*), conservato a +4°C
- **Ematossilina** (*Sigma Aldrich*), conservato a RT
- **H₂O ultrapura**

3.5.2 METODICA

Per la colorazione dell'ALP le cellule sono state coltivate in OM in piastre multipozzetto da 24 pozzetti. Le cellule sono state lavate 2-3 volte con DPBS per allontanare cellule non adese e detriti e poi fissate in formaldeide 4% in DPBS per 5 min. La formaldeide è stata rimossa e le cellule sono state lavate 3 volte con acqua deionizzata. Successivamente sono state marcate con una miscela colorante composta da 5 mg di Naftolo-AS-MX fosfato (precedentemente solubilizzato in 1 ml di DMSO), 40 mg di sale Fast Blue BB, e 49 ml di terreno di coltura a pH 8.3 (soluzione preparata al momento dell'uso), per 30 min a 37°C in atmosfera umida con CO₂ al 5%. I nuclei delle cellule sono stati successivamente colorati in rosso con carmallume. Alternativamente sono stati utilizzati Fast Red Violet LB ed ematossilina. Infine i campioni sono stati abbondantemente lavati con acqua ultrapura ed osservati al microscopio valutando l'intensità della colorazione nucleare e ricolorando se insufficiente. I campioni sono stati osservati con un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) e le immagini acquisite con telecamera AxioCam HRC e software AxioVision.

3.6 COLORAZIONE ISTOCIMICA DEI DEPOSITI DI HA

3.6.1 COLORAZIONE CON ALIZARINA RED S

3.6.1.1 MATERIALI

- **Terreno di induzione osteoblastica**, conservato a +4°C
- **DPBS** (*Lonza*), conservato a + 4°C
- **Formaldeide 40%**, conservata a RT
- **Formaldeide 4% in DPBS**, conservata a +4°C
- **Alizarina Red S** (*Sigma Aldrich*), conservata a RT

- **NH₃** (*Sigma Aldrich*), conservata a RT
- **H₂O ultrapura**

3.6.1.2 METODICA

Le cellule sono state coltivate in multiwell da 24 pozzetti in OM e successivamente fissate in formaldeide 4% in DPBS per 5 min. Sono state ricoperte con una soluzione contenente Alizarina Red S 2% (58 mM) in acqua ultrapura a pH 6,0 (ottenuta con aggiunta di NH₃ 2,5% goccia a goccia), lasciandole incubare per 5 min a RT e risciacquate con acqua di fonte. Successivamente è stato valutato al microscopio il livello di colorazione dei depositi (la colorazione viene ripetuta se ritenuta insufficiente) e risciacquata con acqua ultrapura. I campioni sono stati osservati con un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) e le immagini acquisite con telecamera AxioCam HRC e software AxioVision.

3.6.2 COLORAZIONE CON CALCEINA

3.6.2.1 MATERIALI

- **Calceina** (*Sigma Aldrich*), conservata a RT
- **Terreno di induzione osteoblastica**, conservato a +4°C
- **DPBS** (*Lonza*), conservato a +4°C
- **Formaldeide 40%**, conservata a RT
- **Formaldeide 4% in DPBS**, conservata a +4°C
- **Etanolo assoluto** (*Sigma Aldrich*), conservato a -20°C
- **Ioduro di propidio** (*Sigma Aldrich*), conservato a +4°C
- **H₂O ultrapura**

3.6.2.2 METODICA

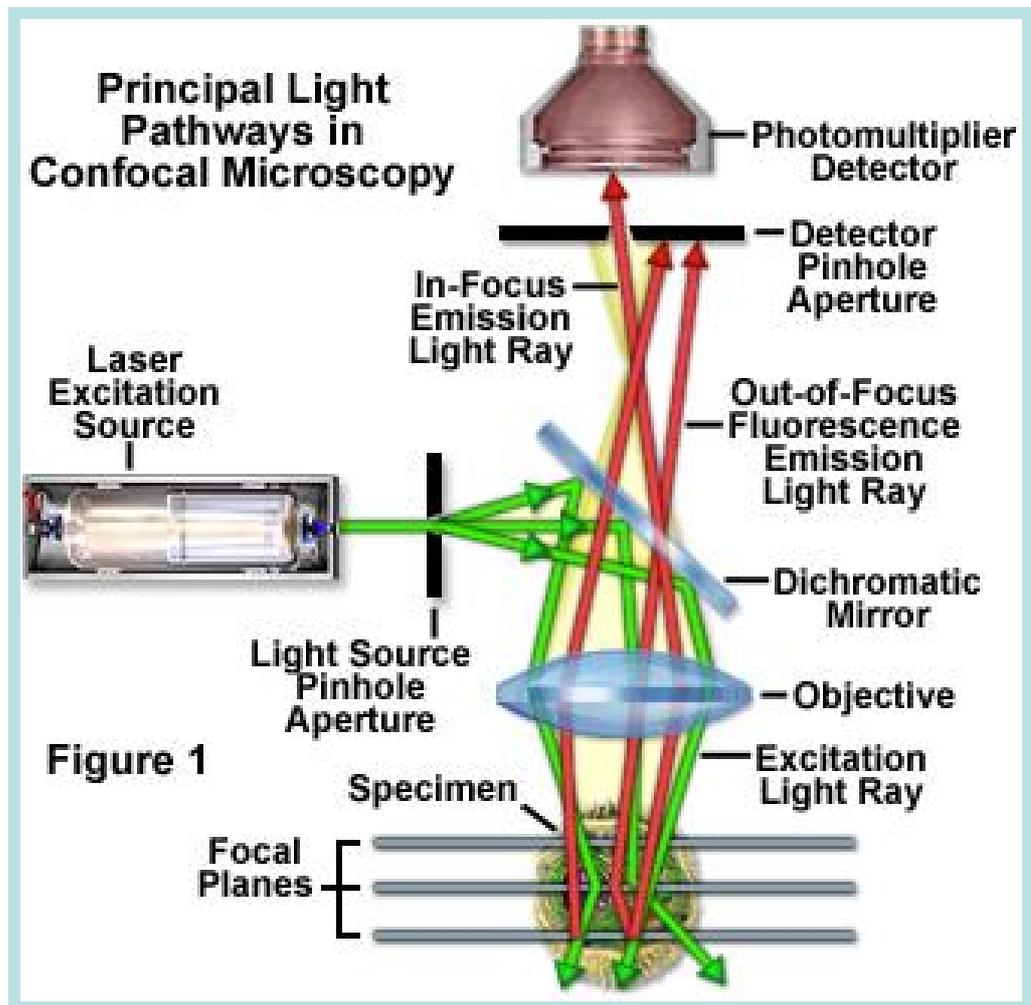
Le cellule sono state coltivate per un tempo compreso tra un minimo di 4 e un massimo di 60 giorni in terreno OM, addizionato con 1 µg/ml di calceina, un fluoroforo (λ_{ex} 494 nm, λ_{em} 517 nm) chelante del Ca²⁺ a bassa affinità (la costante di dissociazione del complesso calceina-Ca²⁺ a pH fisiologico è circa 10⁻³ – 10⁻⁴ M). La calceina si lega

permanentemente agli ioni Ca^{2+} presenti nei cristalli di idrossiapatite (HA) durante la loro formazione. Al termine della coltivazione le cellule sono state lavate 2 volte con DPBS e fissate in formaldeide 4% per 15 min. La formaldeide è stata rimossa, successivamente è stato aggiunto etanolo per la solubilizzazione dei lipidi di membrana al fine di favorire la successiva penetrazione di ioduro di propidio (PI) e la conseguente colorazione nucleare. Le cellule sono state lavate 3 volte con acqua ultrapura. Successivamente è stata effettuata la controcolorazione dei nuclei per 2 min con PI 10 μM (λ_{ex} 530 nm, λ_{em} 625 nm). Le cellule sono state quindi lavate 3 volte con acqua ultrapura ed i campioni sono stati esaminati in Microscopia Confocale a Scansione Laser LSM con un microscopio Axiovert 200M 510 META (Zeiss).

3.7 MICROSCOPIA CONFOCALE A SCANSIONE LASER

La Microscopia Confocale Laser a Scansione (LSCM) rappresenta un'evoluzione della Microscopia a Fluorescenza convenzionale (Epifluorescenza) e si differenzia da questa per la capacità di ottenere immagini nitide di strutture all'interno di campioni spessi. L'invenzione del Microscopio Confocale viene attribuita a Marvin Minsky che nel 1955 sviluppò il primo strumento basato su questa tecnologia, animato dal desiderio di osservare eventi biologici *in vivo*. La produzione del primo microscopio confocale commerciale risale al 1987. La diffusione di tale metodica risale ai primi anni '90. A differenza dei microscopi ad epifluorescenza convenzionale, che utilizzano come sorgenti luminose lampade a vapori di mercurio o lampade allo xenon, il microscopio LSCM utilizza sorgenti di radiazioni luminose monocromatiche coerenti (laser). Le caratteristiche salienti di questo microscopio sono osservabili in figura.

PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO DEL MICROSCOPIO CONFOCALE A SCANSIONE LASER



La fluorescenza proveniente dai piani sopra e sottostanti ai piani del fuoco, piani non a fuoco, contribuisce alla formazione dell'immagine con un contemporaneo degradamento della qualità dell'immagine.

Questo problema è particolarmente sensibile con campioni spessi (oltre $2\mu\text{m}$) che possono mostrare una perdita di definizione tale da far perdere la maggior parte dei dettagli. Il microscopio confocale offre un marginale miglioramento di risoluzione sia in direzione assiale (cioè perdita di fuoco lungo l'asse ottico) che laterale (cioè sul piano focale), ma è in grado di escludere la luce proveniente dai piani focali che sono fuori da quello effettivamente a fuoco in un determinato momento dell'osservazione. In

pratica si ottiene l'effetto di osservare una sezione sottile posta all'interno di un campione più spesso, senza la necessità reale di sezionarlo fisicamente prima di osservarlo.

Con il termine confocalità ci si riferisce al fatto che la sorgente puntuale laser, il *pinhole* (apertura) di rilevazione e il punto illuminato sul piano del fuoco si trovano su piani ottici coniugati e allineati accuratamente sul cammino ottico che determina la formazione dell'immagine (*confocal imaging*). Il vantaggio fondamentale è che pochissima luce oltre quella di interesse (proveniente dal piano di fuoco), passa il *pinhole* raggiungendo il *detector*. Più piccolo è il *pinhole*, minore sarà la luce "parassita" che raggiungerà il *detector*.

La confocalità consente di:

- ottenere immagini più nitide e con migliore contrasto;
- effettuare il sezionamento ottico di preparati spessi (fino ad alcune centinaia di μm);
- ottenere un miglioramento del potere di risoluzione del microscopio avvicinandosi al limite teorico ($0,2 \mu\text{m}$).

La scansione del campione mediante il laser sul piano X/Y consente di ottenere un'immagine di un particolare piano del campione. E' possibile ottenere informazioni 3D su un campione, muovendo il fuoco di eccitazione non solo sul piano in XY ma anche lungo l'asse Z. La ricostruzione 3D viene ottenuta muovendo verticalmente lo stativo dopo aver effettuato la scansione di un piano XY. Il risultato finale è una *Z-stack* (catasta), cioè una serie di immagini del piano XY rappresentanti sezione ottiche differenti di un campione. La rielaborazione mediante software permette la costruzione dell'immagine 3D finale in cui tutti i piani risultano a fuoco.

3.8 DOSAGGI

3.8.1 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DI ALP SUL SOPRANATANTE DI CELLULE IN COLTURA MEDIANTE LETTORE DI PIASTRE

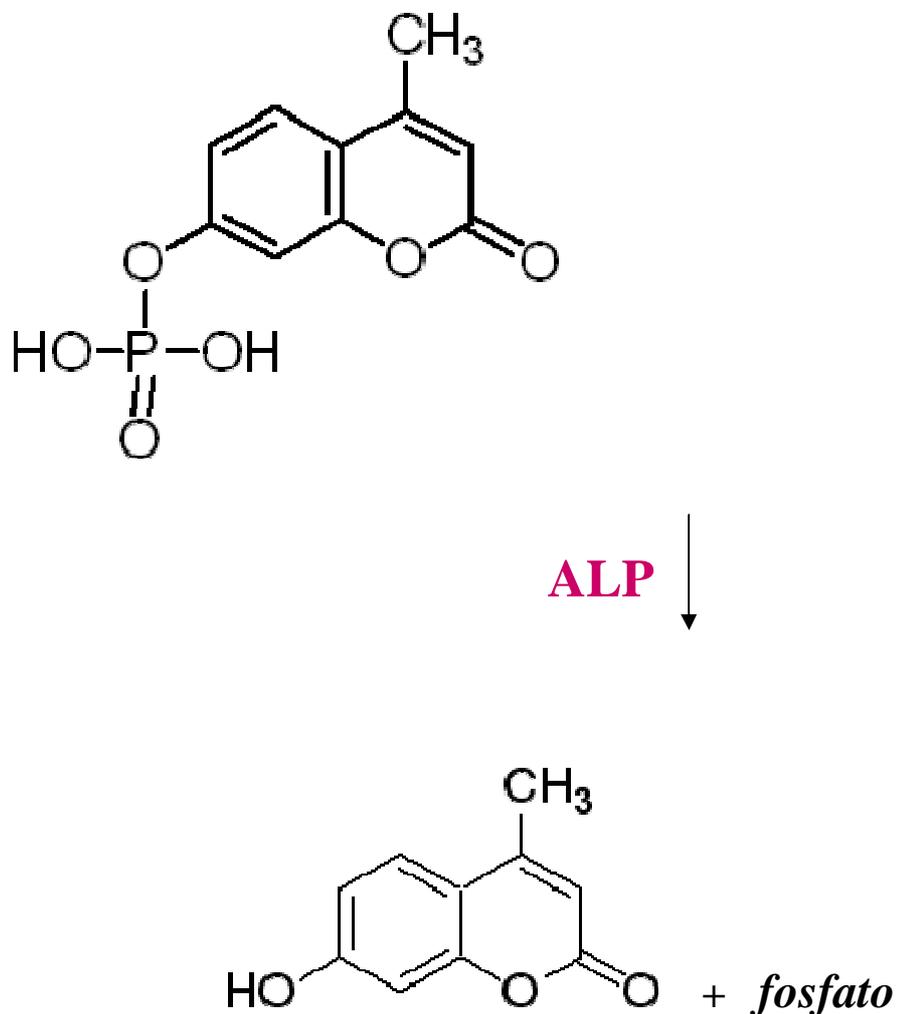
3.8.1.1. MATERIALI

- **Terreno di induzione osteoblastica (OM)**, conservato a +4°C
- **4-metilumbelliferilfosfato sale disodico (4-MUP,β-MUP)**, conservato a -20°C
- **Tampone Tris-HCl 0.2 M pH 8.9**, conservato a +4°C
- **NaOH 0.1 N**, conservato a RT
- **Tampone d'incubazione**: 4-metilumbelliferilfosfato sale disodico (4-MUP, β-MUP), 0.150 mg/ml (0.5 mM) in tampone Tris-HCl 0.2 M pH 8.9; preparato al momento dell'uso.
- **4-metilumbelliferone (4-MU)** (λ_{ex} 365 nm, λ_{em} 445 nm)
- **4-metilumbelliferone (4-MU, β-MU)**, soluzione standard 10 μmoli/ml (10 mM) in tampone d'incubazione, conservata a -20°C.

3.8.1.2 METODICA

La curva standard 4-MU, nell'intervallo di concentrazioni finali 250 μM – 50 nM, è stata preparata a partire dalla soluzione stock 10 mM con diluizioni seriate in tampone d'incubazione. 500 μl di ogni punto della curva standard sono stati trasferiti in pozzetto di piastra da 24 pozzetti, preparando ogni punto in duplicato. Sono stati aggiunti 1500 μl di NaOH 0.1 N ad ogni pozzetto, in modo da ottenere mediante questa diluizione 1:4 le concentrazioni finali prestabilite. Le cellule in coltura, sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti in OM, addizionato con diversi stimoli, e al momento del dosaggio ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 500 μl di tampone d'incubazione per 5 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 1500 μl di NaOH 0.1 N ad ogni pozzetto ed il soprannatante trasferito, poi, in una piastra vergine. La lettura della curva standard e dei campioni è stata effettuata in Spettrofluorimetro LS55 con lettore di piastre (PerkinElmer), con lunghezza d'onda (λ) di eccitazione

365nm, e λ di emissione 445nm, regolando l'ampiezza degli slit di emissione e di eccitazione secondo le esigenze, in modo da rientrare nel range di lettura dello strumento. I dati ottenuti, sono stati riportati su un foglio elettronico Excel per i successivi calcoli. L'unità di attività specifica (U) di ALP viene definita come la quantità di enzima che idrolizza 1.0 μ mole di substrato, 4-MUP in questa metodica, per minuto a 37°C ad un pH di 8.9, con conseguente produzione di 4-MU più fosfato, come mostra la reazione sottostante.



3.8.2 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DI HA

3.8.2.1 MATERIALI

- **Calceina** (λ ex 494 nm, λ em 517 nm)
- **Calceina 100 μ g/ml in H₂O**, conservata a -20°C
- **Terreno di induzione osteoblastica (OM)** con Calceina 1 μ g/ml, conservato a $+4^{\circ}\text{C}$
- **H₂O ultrapura**
- **DPBS**, conservato a $+4^{\circ}\text{C}$
- **Formaldeide 4% in PBS**, conservata a $+4^{\circ}\text{C}$
- **EDTA sale disodico, sodio editato**, conservato a RT
- **EDTA sale disodico 50 mM 18.612 g/l**, conservato a RT
- **Idrossiapatite (HA)**, conservata a RT
- **Idrossiapatite (HA) soluzione fluorescente standard 1 mg/ml in NaEDTA 50 mM**, conservata a $+4^{\circ}\text{C}$

3.8.2.2 METODICA

La soluzione fluorescente standard di HA è stata preparata pesando 10 mg di HA e trasferendoli in provetta, dove poi sono stati aggiunti 5 ml di calceina 100 μ g/ml; la sospensione è stata agitata ed incubata a RT per 60 min. La calceina non chelata alla HA è stata, quindi eliminata mediante 3-4 lavaggi con H₂O ultrapura e successive centrifugazioni a 2000xg per 5 min. Al pellet HA-calceina sono stati aggiunti, poi, 10 ml di NaEDTA 50 mM; la provetta è stata agitata ed incubata, fino a completa solubilizzazione della HA. La soluzione (soluzione standard corrispondente a 1 mg/ml di HA) può essere conservata a $+4^{\circ}\text{C}$ al buio fino al momento della preparazione della curva standard. Le linee cellulari sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti in OM contenente calceina 1 μ g/ml per il tempo necessario, indicativamente questo tempo può variare da 4 g a 60 gg. Le cellule sono state fissate in formaldeide 4% per 15' a RT e risciacquate 2 volte con H₂O ultrapura. I campioni sono stati conservati a $+4^{\circ}\text{C}$ fino al momento del dosaggio. Al momento del dosaggio i campioni sono stati incubati con 2 ml di NaEDTA 50 mM al buio a RT per 30 min. Trascorso questo tempo è stato

verificato al microscopio l'andamento della solubilizzazione dei depositi di HA; se questa non è risultata completa l'incubazione è stata prolungata. Al termine i campioni sono stati letti in cuvetta in spettrofluorimetro LS55 (PerkinElmer) a λ_{ex} 494 nm e λ_{em} 517 nm insieme ad una curva standard di HA nell'intervallo di concentrazioni 25 ng/ml – 500 μ g/ml, e preparata al momento della lettura diluendo la soluzione stock di HA 1mg/ml con NaEDTA 50 mM. Per la lettura gli slit di eccitazione e di emissione sono stati regolati in modo che i valori rientrino nel range di lettura dello strumento, anche per i campioni più concentrati. I dati ottenuti sono stati riportati su un foglio elettronico Excel per i successivi calcoli.

4. RISULTATI

4.1 ANALISI DELLA CRESCITA CELLULARE IN PRESENZA DI Sr^{2+}

Sono state saggiate concentrazioni di Sr^{2+} da 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$ in terreno Coon's + 1,5% FCS senza fattori di induzione osteogenica in curve di crescita da 0 a 288 ore (12 giorni) su dieci linee cellulari primarie umane di ADSCs allestite nel laboratorio e classificate come PA1, PA9, PA19, PA20, PA26, PA29, PA31, PA34, PA37, PA42, su tre linee cellulari primarie umane di BMMSCs allestite nel laboratorio e classificate come MO1, MO3, MO5 e sulla linea continua osteoblast-like SaOS-2, derivata da osteosarcoma umano. Non è stato utilizzato terreno di induzione osteogenica, in quanto questo avrebbe portato durante il periodo della curva di crescita all'ottenimento di una popolazione cellulare eterogenea. Sarebbero, infatti, state presenti contemporaneamente cellule staminali, cellule a vario grado di differenziazione, ognuna con una propria capacità proliferativa e cellule terminali (queste ultime, in presenza di grossi depositi di HA) non più in grado di proliferare. Non saremmo stati in grado, conseguentemente, di poter elaborare una corretta regressione essendo venuta meno l'assunzione che tutte le cellule di una popolazione cellulare si dividano e che lo facciano approssimativamente impiegando lo stesso tempo.

L'elaborazione statistica delle curve di crescita ha evidenziato la significatività di tutte le rette di regressione in tutti gli esperimenti effettuati, valutata mediante:

- test per la linearità con il test t di Student, che ha mostrato un'elevata significatività con valori di $p < 0,001$ per tutte le regressioni,
- coefficiente di determinazione R^2 , che è risultato sempre maggiore di 0,80, quando nella ricerca biologica in genere si assume che un buon fitting si abbia quando $R^2 > 0,60$.

I risultati dei test per il parallelismo hanno mostrato differenze significative per alcune concentrazioni di Sr^{2+} su nove linee cellulari di PA e 3 linee cellulari di MO. Sulla linea PA1 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni di 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 15 giorni (g) e 16 ore (h) per il controllo, 7g 19^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 7g 7^h. Sulla linea PA9 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 6g 22^h per il controllo, 4g per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 4g 3^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ (**figura 3 A**). Sulla linea PA19 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 6g 14^h per il controllo, 3g 22^h per Sr^{2+} 10 $\mu\text{g/ml}$, 2g 20^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 2g 16^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea PA20 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 62g 17^h per il controllo, 21g per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 19g 6^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea PA26 non sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per tutte le concentrazioni di Sr^{2+} testate. Sulla linea PA29 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 18g per il controllo, 8g 7^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 7g 19^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea PA31 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 14g per il controllo, 8g 21^h per Sr^{2+} 10 $\mu\text{g/ml}$, 5g 16^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 4g 19^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea PA34 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 156g 18^h per il controllo, 31g 7^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 62g 16^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea

PA37 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per la concentrazione 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 15g 15^h per il controllo e 9g 14^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea PA42 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per la concentrazione 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 13g 21^h per il controllo e 7g 8^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea MO1 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 20g 21^h per il controllo, 13g 21^h per Sr^{2+} 1 $\mu\text{g/ml}$, 15g 13^h per Sr^{2+} 10 $\mu\text{g/ml}$, 8g 8^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ e 7g 19^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea MO3 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 62g 16^h per il controllo, 11g 9^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$, e 10g 10^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$. Sulla linea MO5 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per la concentrazione 50 $\mu\text{g/ml}$, con tempi di raddoppio della popolazione di 13g 21^h per il controllo e 10g 10^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$.

Sulla linea di controllo positivo SaOS-2 sono state osservate differenze significative nella crescita rispetto al controllo per le concentrazioni di 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$ con tempi di raddoppio della popolazione di 2g e 19^h per il controllo, 1g e 17^h per Sr^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$, e 1g 13^h per Sr^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ (**figura 3 B**).

Nel complesso i dati mostrano che la concentrazione di Sr^{2+} 1 $\mu\text{g/ml}$ Sr^{2+} saggiata stimola significativamente l'attività proliferativa in una sola linea cellulare di MO e in nessuna linea cellulare di PA, la concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$ Sr^{2+} saggiata stimola significativamente l'attività proliferativa in due linee cellulari di PA e in una sola linea cellulare di MO, la concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$ Sr^{2+} saggiata stimola significativamente l'attività proliferativa in sette linee cellulari di PA e due linee cellulari di MO, mentre la concentrazione più alta di Sr^{2+} saggiata pari a 50 $\mu\text{g/ml}$

stimola significativamente l'attività proliferativa in nove linee cellulari di PA su dieci e in tutte le linee cellulari di MO (tabella 1, figura 4).

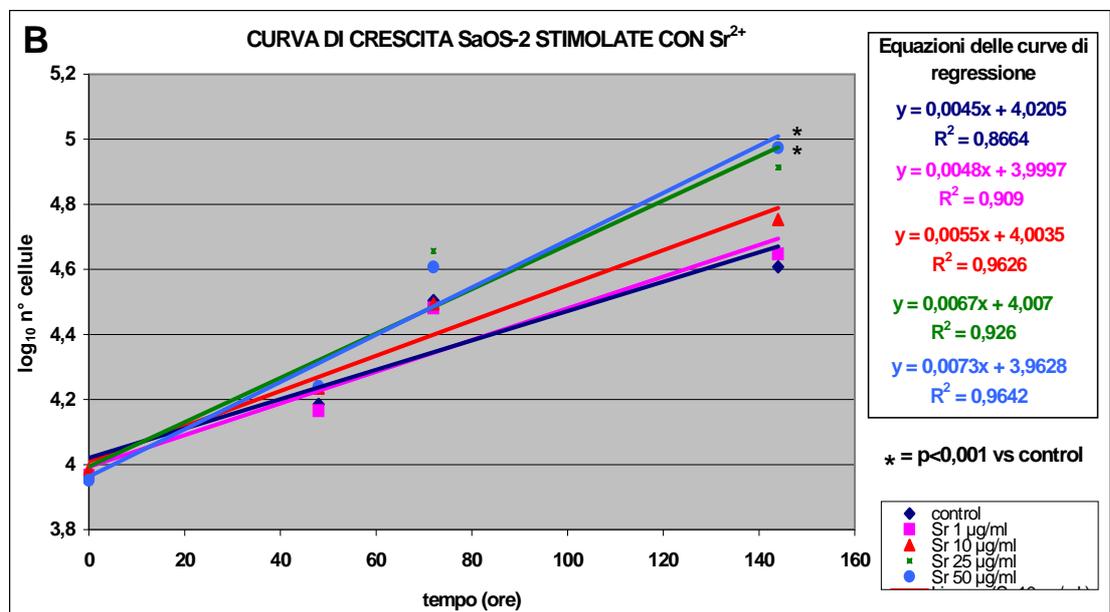
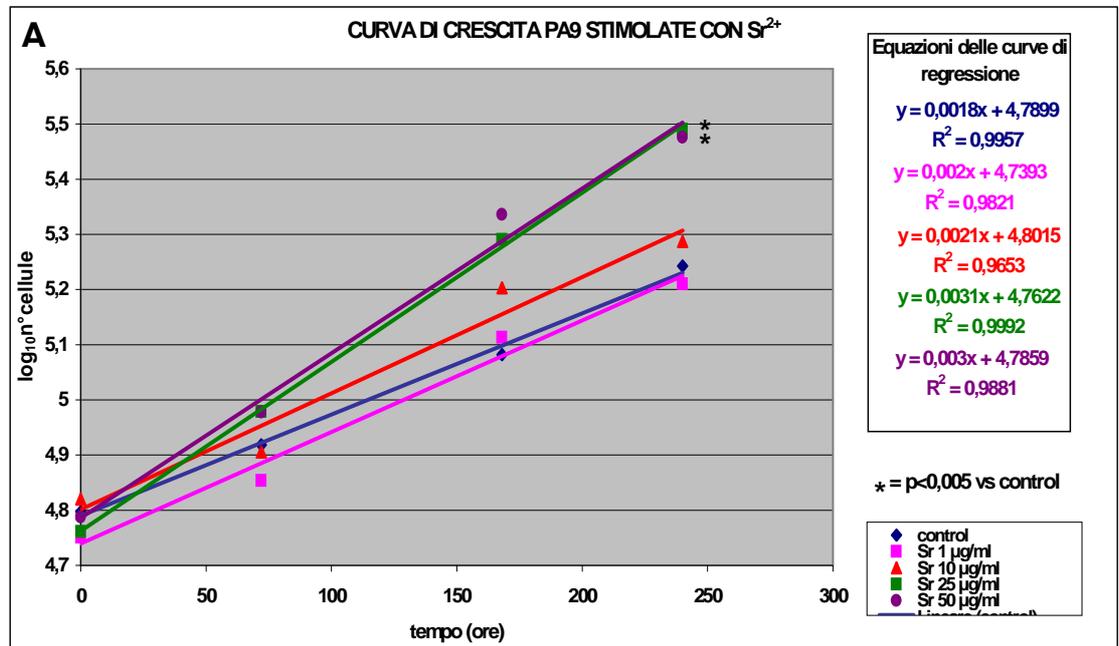


Fig.3. Esempio di rappresentazione in regressione lineare della log fase delle curve di crescita da 0 a 12 giorni di una linea di PA (A); da 0 a 6 giorni per la linea cellulare di controllo SaOS-2 (B), entrambe coltivate in terreno Coon's+FCS 1.5% e con concentrazioni di Sr^{2+} da 0 a 50 µg/ml. Di ogni retta sono riportati l'equazione e il valore di R^2 .

TEMPO DI DUPLICAZIONE DELLA POPOLAZIONE CELLULARE (in ore)														
	PA1	PA9	PA19	PA20	PA26	PA29	PA31	PA34	PA37	PA42	MO1	MO3	MO5	SaOS-2
GM (1%FCS)	376	167	158	1505	100	430	334	3762	376	334	502	1505	334	67
SrCl₂·6H₂O 1µg/ml	301	150	143	1505	111	376	274	3900	376	334	334	1003	370	63
SrCl₂·6H₂O 10µg/ml	301	143	94	1505	116	334	215	3010	430	376	374	1003	301	55
SrCl₂·6H₂O 25µg/ml	188	97	68	502	108	201	137	752	301	274	201	274	334	45
SrCl₂·6H₂O 50µg/ml	176	100	65	462	97	187	116	1505	232	177	188	251	251	41

Tabella 1. I riquadri  indicano differenze significative rispetto al controllo GM.

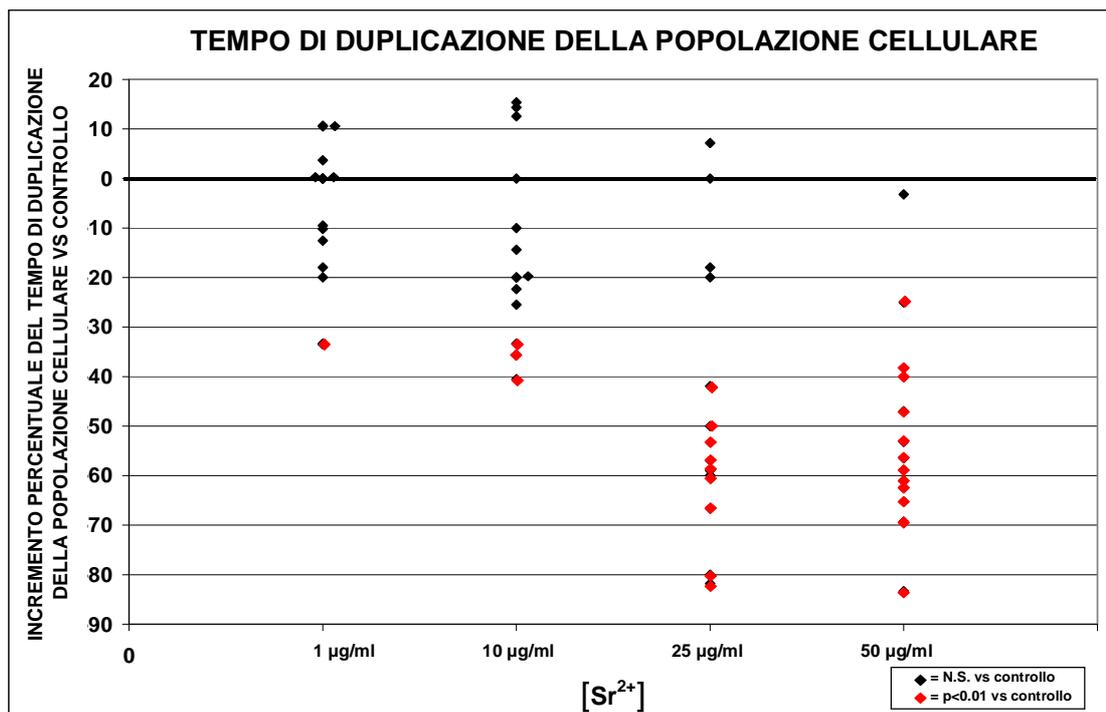


Fig.4. Tempo di duplicazione della popolazione cellulare espresso in ore per le curve di crescita nelle linee PA1, PA9, PA19, PA20, PA26, PA29, PA31, PA34, PA37, PA42, e MO1, MO3, MO5 coltivate in terreno Coon's + FCS 1,5% in presenza di concentrazioni di Sr²⁺ da 0 a 50 µg/ml.

4.2 VALUTAZIONE DELLA MULTIPOTENZA

Di tutte e dieci linee di preadipociti (PA1, PA9, PA19, PA20, PA26, PA29, PA31, PA34, PA37, PA42) e di tutte e cinque linee di BMMSCs (MO1, MO3, MO5, MO6 e MO7) è stata saggiata la multipotenzialità. Tutte le quindici linee presentano la capacità di aderire e proliferare in piastra quando sono mantenute in terreno GM, come può essere verificato mediante osservazione in microscopia a contrasto di fase dove la maggioranza delle cellule mostra una forma fusata, con presenza di alcune cellule in mitosi di forma rotondeggiante e particolarmente luminose (**figura 5 A,B**); la forma risulta essere anche funzione del momento di crescita della popolazione cellulare con perdita parziale della morfologia fusiforme al momento del raggiungimento di confluenza cellulare (**figura 5 C-E**). Per verificare la loro multipotenza, le quindici linee cellulari sono state differenziate verso il fenotipo adipogenico ed osteogenico. L'induzione con un terreno induttivo adipogenico per 20 giorni ha portato all'accumulo di gocce intracellulari contenenti lipidi in diverse cellule per tutte le quindici linee primarie (**figura 6**).

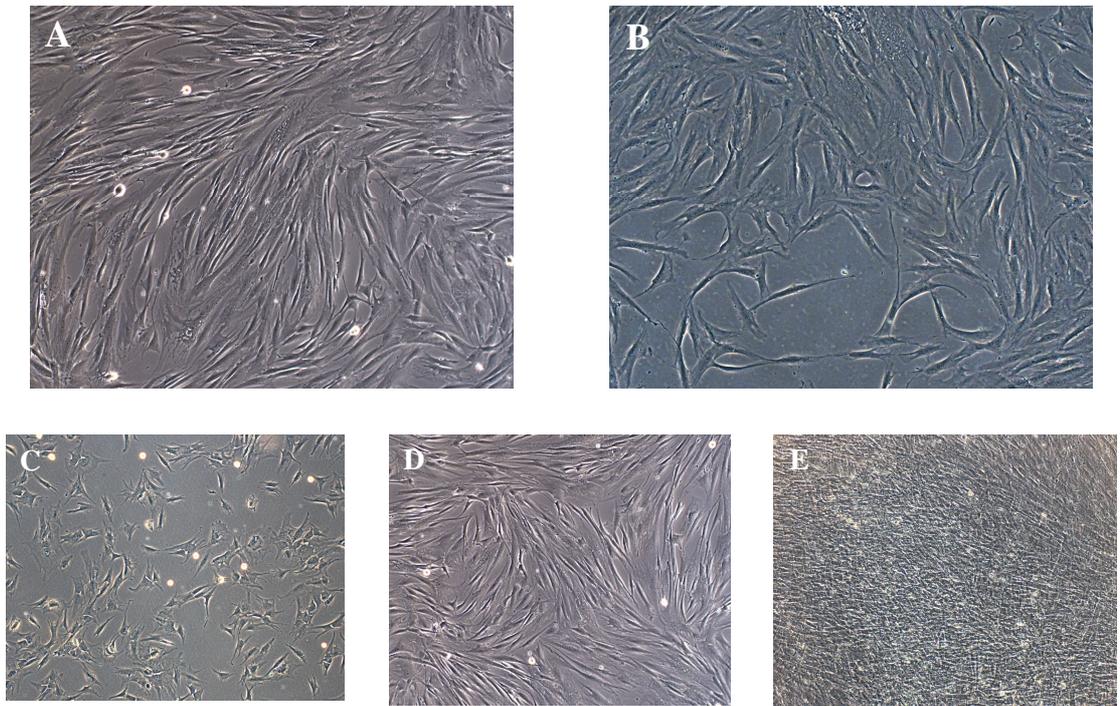


Fig.5. (A,B): Osservazione in microscopia a contrasto di fase di una linea cellulare di PA (A) e di una linea cellulare di MO5 (B) coltivate in GM. (C-E): Osservazione in microscopia a contrasto di fase di una linea cellulare di PA in diversi momenti della crescita della popolazione cellulare, dopo alcune ore dalla semina (C), dopo cinque giorni (D), a confluenza (E).

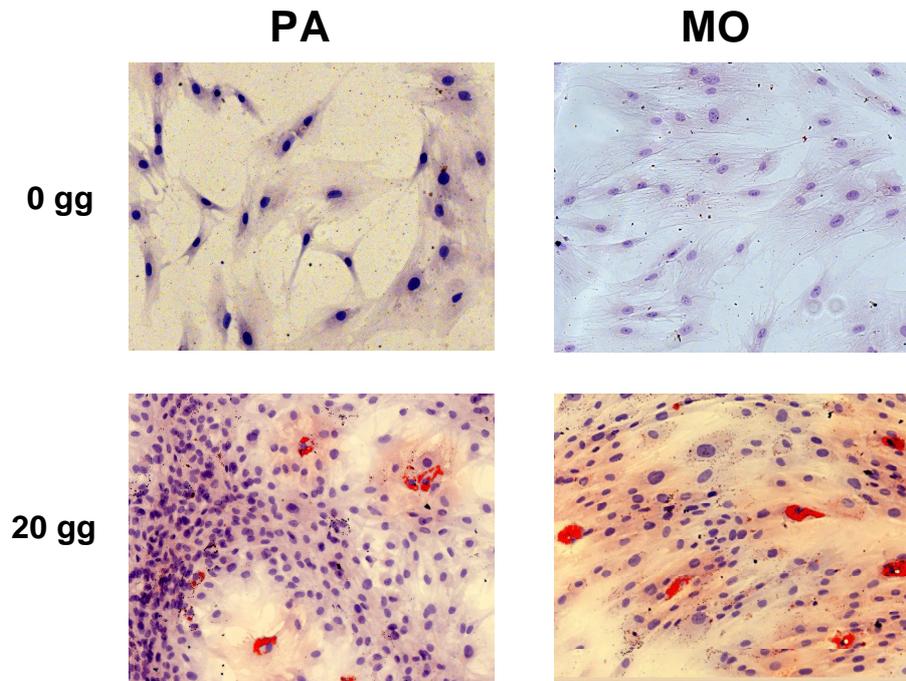


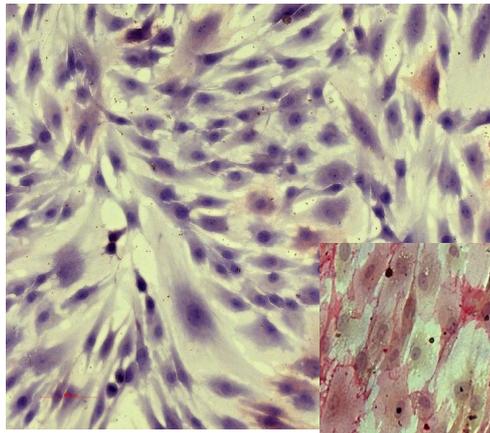
Fig.6. Esempio di valutazione della multipotenza di una linea cellulare di PA e di una linea cellulare di MO. Colorazione con Oil Red O al tempo 0 e dopo 20 giorni di induzione adipogenica; in rosso i depositi intracellulari di lipidi; in azzurro i nuclei controcolorati con ematossilina. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

4.3 DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

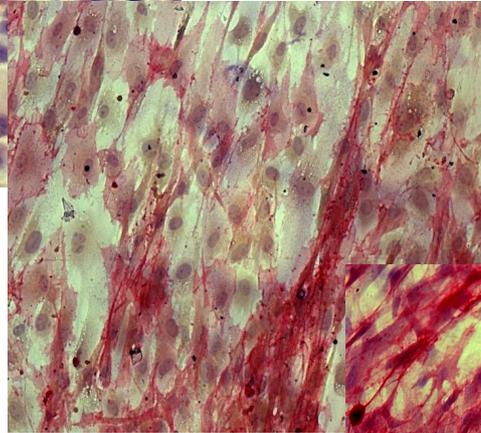
4.3.1 ATTIVITÀ ENZIMATICA DELL'ALP

Il livello iniziale di differenziazione osteogenica delle popolazioni cellulari PA1, PA9, PA19, PA20, PA26, PA29, PA31, PA34, PA37, PA42 e MO1, MO3, MO5, MO6 e MO7 è stato valutato qualitativamente mediante la colorazione citochimica per ALP. Le linee cellulari di PA ed MO quando coltivate in condizioni non osteogeniche ovvero in solo terreno di crescita (*Growth Medium, GM*) mostrano attività di ALP assente o molto limitata (presenza di cellule ALP+ $\leq 1\%$) a conferma di un'assenza basale di differenziazione in senso osteoblastico quasi totale; nelle quindici linee cellulari la coltura in condizioni osteogeniche fino a 35 giorni ha portato all'incremento del numero di cellule ALP positive (ALP+) sempre superiore al 50% della popolazione differenziata in senso osteoblastico fino a raggiungere in alcune linee quasi il 100% (**figura 7,8**).

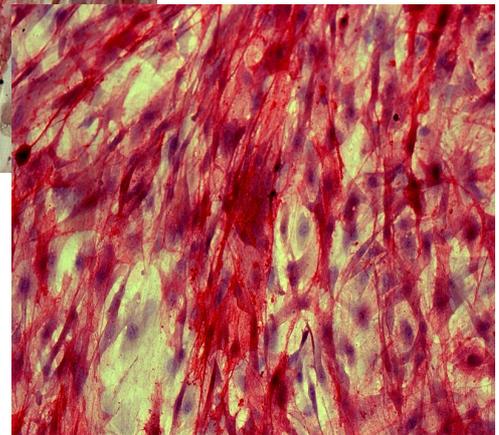
La linea continua SaOS-2, coltivata in condizioni non osteogeniche (GM), mostra con la colorazione citochimica per ALP la presenza dell'enzima nella totalità delle cellule, a conferma dell'avvenuta differenziazione in senso osteoblastico di tutta la popolazione cellulare, propria di queste cellule (**figura 9**).



0 giorni



14 giorni



35 giorni

Fig.7. Esempio di differenziazione osteogenica in una linea PA a diversi tempi di induzione. Colorazione citochimica per ALP. In rosso le cellule positive alla colorazione, in azzurro i nuclei controcolorati con ematossilina.

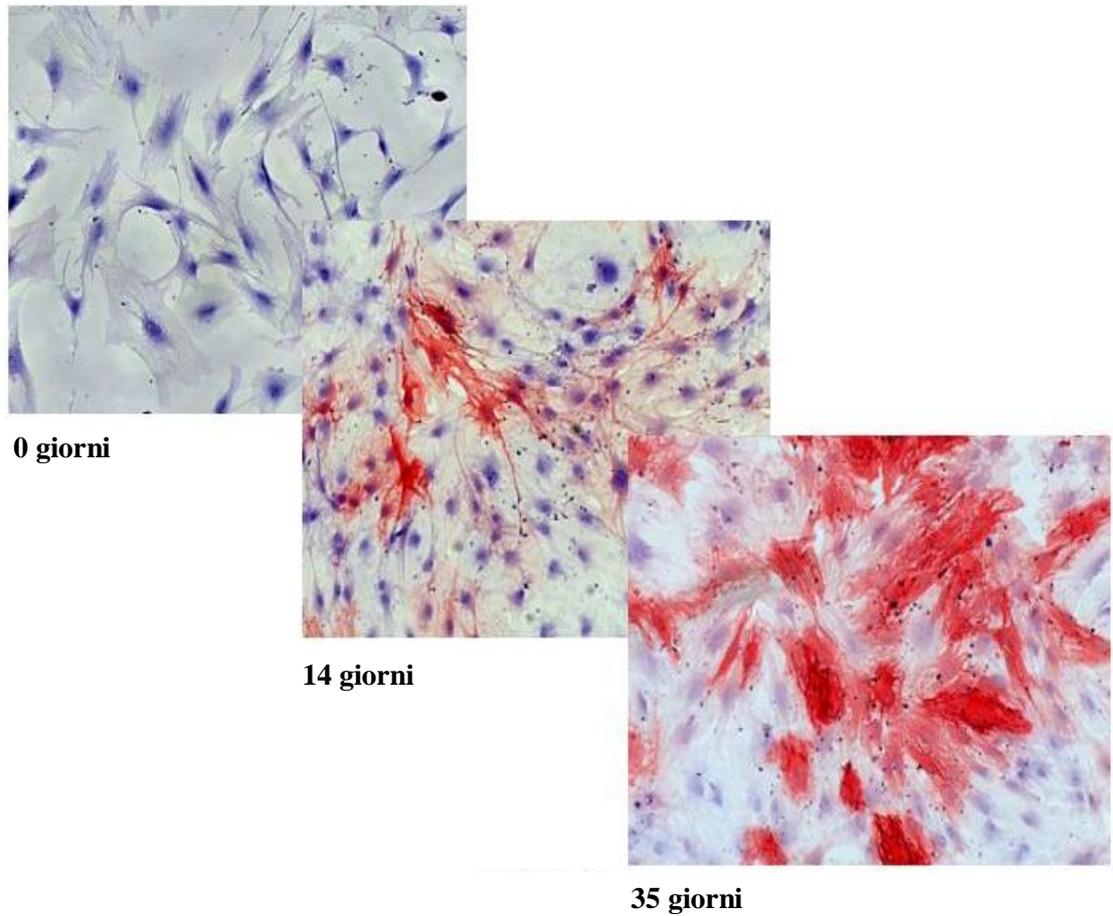


Fig.8. Esempio di differenziazione osteogenica in una linea MO a diversi tempi di induzione. Colorazione citochimica per ALP. In rosso le cellule positive alla colorazione, in azzurro i nuclei controcolorati con ematossilina.

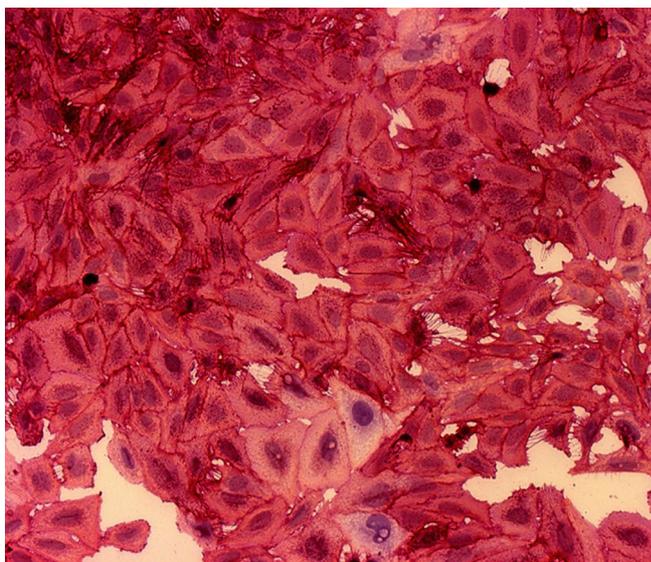


Fig.9. Colorazione citochimica per ALP nella linea SaOS-2 al tempo zero di induzione osteogenica (coltivata in GM). In rosso le cellule positive alla colorazione, in azzurro/violetto i nuclei controcolorati con ematossilina.

4.3.2 FORMAZIONE DEI DEPOSITI DI HA

A tempi lunghi di coltivazione in condizioni osteogeniche insieme alle cellule ALP+ si osserva la formazione di depositi di HA (**figura 10**). I risultati ottenuti confermano l'aumento di produzione di HA in cellule coltivate in terreno di induzione (*Osteogenic Medium, OM*), osservata mediante colorazione con Alizarina Red S dei depositi di calcio mineralizzato. Le linee PA1, PA9, PA19, PA20, PA26, PA29, PA31, PA34, PA37, PA42, MO1, MO3, MO5, MO6 e MO7 e la linea cellulare di controllo SaOS-2 coltivate per 35 giorni in questo terreno mostrano la formazione di noduli mineralizzati di idrossiapatite (HA) il cui numero e la cui dimensione aumentano nel tempo (**figura 11**).

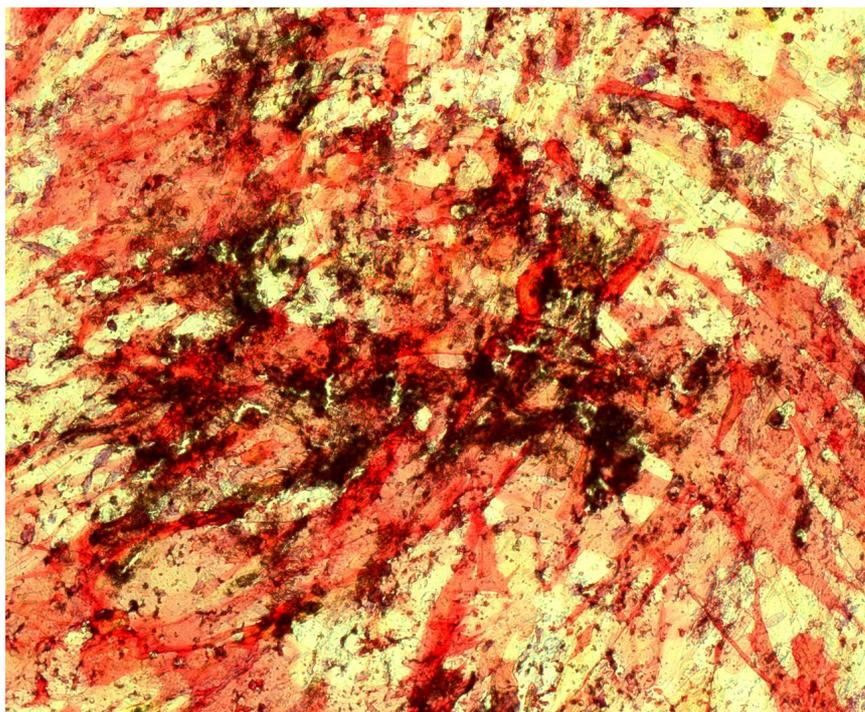
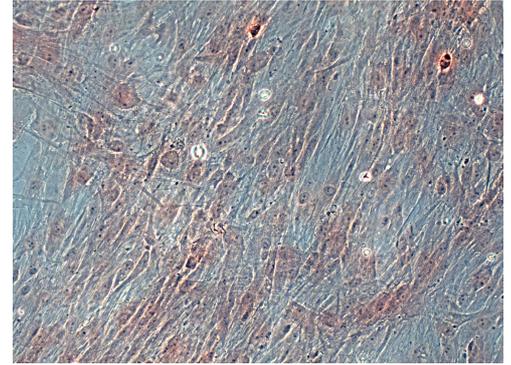
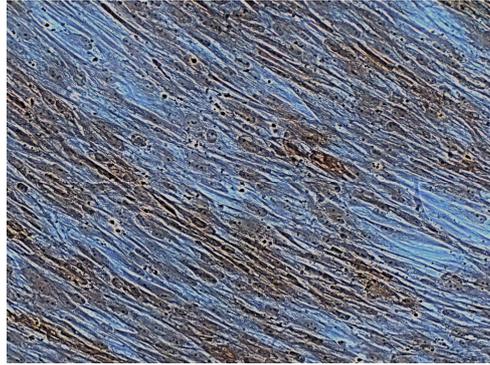


Fig. 10. Osservazione in campo chiaro dopo colorazione citochimica per ALP di una linea PA coltivata in OM per 35 giorni. In rosso le cellule ALP+, in giallo le cellule ALP-, in marrone-nero i depositi di HA.

PA

MO

0 gg



35 gg

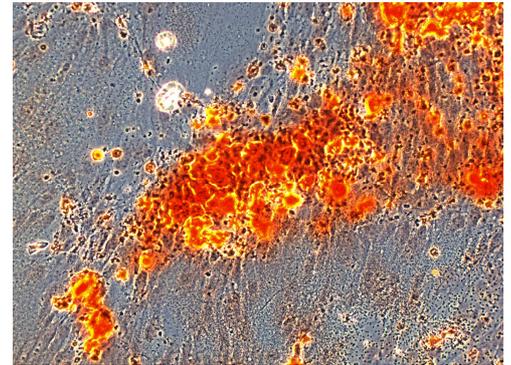
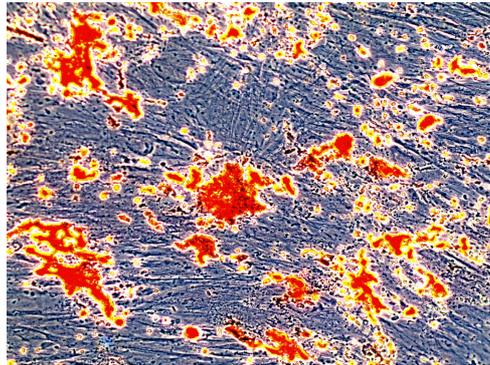
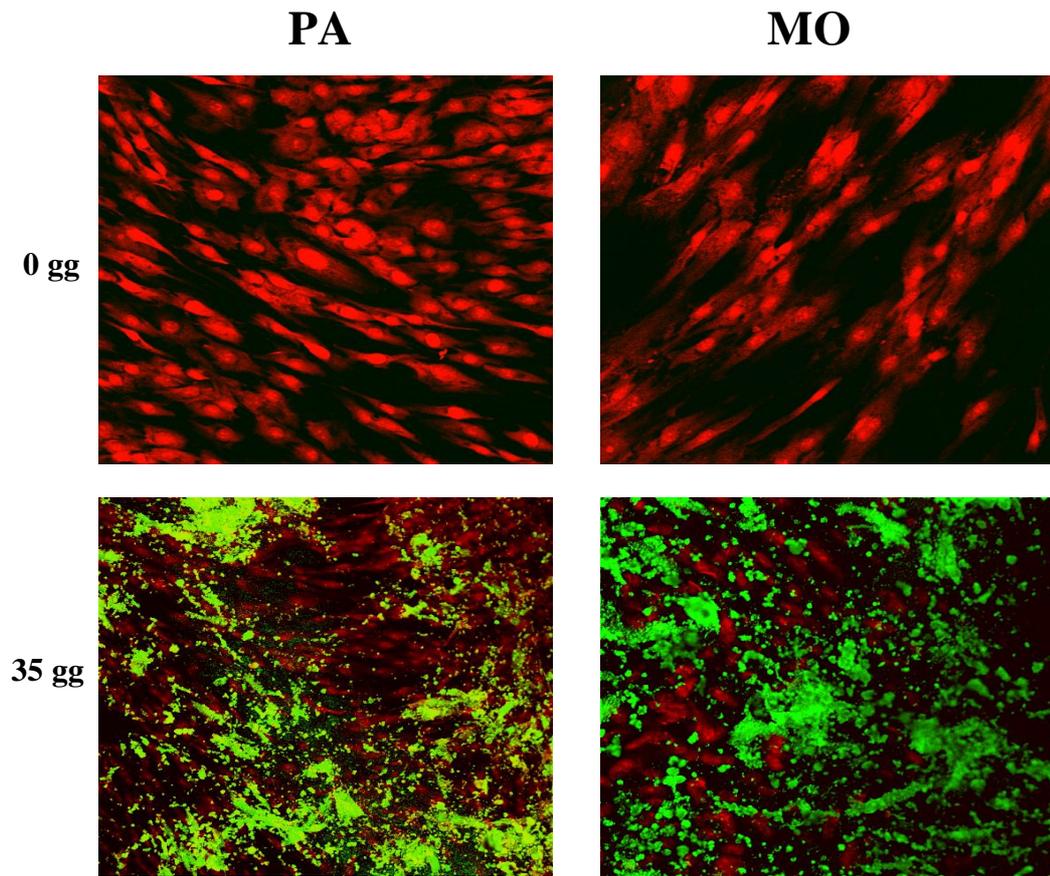


Fig. 11. Osservazione in contrasto di fase di una linea cellulare di PA e di una linea cellulare di MO. Colorazione all'Alizarina Red S per i depositi di HA al tempo 0 e dopo 35 giorni di induzione. In rosso-arancio i depositi di HA. Si può osservare come le cellule (di forma fusata) diminuiscano di numero in presenza di depositi di grosse dimensioni. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

La capacità delle dieci linee cellulari primarie di PA e delle tre linee cellulari primarie di MO di produrre depositi di calcio mineralizzato (HA) è stata valutata anche mediante osservazione in epifluorescenza dopo colorazione con calceina. Le cellule sono state coltivate per 35 giorni in OM o in GM contenenti 1 $\mu\text{g/ml}$ di calceina. Le dieci linee cellulari di PA e le tre linee cellulari di MO cresciute in assenza di induzione non presentano depositi di calcio mineralizzato, mentre quando vengono coltivate in OM sono capaci di formare HA in quantità crescenti nel tempo e qualitativamente paragonabile tra le diverse linee (**figura 12**).



***Fig. 12** Osservazione in microscopia confocale laser (LSCM) di una linea cellulare di PA e di una linea cellulare di MO. Cellule coltivate al tempo 0 e dopo 35 giorni di induzione in presenza di calceina. I depositi di HA appaiono colorati in verde, i nuclei, controcolorati con ioduro di propidio, in rosso. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.*

Un'osservazione più dettagliata in confocalità dei depositi di HA è stata ottenuta mediante la ricostruzione 3D di 35 sezioni (catasta) lungo l'asse Z di un campione di linea PA coltivata 35 giorni in OM (**figure 13,14**).

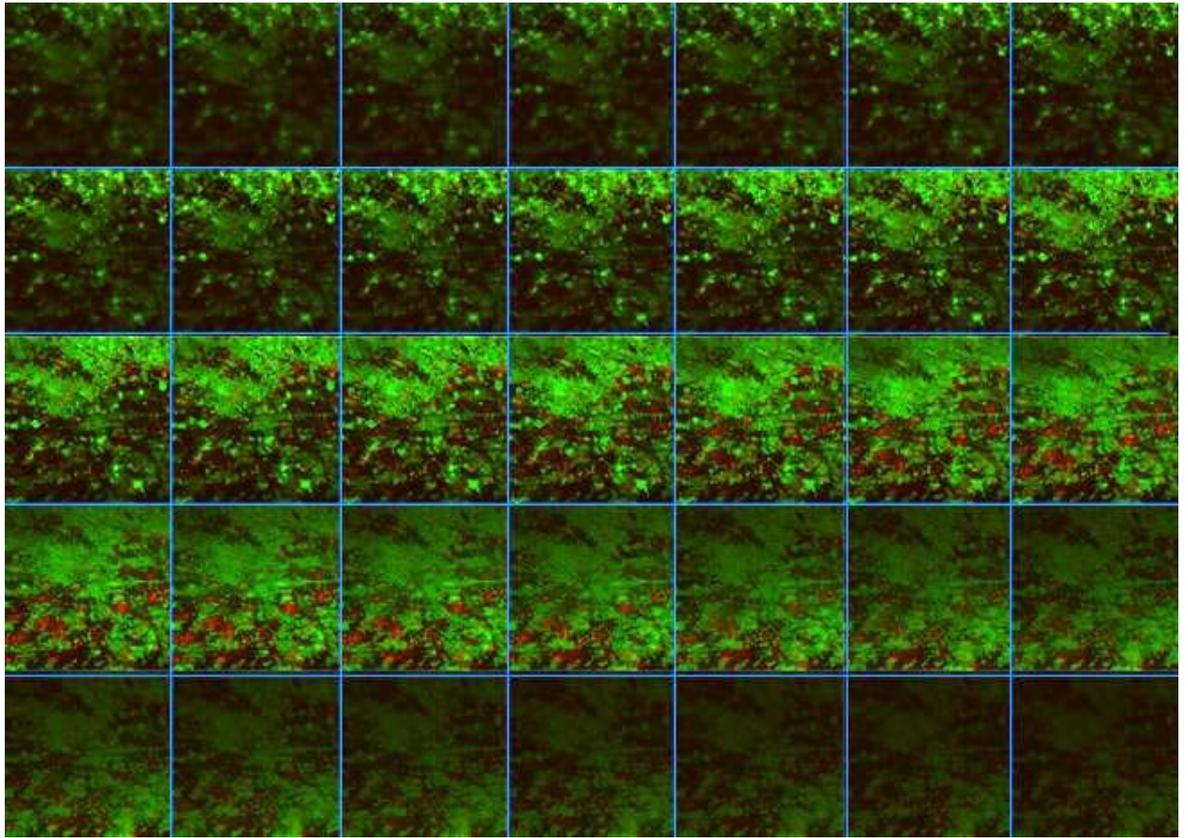


Fig.13. Z-stack (catasta) di 35 sezioni di un campione di una linea PA coltivata 35 giorni in OM osservato in microscopia confocale a scansione laser (LSCM).

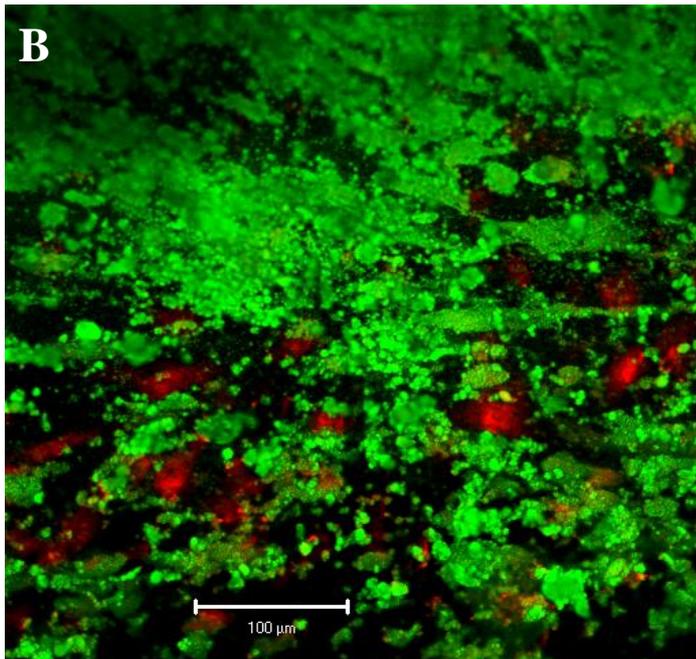
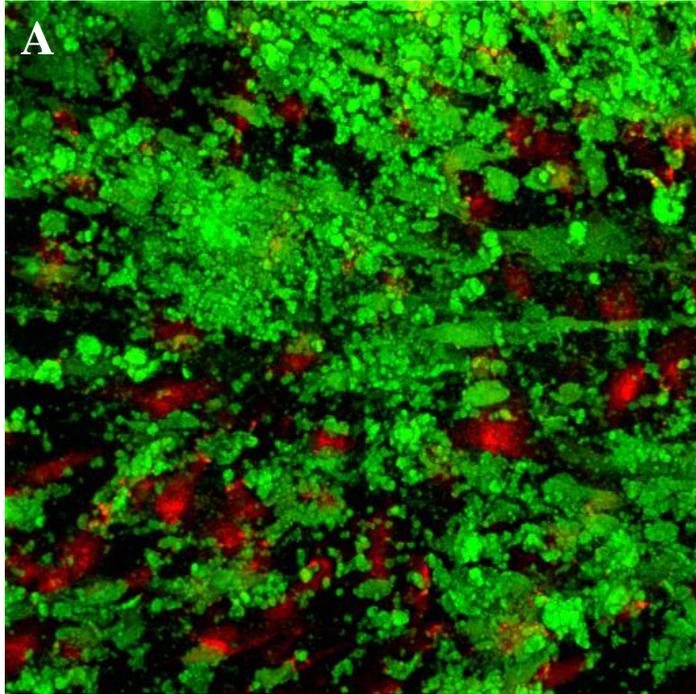


Fig.14. *A: ricostruzione 3D della catasta di 35 sezioni di un campione di una linea cellulare PA visualizzata in figura 13, osservato in LSCM; tutti i piani del campione risultano a fuoco. B: osservazione dello stesso soggetto della figura 14A in assenza di confocalità; si notano alcuni piani non a fuoco.*

4.4 DOSAGGI

4.4.1 *DOSAGGIO FLUORIMETRICO DI ALP SUL SOPRANATANTE DI CELLULE IN COLTURA*

Le dieci linee cellulari primarie di PA e le cinque linee cellulari primarie di MO sono state coltivate in GM, in OM e in OM con l'aggiunta di Sr^{2+} a diverse concentrazioni, quali 0,5 – 1 – 5 – 10 – 25 – 50 – 100 $\mu\text{g/ml}$, per 4, 7, 14, 21, 28 e 35 giorni, per valutare l'effetto dello stronzio sull'attività di ALP. L'attività enzimatica è stata dosata mediante saggio fluorimetrico ed espressa in $\mu\text{U/cm}^2$ di superficie di coltura cellulare.

Per la concentrazione 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sono stati osservati incrementi significativi di produzione di ALP rispetto all'OM per le linee cellulari PA29 e PA31 a 21 giorni di trattamento e per le PA37 a 21 e 28 giorni di trattamento.

Per la concentrazione 1 $\mu\text{g/ml}$ sono stati osservati incrementi significativi rispetto all'OM per le linee cellulari PA 9 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA26 a 7 giorni di trattamento, per le PA29 e PA37 a 21 e 28 giorni di trattamento e per le PA31 e PA42 a 21 giorni di trattamento.

Per la concentrazione 5 $\mu\text{g/ml}$ sono stati osservati incrementi significativi rispetto all'OM per le linee cellulari PA9 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA19 a 28 giorni di trattamento, per le PA 26 a 7 e 14 giorni di trattamento, per le PA29 e PA37 a 21 e 28 giorni di trattamento, per le PA31 a 21 giorni di trattamento e per le PA34 dai 14 ai 28 giorni di trattamento.

Per la concentrazione 10 $\mu\text{g/ml}$ sono stati osservati incrementi significativi rispetto all'OM per le PA 9 dai 14 giorni ai 35 giorni di trattamento, per le PA 19 a 28 giorni di trattamento, per le PA 26 a 7 e 14 giorni di trattamento, per le PA 29, le PA 37 e le MO1 a 21 e 28 giorni di trattamento, per le PA 31 a 14 e 21 giorni di trattamento e per le PA 34 dai 14 ai 28 giorni di trattamento.

Per la concentrazione 25 µg/ml sono stati osservati incrementi significativi rispetto all'OM per le PA 1 e le MO7 a 14 giorni di trattamento, per le PA 9 e MO1 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA 19 a 28 giorni di trattamento, per le PA 26 dai 7 ai 28 giorni di trattamento, per le PA 29, PA 37 e MO6 a 21 e 28 giorni di trattamento e per le PA 31 e PA 34 dai 14 ai 28 giorni di trattamento.

Per la concentrazione 50µg/ml sono stati osservati incrementi significativi rispetto all'OM per le PA 1 dai 7 ai 35 giorni di trattamento, per le PA9, PA31 e MO1 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA19 a 28 giorni di trattamento, per le PA20 e MO3 a 28 e 35 giorni di trattamento, per le PA26 dai 7 ai 28 giorni di trattamento, per le PA 29, PA37 e MO6 a 21 e 28 giorni di trattamento, per le PA34 dai 14 ai 28 giorni di trattamento, per le PA42 a 21 giorni di trattamento e per le MO7 a 14 e 21 giorni di trattamento.

Per la concentrazione 100 µg/ml sono stati osservati incrementi significativi rispetto all'OM in tutte le linee cellulari di PA e MO, in particolare nella linea PA 1 dal 7° giorno di trattamento fino al 35° giorno, per le PA9, PA 31 e MO 1 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA 19, PA29, PA37 e MO6 a 21 e 28 giorni di trattamento, per le PA 20 e MO3 dai 21 ai 35 giorni di trattamento, per le PA 26 dai 7 ai 28 giorni di trattamento, per le PA 34 e MO5 dai 14 ai 28 giorni di trattamento, per le PA 42 a 21 giorni di trattamento e per le MO7 a 14 e 21 giorni di trattamento.

Nel complesso i dati mostrano che la concentrazione più alta di Sr²⁺ pari a 100 µg/ml, stimola significativamente tutte le linee cellulari primarie a 21 giorni di trattamento, la concentrazione di Sr²⁺ 50 µg/ml stimola significativamente dodici linee cellulari su quindici saggate a 28 giorni di trattamento e al diminuire della concentrazione di Sr²⁺ la responsività decresce fino alla concentrazione di Sr²⁺ pari a 0.5 µg/ml, la quale risulta essere in grado di stimolare significativamente un massimo di 3 linee cellulari a 21 giorni di trattamento, come raffigurato nella (**figura 15**).

Il grafico riepilogativo è stato messo a punto assemblando le significatività per le diverse concentrazioni di Sr^{2+} , nelle linee cellulari saggiate a diversi tempi di induzione (**figura 16**).

La linea cellulare continua di controllo, SaOS-2, non risulta influenzata dalle diverse concentrazioni di Sr^{2+} testate per la produzione di ALP (dati non mostrati).

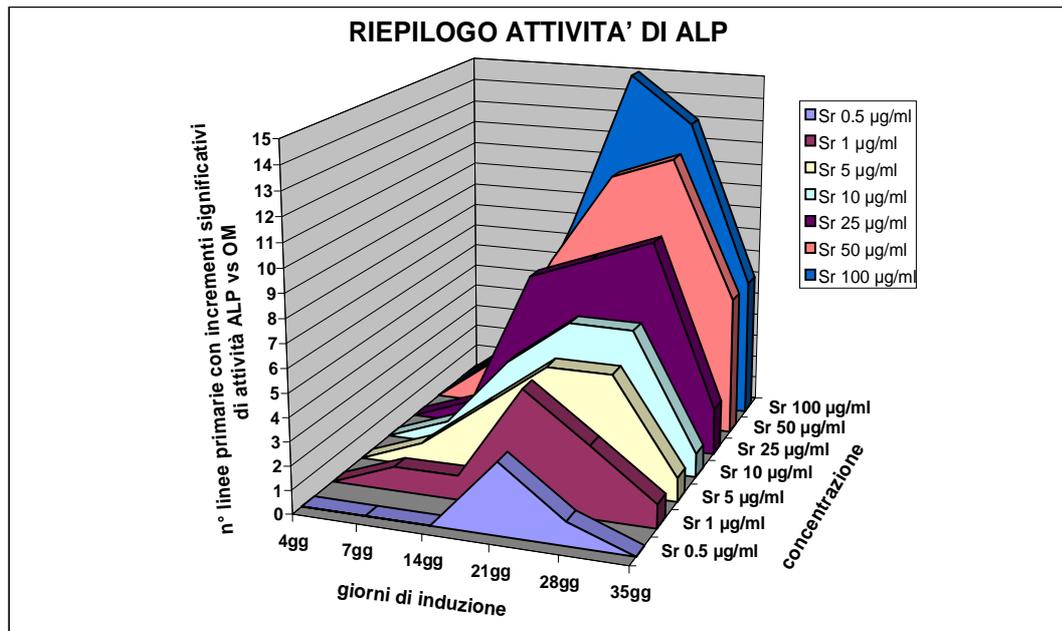


Fig. 15. Grafico riepilogativo dell'andamento nel tempo dell'attività di ALP in presenza di diverse concentrazioni di Sr^{2+} per le dieci linee primarie di PA e per le cinque linee primarie di MO. Sull'asse x sono riportati i giorni d'induzione, sull'asse y le concentrazioni di Sr saggiate, sull'asse z il numero di linee con incrementi significativi di attività di ALP per $[Sr^{2+}]$ versus OM.

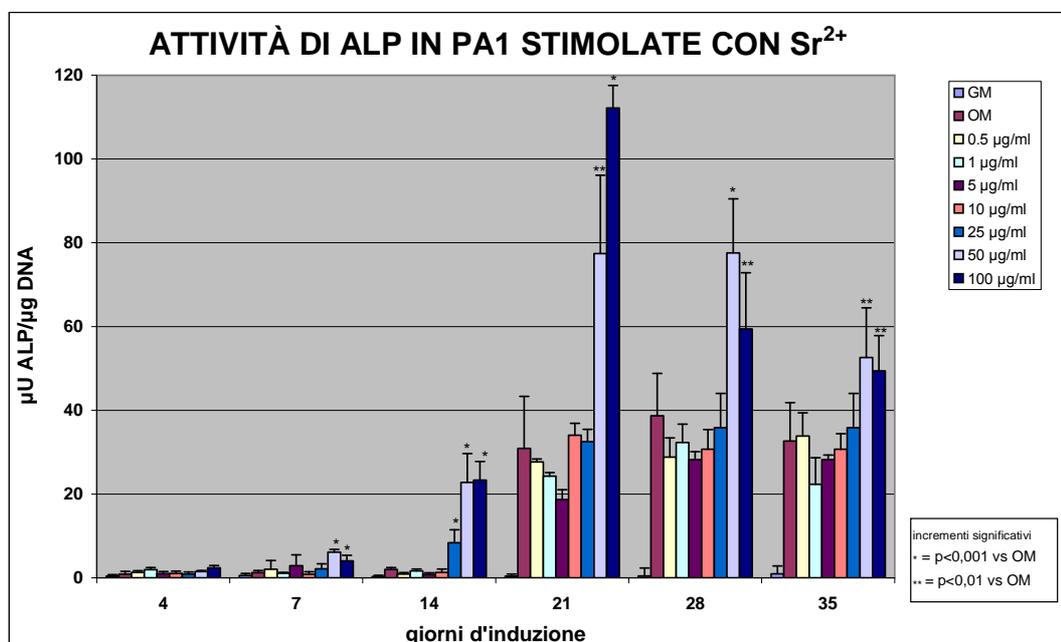


Fig. 16 Analisi quantitativa della produzione di fosfatasi alcalina (ALP) in una linea primaria di PA coltivata da 4 a 35 giorni in OM in presenza di concentrazioni scalari di Stronzio.

4.4.2 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DI HA

Sono state saggiate concentrazioni di Sr^{2+} da 0,5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ sulla produzione di idrossiapatite (HA) nelle linee PA1, PA9, PA19, PA20, PA29, PA31, PA34, MO1, MO3 e MO5 ai tempi 4, 7, 14, 21, 28 e 35 giorni. La HA è stata dosata mediante dosaggio fluorimetrico con calceina ed i risultati sono stati espressi in μg di HA/ cm^2 di superficie di coltura cellulare.

La concentrazione 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ha prodotto incrementi significativi rispetto all'OM in nove linee di PA e due di MO, specificamente, per le PA1, PA34, MO3 e MO5 da 21 a 35 giorni di trattamento, per le PA 9, PA20 e PA31 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA19 e MO1 a 28 e 35 giorni di trattamento, per le PA29 a 35 giorni di trattamento.

La concentrazione 1 $\mu\text{g/ml}$ ha prodotto incrementi significativi rispetto all'OM per le PA1, PA9, PA19, PA31, PA34 e MO5 dai 21 ai 35 giorni di trattamento, per le PA20 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA29 a 28 e 35 giorni di trattamento, per le MO3 dai 7 ai 35 giorni di trattamento.

La concentrazione 5 $\mu\text{g/ml}$ ha prodotto incrementi significativi rispetto all'OM per le PA1, PA19 e MO5 dai 21 ai 35 giorni di trattamento, per le PA20 dai 14 ai 35 giorni di trattamento, per le PA34 a 28 e 35 giorni di trattamento, per le MO3 dai 7 ai 35 giorni di trattamento.

La concentrazione 10 $\mu\text{g/ml}$ ha prodotto incrementi significativi rispetto all'OM per le PA1 a 21 giorni, per le PA19 dai 21 ai 35 giorni di trattamento, per le PA20 e le MO3 dai 14 ai 35 giorni dal trattamento.

La concentrazione 25 $\mu\text{g/ml}$ ha prodotto incrementi significativi rispetto all'OM per le PA19 a 21 e 28 giorni di trattamento e per le MO3 dai 14 ai 35 giorni di trattamento.

La concentrazione 50 µg/ml ha prodotto incrementi significativi rispetto all'OM per le PA19 a 21 e 28 giorni di trattamento e per le MO3 dai 14 ai 35 giorni di trattamento.

La concentrazione 100 µg/ml ha prodotto incrementi significativi rispetto all'OM per le PA19 a 21 e 28 giorni di trattamento e per le MO3 dai 21 ai 35 giorni di trattamento.

In conclusione, i dati mostrano che incrementi significativi di produzione di HA rispetto all'OM sono stati osservati per le concentrazioni di Sr^{2+} 0,5-1-5 µg/ml nella maggior parte delle linee cellulari studiate, mentre per le concentrazioni di Sr^{2+} 50 e 100 µg/ml è stata osservata un' inibizione della produzione di HA rispetto all'OM nell'intervallo di tempo 21 – 35 giorni di trattamento in tre linee cellulari (dati non mostrati), quindi i dati delle linee cellulari saggiate mostrano che lo Sr^{2+} a basse concentrazioni (0.5-5 µg/ml) stimola produzione di HA a differenza delle alte concentrazioni (10-100 µg/ml) che la inibiscono.

In particolare, è stato osservato che la concentrazione di Sr^{2+} pari a 0,5µg/ml stimola significativamente tutte le linee cellulari saggiate a 35 giorni di trattamento, la concentrazione di Sr^{2+} pari a 1µg/ml stimola significativamente nove linee cellulari su dieci saggiate a 28 giorni di trattamento, la concentrazione di Sr^{2+} pari a 5µg/ml stimola significativamente sei linee cellulari su dieci saggiate a 28 giorni di trattamento e che all'aumentare delle concentrazioni di Sr^{2+} la responsività decresce fino alla concentrazione di Sr^{2+} 100 µg/ml, la quale è in grado di stimolare significativamente due linee cellulari su dieci a 21 giorni di trattamento (**figura 17**). Il grafico riepilogativo è stato messo a punto assemblando le significatività per le diverse concentrazioni di Sr^{2+} , nelle linee cellulari saggiate a diversi tempi di induzione (**figura 18 A**).

Infine, come per le linee primarie anche nella linea cellulare di controllo SaOS-2 le concentrazioni di Sr^{2+} 0.5 e 1 µg/ml si sono dimostrate essere le concentrazioni più

responsive per la produzione dei depositi di HA, anche se nella linea di controllo la risposta significativa risulta anticipata a 4 giorni di trattamento (**figura 18 B**).

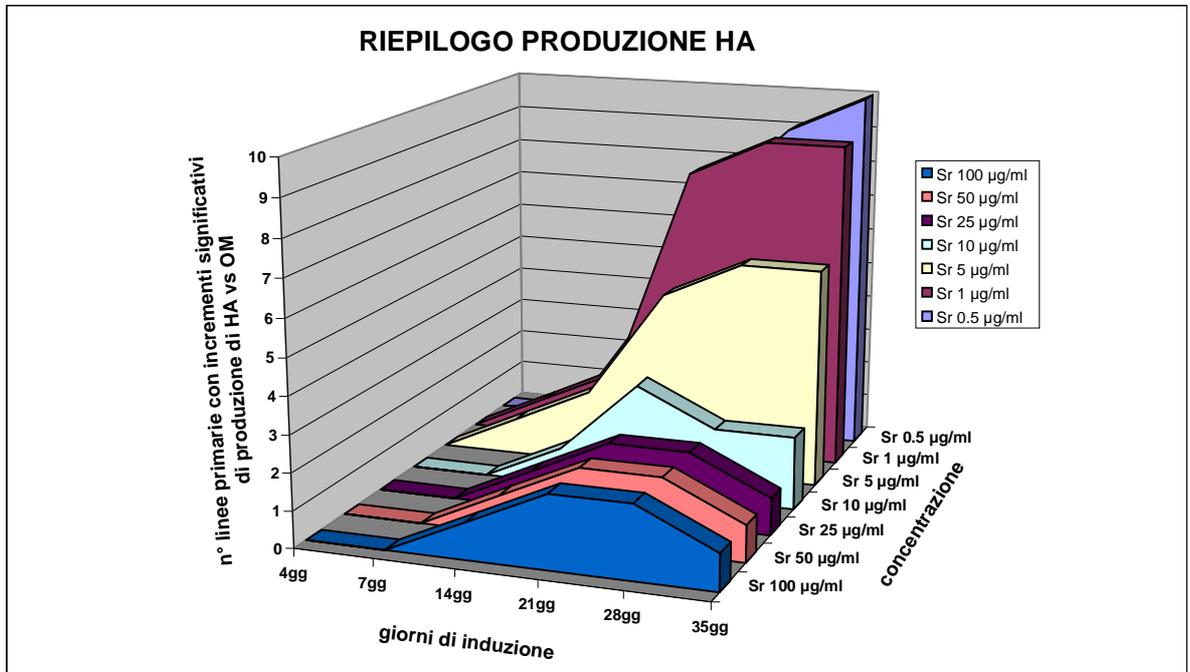


Fig. 17. Riepilogo dell'andamento nel tempo della produzione di HA in presenza di diverse concentrazioni di Sr^{2+} per le linee primarie di PA ed MO. Sull'asse x sono riportati i giorni d'induzione, sull'asse y le concentrazioni di Sr^{2+} saggiate, sull'asse z il numero di linee con incrementi significativi di produzione di HA per $[Sr^{2+}]$ versus OM.

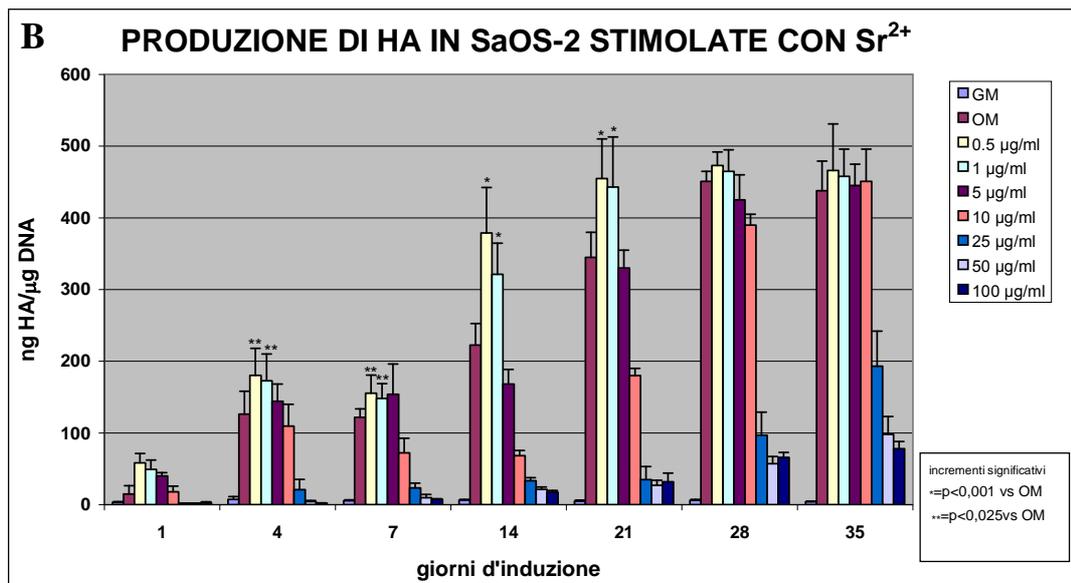
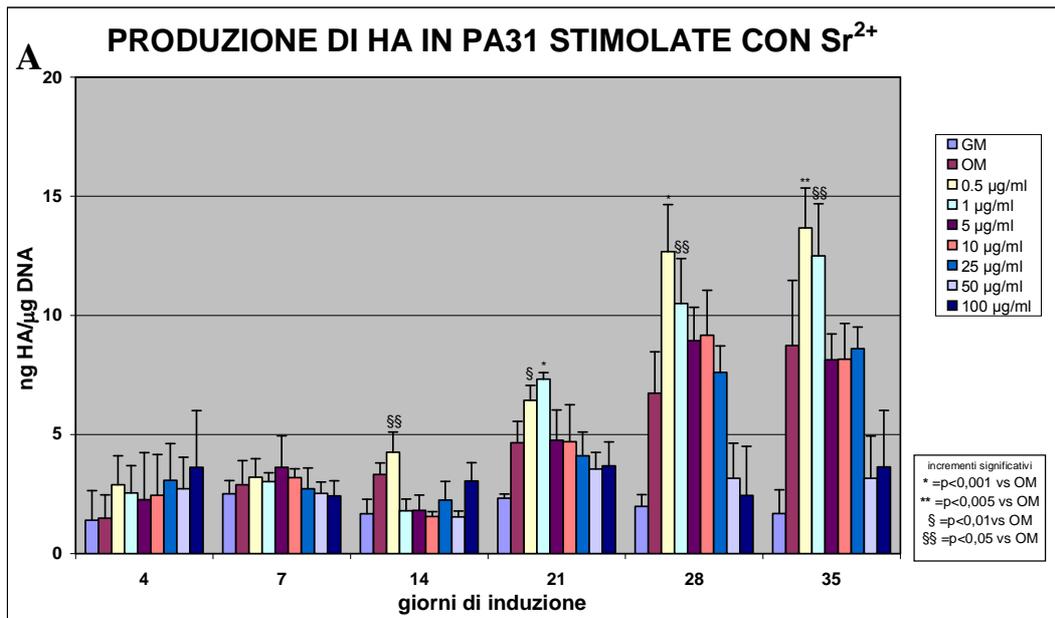


Fig. 18 Analisi quantitativa della produzione di idrossiapatite (HA) in una linea primaria di PA (**A**) e della linea di controllo SaOS-2 (**B**) coltivate da 4 a 35 giorni in OM in presenza di concentrazioni scalari di Stronzio (Sr²⁺).

5.CONCLUSIONI

Gli approcci dell'ingegneria tissutale nello studio per la riparazione del tessuto scheletrico si sono focalizzati sulle terapie cellulari che utilizzano le BMMSCs. Successivamente, nella ricerca di nuove fonti di progenitori degli osteoblasti le cellule derivate dal tessuto adiposo si sono dimostrate dei candidati ideali per questo scopo, in quanto hanno mostrato di possedere le stesse potenzialità delle BMMSCs, con il vantaggio di essere più facilmente ottenibili, ed in quantità superiori se rapportate alle BMMSCs. Queste premesse hanno permesso di utilizzare le ADSCs come modello *in vitro* per la sperimentazione di farmaci utilizzati nella terapia antiosteoporotica, al fine di indagare il meccanismo alla base della loro azione. Tra gli agenti anti-osteoporotici di ultima generazione è risultato molto interessante lo Stonzio Ranelato, farmaco con duplice azione, in grado di diminuire il riassorbimento osseo, inibendo l'osteoclastogenesi, e di promuovere la deposizione di nuova matrice ossea.

In questa mia ricerca ho allestito colture cellulari di cellule mesenchimali staminali umane, ottenute sia da biopsie di tessuto adiposo bianco sia da (agoaspirati) biopsie di midollo osseo, rispettivamente in numero di dieci e cinque, prelevate da pazienti sani.

Queste colture sono state amplificate *in vitro*, fino ad ottenere dieci linee di hADSCs e 5 di hBMMSCs, individuate rispettivamente con le sigle PA1, PA9, PA19, PA20, PA26, PA29, PA31, PA34, PA37, PA42 e MO1, MO3, MO5, MO6 e MO7. Dopo averne verificato la multipotenza, queste linee sono state differenziate in senso osteoblastico, utilizzando un apposito terreno di induzione. Ho valutato la capacità differenziativa con metodi citochimici qualitativi, per evidenziare diversi aspetti della differenziazione, quali la produzione di fosfatasi alcalina (ALP) e di depositi di idrossiapatite (HA). Le osservazioni in microscopia a campo chiaro, a contrasto di fase e in microscopia confocale a scansione laser hanno mostrato un comportamento

analogo per tutte le linee cellulari studiate, presentando una elevata capacità differenziativa, dopo coltivazione in OM, con l'incremento del numero di cellule ALP positive (+) e l'aumento crescente nel tempo dei depositi di HA. Successivamente, la potenzialità proliferativa in risposta alle diverse concentrazioni di Sr^{2+} delle linee cellulari studiate è stata valutata con curve di crescita delle hADSCs e delle hBMMSCs indifferenziate mediante la conta diretta delle cellule in coltura nel campo microscopico. Questa tipologia di conta è apparsa più semplice rispetto alla conta fatta con le camere contaglobuli e ha dato risultati di ottima precisione e ripetibilità, con la possibilità, inoltre, di poter effettuare conteggi anche in presenza di un alto numero di cellule, grazie all'acquisizione delle immagini del campo microscopico da parte di una telecamera, permettendo un'elaborazione successiva. Questa metodica è, quindi, consigliabile per lo studio della proliferazione cellulare mediante curve di crescita. In questo lavoro l'intervallo di concentrazioni di Sr^{2+} utilizzato, per valutare l'effetto sulla proliferazione cellulare, va da una concentrazione massima di 50 $\mu\text{g/ml}$, ad una concentrazione minima di 1 $\mu\text{g/ml}$.

La scelta di questo range di concentrazioni è stata fatta sapendo che la concentrazione di Sr^{2+} presente nel siero di pazienti trattati con 2g/die di SR risulta essere, in media, pari a 100 μM circa 25 $\mu\text{g/ml}$ (97,98).

Le valutazioni sulla proliferazione delle dieci linee cellulari di PA e delle tre linee cellulari di MO studiate, in presenza delle diverse concentrazioni di Sr^{2+} , hanno mostrato come questo ione favorisca l'attività proliferativa delle cellule mesenchimali staminali ottenute sia da tessuto adiposo sia da midollo osseo e in particolare alle concentrazioni più alte saggiate. In base ai risultati precedentemente descritti, le concentrazioni di Sr^{2+} che stimolano significativamente la crescita cellulare, rispetto al controllo coltivato in GM, sono quelle pari al 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$. I risultati ottenuti riguardo all'analisi quantitativa dell'attività della fosfatasi alcalina mostrano che le

concentrazioni di Sr^{2+} 25 - 50 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stimolano significativamente la maggior parte delle linee cellulari testate per la produzione di ALP, che aumenta nel tempo ed è fondamentale per la successiva formazione dei cristalli di idrossiapatite e quindi per il processo di mineralizzazione del tessuto osseo. L'analisi quantitativa della produzione di idrossiapatite ha mostrato, invece, che dopo i 21 giorni di trattamento i depositi minerali cominciano ad aumentare significativamente nella maggior parte delle linee cellulari testate alle concentrazioni di Sr^{2+} più basse (0,5-1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), rispetto al controllo coltivato in OM. Il fatto, che le concentrazioni maggiormente attive di Sr^{2+} sulla produzione di ALP e sulla formazione di depositi di HA risultino diverse tra loro, conferma come il processo di differenziazione sia lungo, complesso e che probabilmente interessi più vie metaboliche.

In conclusione questo mio lavoro di ricerca ha confermato che il tessuto adiposo presenta un'abbondante riserva di cellule staminali e che le cellule hADSCs risultano un buon modello cellulare, come anche le cellule hBMMSCs, per studi *in vitro* sui meccanismi d'azione di farmaci attivi sul metabolismo osseo.

Tra questi, lo SR risulta essere un agente anti-osteopotico di ultima generazione, la cui efficacia è stata dimostrata in diversi studi clinici (92) e su modelli animali *in vivo* e *in vitro* (78,79,84,99). Numerosi, infatti, sono i dati presenti in letteratura che dimostrano come lo SR sia l'unico farmaco ad avere un duplice effetto sul rimodellamento osseo (76,81).

In particolare, questo lavoro di ricerca ha valutato gli effetti dello ione Sr^{2+} , principio attivo del farmaco Stronzio Ranelato, sulla proliferazione e differenziazione osteogenica sui due modelli cellulari sopra citati, dimostrando che lo ione Sr^{2+} è in grado di stimolare non solo la crescita cellulare, ma anche la differenziazione osteogenica delle cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo e da midollo osseo.

Tuttavia, ulteriori sperimentazioni saranno necessarie per poter valutare:

- effetto della potenzialità differenziativa dello Sr^{+2} in assenza di altri fattori di induzione osteogenica,
- effetti sulla differenziazione osteogenica *in vitro* da parte di altri farmaci attivi nel metabolismo osseo,
- effetti sulla proliferazione e sulla differenziazione da parte di biomateriali caricati con farmaci attivi sul metabolismo osseo e capaci di rilasciarli in modo selettivo, questo anche alla luce del fatto che le concentrazioni maggiormente attive su proliferazione, produzione di ALP e formazione di depositi di HA sono diverse tra loro,
- valutazione dell'espressione genica dei principali geni coinvolti nel pathway del metabolismo osseo, in particolare nel differenziamento osteogenico quali *ALP*, *OPG*, *RANK-L* sia in condizioni fisiologiche sia dopo trattamento con lo Sr^{2+} .

Inoltre, risulta impossibile utilizzare le hMSCs come modello cellulare *in vitro*, principalmente per lo studio della proliferazione di cellule in corso di differenziazione, in quanto in presenza di una popolazione eterogenea rappresentata da cellule a diversi stadi differenziativi e conseguentemente con un'ipotetica capacità proliferativa differente. Pertanto, ulteriori modelli cellulari saranno necessari per integrare i risultati fin qui ottenuti sugli effetti dello ione Sr^{2+} , o di altri farmaci attivi, sulla proliferazione cellulare e sull'osteoiduzione.

A tale proposito sarà necessario arricchire i risultati ottenuti sulla linea cellulare di controllo SaOS-2, utilizzando altri modelli cellulari, quali la linea finita umana normale osteoblastica NHOst e la linea continua murina osteocyte-like MLOY4.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Morrison S.J., Shah N. M., Anderson D.J., Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997; 88(3):287-98.
- 2) Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature*. 2001; 414(6859):88-91.
- 3) Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med*. 2001;7(4):393-5.
- 4) Waldmann H. Therapeutic approaches for transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(5):606-10.
- 5) Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 1988; 336(6200):688-90.
- 6) Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19:193-204.
- 7) Thomson EM. Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. *Reprod Nutr Dev* 1996; 36:619-635.
- 8) Jackson L., Jones DR, Scotting P., Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53:121-126.
- 9) Becker AJ., McCullough EA., Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-4.
- 10) Till JE., McCullough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961; 14:213-22.
- 11) Owen M. Marrow derived stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 1988; 10:63-76.
- 12) McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997; 276(5309):66-71.
- 13) Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114(6):763-76.
- 14) Fuchs E., Tumber T., Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004; 116(6):769-78.
- 15) Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P, Leri A. (2006). Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(24):9226-31.

- 16) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
- 17) Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol*. 1974; 2(2):83-92.
- 18) Ippokratis P, Peter V. Biology of mesenchymal stem cells. *Int J Care Injured* 2005; 36S: S8-S12.
- 19) Kim S, Honmou O, Kato K, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res*. 2006; 1123(1):27-33
- 20) Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40(6): 1275-1284.
- 21) 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: 1528-1530.
- 22) 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 regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701–705.
- 23) In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102(4):1548-9.
- 24) In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal. *Stem Cells* 2004; 22:1338-1345.
- 25) Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, Scarpa A, Dazzi F, Pizzolo G, Vinante F. HB-EGF/HER-1 signalling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood* 2005; 106: 59-66.
- 26) Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 5:393-5.
- 27) Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190(1): 239-45.
- 28) Gearhart et al. "Essentials of stem cells biology" ed. *Elsevier academic press* 2006

- 29) Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005; 54(3):132-41.
- 30) Tognarini I, Sorace S, Zonefrati R, Galli G, Gozzini A, Carbonell Sala S, Thyron GD, Carossino AM, Tanini A, Mavilia C, Azzari C, Sbaiz F, Facchini A, Capanna R, Brandi ML. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti6Al4V surfaces. *Biomaterials.* 2008; 29(7):809-24.
- 31) Luzi E, Marini F, Sala SC, Tognarini I, Galli G, Brandi ML. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(2):287-95.
- 32) Barry F., Boyton R., Murphy M., Haynesworth S., Zaia J., (2001): The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from 83 human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(2):519-24.
- 33) Bruder S.P., Horowitz M.C., Mosca J.D., Haynesworth S.E., Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997; 21, 225-235.
- 34) Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A., Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13, 69-80.
- 35) Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J., Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation, capacity, immunological features, potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25, 2739-2749.
- 36) Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003; 10(2): 228-241.
- 37) Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring HJ. Heterogeneity among human bone marrow derived mesenchymal stem cells and neural progenitors. *Haematologica* 2003; 88(2):126-132
- 38) Simmons P.J. and Torok-Storb B., Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78, 55-62.
- 39) Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 153: 1133-1140.
- 40) Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001; 189(1):54-63.

- 41) Gronthos S., Simmons P.J., Graves S.E., Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 2001; 28, 174-181.
- 42) Javazon E.H., Beggs K.J., Flake A.W., Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004; 32, 414-425.
- 43) Baddoo M., Hill K., Wilkinson R., Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 2003; 89, 1235-1249.
- 44) Russell RG, Espina B, Hulley P. Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18 Suppl 1:S3-10.
- 45) Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21(2):115-37.
- 46) Blair HC. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 1998; 20(10):837-46.
- 47) Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sci.* 1999; 65(11):1087-102..
- 48) Patricia E. Molina. Fisiopatologia Endocrina. ediz.italiana P.Beck-Peccoz 2004
- 49) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-9.
- 50) Zhang JD, Cousens LS, Barr PJ, Sprang SR. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(8):3446-50.
- 51) Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003; 423: 349-355.
- 52) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
- 53) Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008; 29: 155-192.
- 54) Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. The role of receptor activator of nuclear factor κ B/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4514-4521.
- 55) Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 457-475.
- 56) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E,

- Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998; 93(2):165-76.
- 57) Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000; 275(28):20959-62.
- 58) Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997; 390(6656):175-9.
- 59) Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(7):3540-5.
- 60) Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT: Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med*. 2009; 51(1):25-41.
- 61) Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2000; 344(5):385-6.
- 62) Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:199-206.
- 63) Wakitani S, Yamamoto T. Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. *Microsc Res Tech* 2002; 58:14-8.
- 64) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal-cell based repair of large, full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76(4): 579-592.
- 65) van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. 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.
- 66) Kon E, Muraglia 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. *J Biomed Mater Res*. 2000; 49(3):328-337.

- 67) Sempuku T, Ohgushi H, Okumura M, Tamai S. Osteogenic potential of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics : a histological study. *J Orthop Res* 1996; 14(6): 907-13.
- 68) Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, 84. Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998; 16 : 155-62.
- 69) Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(10): 1927-35.
- 70) Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue- engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000; 18(9): 959-963.
- 71) Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone cartilage, and lung irradiated mice. *PNAS* 1995; 92: 4857-4861.
- 72) Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Trasplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta . *Nat Med* 1999; 5(3): 309-313
- 73) Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 1999; 17(6): 900-908.
- 74) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte. *N Engl J Med* 1994; 331(14): 889-895.
- 75) Nardone V, Fabbri S, Marini F, Zonefrati R, Galli G, Carossino A, Tanini A, Brandi ML. Osteodifferentiation of human preadipocytes induced by strontium released from hydrogels. *Int J Biomater.* 2012; 2012:865291.
- 76) Marie PJ. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18 Suppl 1:S11-5
- 77) Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int.* 2005; 16:7-10.
- 78) Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(12):2012-20.
- 79) Ammann P, Badoud I, Barraud S, Dayer R, Rizzoli R. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(9):1419-25.

- 80) Marie PJ, Garba MT, Hott M, Miravet L. Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats. *Miner Electrolyte Metab.* 1985; 11(1):5-13.
- 81) Bonnelye E., Chabadl A., Saltel F., Juridic P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. *Bone* 2008; 29-138.
- 82) Marie PJ, Hott M. Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse. *Metabolism.* 1986; 35(6):547-51.
- 83) Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P, Findlay DM. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int.* 2009; 20(4):653-64.
- 84) Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblast play key roles in the mechanism of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(7):1291-1300.
- 85) Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor O, Ye C, Brown EM. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate induced osteoblast proliferation. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74(3):438-47.
- 86) Hurtel-Lemaire AS, Mentaverri R, Caudrillier A, Cournarie F, Wattel A, Kamel S, Terwilliger EF, Brown EM, Brazier M. The calcium sensing receptor is involved in strontium ranelate induced osteoclast apoptosis. *J Biol Chem.* 2009; 284(1):575-84
- 87) Hao Y, Yan H, Wang X, Zhu B, Ning C, Ge S. "Evaluation of osteoinduction and proliferation on nano-Sr-HAP: a novel orthopedic biomaterial for bone tissue regeneration". *J Nanosci Nanotechnol.* 2012; 12(1):207-12.
- 88) Ni GX, Yao ZP, Huang GT, Liu WG, Lu WW., "The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts *in vitro*". *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22(4):961-7.
- 89) Isaac J, Nohra J, Lao J, Jallot E, Nedelec JM, Berdal A, Sautier JM. "Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells". *Eur Cell Mater.* 2011; 21:130-43.
- 90) Liu F, Zhang X, Yu X, Xu Y, Feng T, Ren D. "*In vitro* study in stimulating the secretion of angiogenic growth factors of strontium-doped calcium polyphosphate for bone tissue engineering". *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22(3):683-92.
- 91) Zhang W, Shen Y, Pan H, Lin K, Liu X, Darvell BW, Lu WW, Chang J, Deng L, Wang D, Huang W. "Effects of strontium in modified biomaterials". *Acta Biomater.* 2011; 7(2):800-8
- 92) Meunier PJ, Roux C, Ortolani S, Diaz-Curiel M, Compston J, Marquis P, Cormier C, Isaia G, Badurski J, Wark JD, Collette J, Reginster JY. Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2009; 20(10):1663-73.

- 93) Roschger P, Manjubala I, Zoeger N, Meirer F, Simon R, Li C, Fratzi-Zelman N, Misof BM, Paschalis EP, Strelci C, Fratzi P, Klaushofer K. Bone material quality in transiliac bone biopsies of postmenopausal osteoporotic women after 3 years of strontium ranelate treatment. *J Bone Miner Res* 2010; 25(4):891-900
- 94) Farlay D, Khebbab MT, Jaurand X, Delmas PD, Meunier PJ. In osteoporotic women treated with strontium ranelate, strontium is located in bone formed during treatment with a maintained degree of mineralization. *Osteoporos Int* 2009 ; 21(4):667-77
- 95) Schäffler A, Büchler C. Adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25(4):818-27.
- 96) Casteilla L, Planat-Bénard V, Cousin B, Silvestre JS, Laharrague P, Charrière G, Carrière A, Pénicaud L. Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005; 98(9):922-926.
- 97) Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004, 350(5):459-68.
- 98) Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int* 2001, 69:121-129.
- 99) Nardone V, D'Asta F, Brandi ML. Pharmacological control of osteogenesis. *Clinics (in press)*.

RINGRAZIAMENTI

A mamma e papà sempre vicini in ogni traguardo della mia vita.