

**Società Italiana
di Parodontologia
e Implantologia**

Effetto di sistemi di cultura dinamica tridimensionale sul potenziale osteogenico di cellule staminali mesenchimali derivanti dal legamento parodontale incluse in microsfere di alginato

**Renata Vecchiatini^{1(*)}, Letizia Penolazzi²,
Elisabetta Lambertini², Marco Angelozzi², Claudia Morganti²,
Stefania Mazzitelli⁴, Leonardo Trombelli³, Claudio Nastruzzi⁴,
Roberta Piva²**

¹Dip. Scienze Biomediche chirurgico-specialistiche, Sezione di Odontoiatria, Università degli Studi di Ferrara

²Dip. Scienze Biomediche chirurgico-specialistiche, Sezione di Biologia Molecolare, Università degli Studi di Ferrara

³Centro di Ricerca per lo Studio delle Malattie Parodontali e Peri-implantari, Università degli Studi di Ferrara

⁴Dip. Scienze della vita e Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara

SIPI - Atti della Sessione di ricerca Premio H.M. Goldman - Rimini, 14 marzo 2014

RIASSUNTO

Numerose evidenze basate sull'impiego di diversi modelli sperimentali attribuiscono un ruolo chiave alle cellule staminali del legamento parodontale (hPDLSCs) nel promuovere i meccanismi cellulari di rigenerazione parodontale. Queste cellule rappresentano un'ottima opportunità per la cosiddetta "cell-based therapy" finalizzata al riparo del tessuto danneggiato e alla realizzazione di una *restitutio ad integrum*. Il successo di un tale approccio si basa sulla produzione in vitro di hPDLSCs con alto potenziale rigenerativo attraverso tecniche che migliorino le condizioni di coltura pre-impianto. In questo ambito siamo interessati a studiare l'efficacia dell'incapsulamento delle cellule in specifiche "microbeads" combinato con la coltivazione in un sistema tridimensionale dinamico realizzato attraverso un bioreattore. La tecnologia dell'incapsulamento garantisce un'efficiente e funzionale integrazione delle cellule nel contesto tissutale in vivo, mentre l'uso del bioreattore crea condizioni che mimano da vicino il microambiente fisiologico e proteggono dal fenomeno della necrosi. In questo studio è stato studiato il potenziale osteogenico delle hPDLSCs incluse in microsfere di alginato prodotte con un sistema innovativo poste nel bioreattore Synthecon-RCCS con tecnologia HARV. Attraverso l'analisi dell'espressione di marcatori osteogenici e la valutazione della matrice mineralizzata prodotta abbiamo dimostrato l'efficacia delle condizioni di coltura adottate nell'anticipare e sostenere efficacemente il differenziamento osteogenico senza intaccare la vitalità cellulare.

INTRODUZIONE

La medicina rigenerativa del parodonto, il quale rappresenta l'apparato di sostegno dei denti, nasce dall'esigenza di garantire una guarigione completa di tale tessuto in seguito a danni dovuti a malattie infiammatorie o eventi traumatici che possono portare a gravi lesioni del tessuto stesso. Il parodonto è un tessuto complesso costituito da strutture differenti, quali l'osso alveolare, il cemento e il legamento parodontale (PDL). Considerando il fatto che quest'ultimo presenta un abbondante contenuto di cellule staminali multipotenti (hPDLSCs), il PDL può essere ritenuto un importante fonte cellulare per le terapie rigenerative del parodonto.

Uno dei principali obiettivi delle strategie di medicina rigenerativa è quello di combinare l'alto potenziale rigenerativo di tali cellule con molecole bioattive e costrutti biocompatibili che possano favorire e supportare la riparazione del tessuto.

L'isolamento e l'espansione *in vitro* delle hPDLSCs sono stati già proposti con successo da diversi autori, garantendo il ruolo di queste cellule come potenziale "strumento" delle nuove terapie basate sulla rigenerazione tissutale. Nonostante queste importanti indicazioni, mancano ancora conoscenze relative al comportamento di tali cellule durante il differenziamento osteogenico, che impediscono l'allestimento delle condizioni di coltura ottimali delle hPDLSCs nel periodo *in vitro* pre-impianto.

Lo scopo di questo studio è stato quindi focalizzato sulla caratterizzazione di cellule staminali isolate dal legamento parodontale hPDLSCs, mettendole a confronto con altre cellule con capacità osteogenica quali le cellule mesenchimali derivate dalla Wharton's Jelly del cordone ombelicale (hWJMSCs).

In seguito l'attenzione si è spostata sulla messa a punto di un sistema che permettesse di sfruttare a pieno il potenziale osteogenico delle hPDLSCs. A tale fine sono stati prodotti scaffolds di alginato in forma microcapsulare capaci di immunoisolare le cellule contenute al loro interno. Inoltre, essendo il bioreattore in grado di potenziare l'espansione e il differenziamento *in vitro* delle cellule, questi costrutti contenenti le hPDLSCs sono stati messi in coltura in condizioni di microgravità e di flusso dinamico all'interno del bioreattore Rotary Cell Culture System™. Confrontando l'approccio qui impiegato con i sistemi di coltura 2D e 3D statici, è stato quindi possibile dimostrare che l'utilizzo di una strategia di coltura dinamica in combinazione con un ambiente tridimensionale è in grado di promuovere ed anticipare il differenziamento osteogenico delle hPDLSCs.

Il sistema qui discusso rappresenta perciò un nuovo e possibile approccio per la creazione di costrutti 3D in grado di supportare la rigenerazione ossea nei difetti periodontali.

MATERIALI E METODI

Isolamento delle hPDLSCs e delle hWJMSCs

Le cellule staminali mesenchimali da legamento parodontale (hPDLSCs) e da Wharton's Jelly del cordone ombelicale (hWJMSCs) sono state isolate e coltivate secondo protocolli precedentemente pubblicati.

I PDL sono stati espianati da terzi molari inferiori in inclusione ossea totale di pazienti adulti non affetti da malattia parodontale, attraverso accurata dissezione solo dei $\frac{2}{3}$ inferiori del legamento parodontale, lavati con soluzione salina e processati entro 4 ore dall'avulsione dell'elemento dentario stesso. I PDL sono stati frammentati in porzioni di 0,2 cm² e posizionati in piastre per coltura cellulare con terreno DMEM Low Glucose (Dulbecco's modified eagle medium Euroclone S.p.A., Milan, Italy) contenente siero bovino fetale (FBS) al 10% (v/v), penicillina (100 mg/mL) e streptomina (10 mg/mL).

I cordoni ombelicali sono stati processati entro 12 ore dal parto. I cordoni sono stati lavati con soluzione salina, tagliati in pezzi lunghi 2-4 cm. I singoli pezzi sono stati sezionati in lunghezza per esporre la Wharton's Jelly e i vasi sono stati rimossi. La Wharton's Jelly è stata sminuzzata in pezzetti di 2-3 mm², i quali sono stati posti in una fiasca T25 per l'espansione cellulare in terreno DMEM Low Glucose (Dulbecco's modified eagle medium Euroclone S.p.A., Milan, Italy) contenente FBS al 10% (v/v), penicillina (100 mg/mL) e streptomina (10 mg/mL).

Dopo 5-7 giorni il terreno di coltura è stato rimosso e poi cambiato due volte a settimana finché le hPDLSCs o le hWJMSCs non hanno raggiunto il 70-80% di confluenza. A questo punto le cellule sono state staccate con una soluzione di tripsina/EDTA 0.05%, contate ed utilizzate per l'allestimento delle diverse condizioni di coltura.

Analisi citofluorimetrica

Le cellule sono state analizzate per l'espressione di molecole di superficie tramite immunofluorescenza diretta. Brevemente il pellet cellulare è stato risospeso in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) e incubato con anticorpi di topo coniugati con fluoresceina isotiocianato (FITC) o ficoeritrina (PE) anti-anticorpi umani CD45-PE, CD34-FITC, CD90-FITC, and CD105-PE (DakoCytomation; Dako, Denmark) per 15 minuti a 4 °C. Anticorpi monoclonali non specifici sono stati utilizzati come controllo negativo. Dopo l'incubazione con anticorpi le cellule sono state lavate e risospese in 400 µl di PBS. La fluorescenza di 200000 cellule è stata analizzata utilizzando il FACS Scan flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Valutazione della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata tramite doppia colorazione con calceina-AM/propidio ioduro (Live/Dead Cell Double Staining Kit, Sigma Aldrich). Le cellule sono state analizzate al microscopio a fluorescenza (Nikon, Optiphot-2; Nikon Corporation, Tokyo, Japan): le cellule vitali presentano fluorescenza verde e quelle morte emettono fluorescenza rossa.

Differenziamento delle cellule staminali mesenchimali

Per tutti gli esperimenti di differenziamento le hPDLSCs o le hWJMSCs sono state utilizzate fino al terzo passaggio di coltura.

Per il differenziamento osteogenico le cellule sono state coltivate in 3 condizioni (adesione, coltura 3D statica e 3D dinamica) per 21 giorni in terreno osteogenico composto da DMEM High Glucose (Euroclone S.p.A., Milan, Italy) al 10% di FBS, contenente β-glicerofosfato 10 mM, dexametasone 10^{-7} M e acido ascorbico 100 µM (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). Il terreno è stato rinnovato ogni 3 giorni. La deposizione di matrice ossea mineralizzata è stata valutata tramite colorazione con Alizarin Red S. Brevemente le cellule in adesione o all'interno delle microcapsule sono state fissate e colorate con una soluzione di Alizarin Red S (pH 4.2) per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi lavati tre volte in PBS per ridurre la colorazione aspecifica e successivamente analizzati al microscopio ottico (Nikon, Optiphot-2; Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

La composizione della matrice extracellulare è stata poi valutata tramite spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR). Le cellule sono state raccolte in acqua ammoniacata (ammonio bicarbonato 50 mM, pH 8.0), liofilizzate ed analizzate tramite FT-IR Spectrometer Perkin Elmer, Spectrum 100 (Perkin Elmer, MA). Gli spettri d'assorbimento da 4000 a 600 cm^{-1} sono stati considerati.

Per l'analisi quantitativa real-time della reazione a catena della polimerasi (qRT-PCR), le cellule in adesione o recuperate dalle microcapsule sono state raccolte per l'estrazione dell'RNA totale tramite RNeasy Mini Kit (Qiagen GMBH, Hilden, Germany). 2 µg di RNA sono stati revertiti mediante Improm-II RT System (Promega). Per la quantificazione del Runx2 e del Col1A1 sono state utilizzate le sonde TaqMan appropriate (Applied Biosystem), usando il GAPDH come gene di riferimento per la normalizzazione. Tutte le reazioni sono state effettuate in triplicato e gli esperimenti ripetuti almeno 3 volte.

Per il differenziamento condrogenico le hPDLSCs e hWJMSCs sono state coltivate in pellet in terreno condrogenico (DMEM High Glucose contenente ITS+Premix: insulina 6.25 µg/ml, transferina 6.25 µg/ml, linoleico acido 5.33 µg/ml, BSA 1.25 mg/ml, dexametasone 10^{-7} , ascorbato-2 fosfato 50 µg/ml, sodio piruvato 1mM e pen-streptomina 100 µg/ml) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) in presenza di TGFβ3 (10ng/ml) (Mylteny, Bergisch, Gladbach, Germany). Il terreno è stato rinnovato due volte a settimana per 21 giorni.. Per valutare il differenziamento condrogenico sezioni di 5 µm di pellet inclusi in paraffina sono stati colorati con una soluzione all'1% di Alcian Blue (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). Il differenziamento adipogenico è stato effet-

tuato su cellule coltivate in piastre 24 wells ad una densità di 1×10^5 cellule per cm^2 . Le cellule sono state mantenute in DMEM High Glucose (Euroclone S.p.A., Milan, Italy) al 10% di FBS, dexametasone 10^{-6} M, insulina $5 \mu\text{g/ml}$, IBMX $0.5 \mu\text{M}$ and indometacina $60 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). Il terreno è stato rinnovato due volte a settimana per 21 giorni. Il differenziamento adipogenico è stato valutato tramite colorazione con una soluzione di Oil Red O 0.3% (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO).

Incapsulazione in alginato

Le microcapsule di alginato contenenti le hPDLSCs o le hWJMSCs sono state prodotte tramite un "airdriven droplet generator" per l'incapsulazione cellulare. Brevemente le cellule sono state risospese in una soluzione di alginato all'1.5% ad una concentrazione di 2×10^6 cellule per ml. La sospensione cellulare viene continuamente aspirata da una pompa siringa ed estrusa attraverso lo "airdriven droplet generator". Le microgocce di alginato generate sono fatte polimerizzare in una soluzione di cloruro di bario all'1.2%, ottenendo delle microcapsule di alginato di bario. Le microcapsule sono state lavate 3 volte in PBS e coltivate in DMEM Low Glucose (Dulbecco's modified eagle medium Euroclone S.p.A., Milan, Italy) contenente FBS al 10% (v/v), penicillina (100 mg/ml) e streptomina (10 mg/ml). La morfologia delle microcapsule di alginato è stata valutata tramite microscopio ottico e stereomicroscopio (Nikon microscopes, Tokyo, Japan).

Coltura in bioreattore

Gli esperimenti di coltura dinamica sono stati condotti in Rotary Cell Culture System™ (RCCS-4™ bioreactor, Synthecon™, Inc., Houston, TX, U.S.A.), con High Aspect Ratio Vessel (HARV™). Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati contenitori HARV™ da 10 ml, in cui sono state poste 50-60 microcapsule in presenza di terreno basale o osteogenico rinnovato 2 volte a settimana fino a 21 giorni. Per tutti gli esperimenti è stata utilizzata una velocità di rotazione di 20 rpm.

Analisi statistica

Tutti i dati sono presentati come media con deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata tramite test t di Student considerando p-value < 0.05 come significativi.

RISULTATI

Il disegno sperimentale riassunto in Fig. 1 ha permesso di confrontare il comportamento delle hPDLSCs e delle hWJMSCs nelle diverse condizioni sperimentali. Come mostrato nella Fig. 1A, le cellule in adesione con morfologia allungata fibroblasti-simile sono state immunofenotipizzate ed espanse per 3 passaggi prima di essere incapsulate in alginato, messe nel bioreattore Rotary Cell Culture System™ e mantenute in coltura per 21 giorni in terreno basale o osteogenico. Le cellule nelle diverse condizioni di coltura sono state sottoposte alle analisi di vitalità e differenziamento a diversi tempi durante la procedura sperimentale.

Per l'allestimento delle colture di hPDLSCs sono stati reclutati 10 partecipanti (5 uomini e 5 donne di età compresa tra i 19 e i 33 anni). 3 dei campioni sono stati poi scelti sulla base della loro capacità di crescita, di formare colonie e di espansione e caratterizzati tramite analisi citofluorimetrica, risultando negativi per l'espressione di markers ematopoietici/endoteliali (CD34 e CD45), ma altamente positivi ai marcatori di mesenchimalità (CD90 e CD105), con risultati paragonabili alle hWJMSCs (Fig. 2A). Inoltre il potenziale osteogenico, condrogenico ed adipogenico di tali cellule è stato dimostrato rispettivamente tramite colorazione con Alizarin Red S, Alcian Blue ed Oil Red O, come mostrato nelle immagini in Fig. 2A.

La capacità di differenziare verso la linea osteogenica è stata studiata più approfonditamente andando a valutare l'espressione di due marcatori osteoblastici quali Runx2 e Col1A1 e monitorando la deposizione di matrice mineralizzata durante i 21 giorni in terreno condizionato. Come mostrato in Fig. 2B, le hPDLSCs e le hWJMSCs hanno capacità simili relativamente alla produzione di

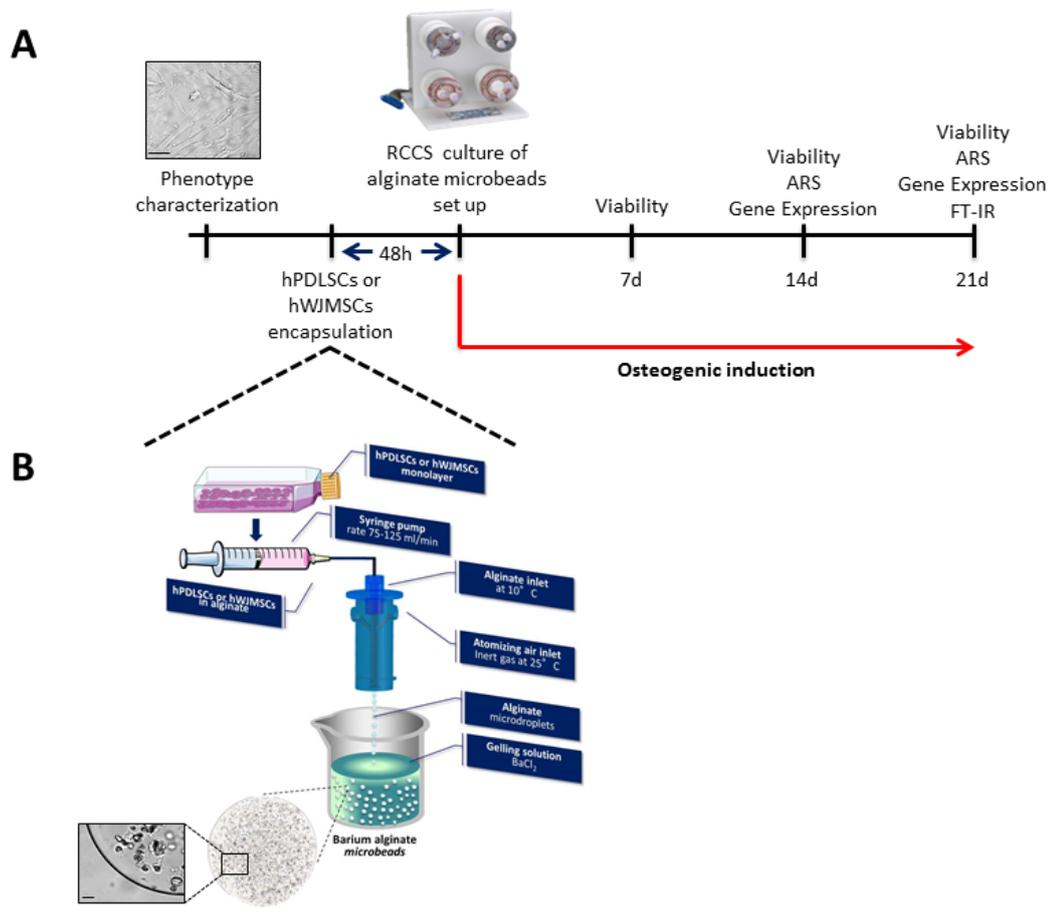


Fig. 1 Vecchiatini R et al

Figura 1.

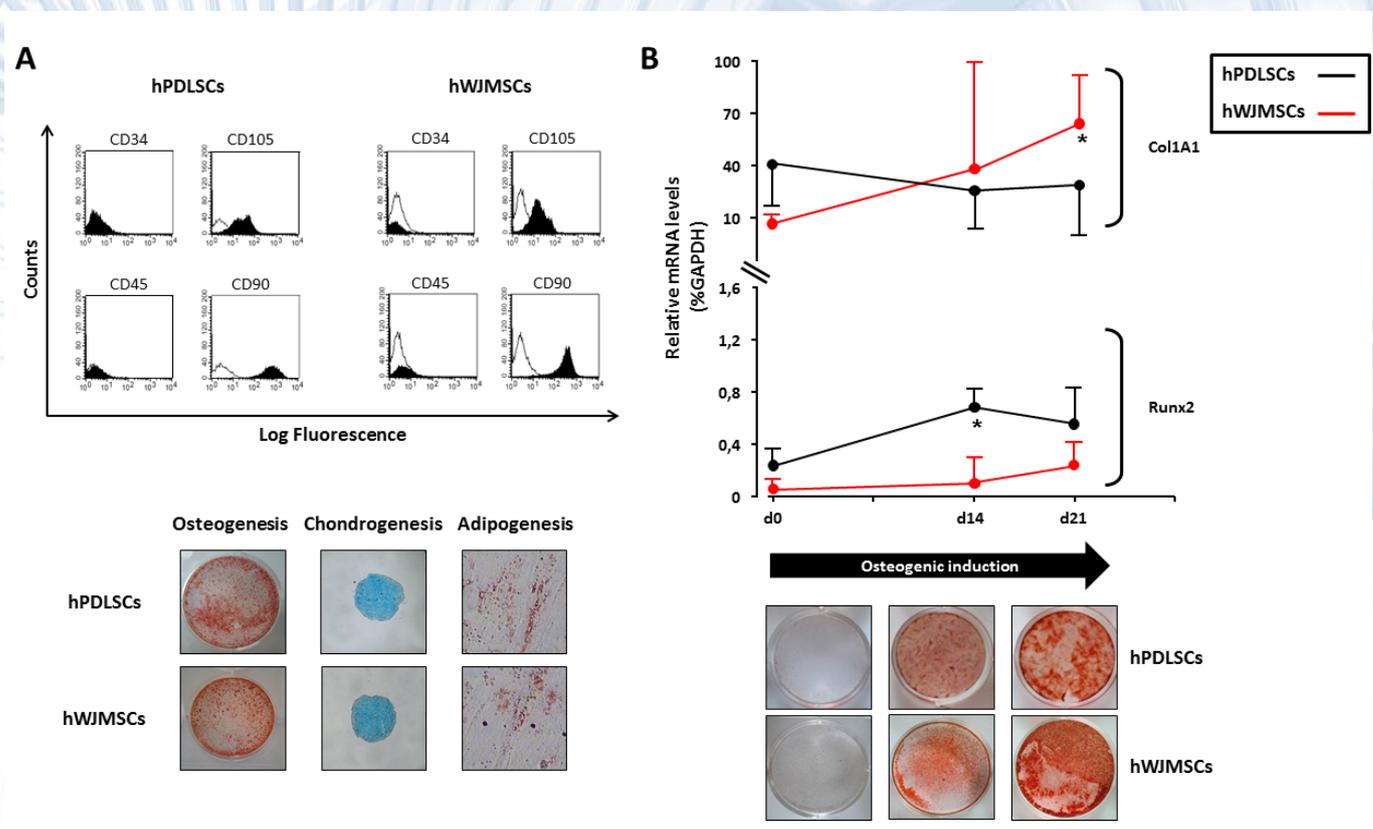


Fig. 2 Vecchiatini R et al

Figura 2.

matrice ossea pur presentando un profilo di espressione genica diverso: i livelli basali e i picchi di espressione di Runx2 e Col1A1 risultano infatti differenti tra le due linee cellulari.

Dopo aver caratterizzato e dimostrato le capacità differenziali delle cellule isolate, queste sono state messe in coltura 3D statica o dinamica per 21 giorni. L'analisi al microscopio ottico (Fig. 3) dimostra che le microcapsule contenenti le cellule rimangono stabili durante tutto il periodo sperimentale, senza segni di rigonfiamento o rottura anche in seguito a coltura in rotazione nel bioreattore. L'unico cambiamento visibile è la progressiva diminuzione della trasparenza delle microcapsule mantenute in terreno osteogenico, in particolare di quelle contenenti le hPDLSCs: questo fenomeno può essere riconducibile all'interazione di prodotti di secrezione cellulare, in particolare componenti della matrice extracellulare, con l'alginato stesso, causando la riduzione del passaggio di luce.

Oltre a valutare l'integrità delle microcapsule, la vitalità cellulare è stata analizzata a differenti tempi di coltura: la fluorescenza verde riportata nelle immagini in Fig. 3 dimostra che le cellule rimangono vitali in tutte le condizioni sperimentali, indicando che il processo di incapsulazione non compromette l'attività cellulare, neanche in combinazione con il sistema di coltura dinamico. Infine è stata valutata l'effetto della coltura 3D statica e dinamica sulla produzione di matrice mineralizzata da parte delle hPDLSCs e delle hWJMSCs. Le immagini in seguito a colorazione con

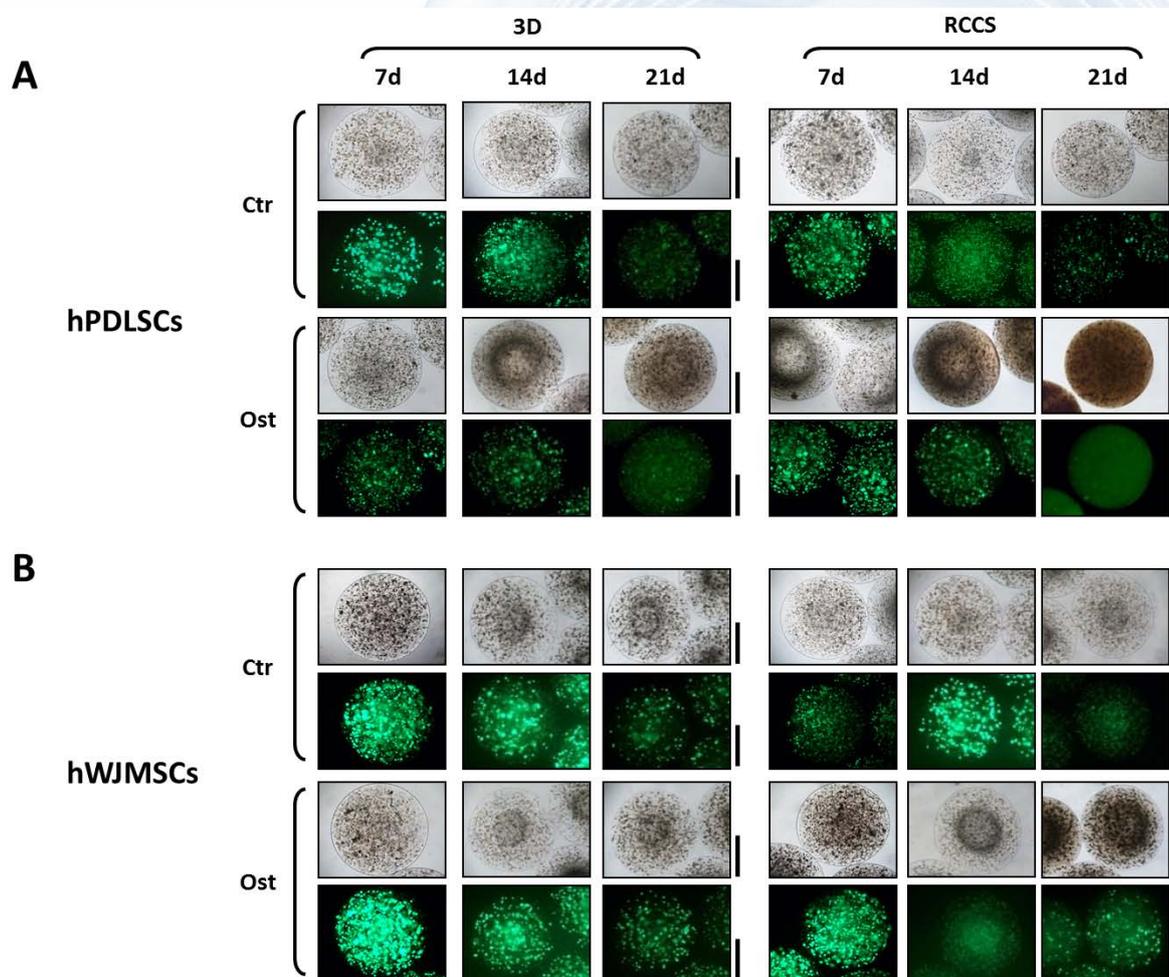


Fig. 3 Vecchiatini R et al

Figura 3.

Alizarin Red S (Fig. 4A) e le analisi FT-IR (Fig. 4B) dimostrano che la produzione di matrice ossea non è rilevabile in assenza di induttori osteogenici, mentre in presenza di terreno osteogenico le hPDLSCs e le hWJMSCs si comportano in maniera leggermente differente, anche se entrambe le linee raggiungono le fasi finali del differenziamento. Infatti le hPDLSCs all'interno delle microcapsule di alginato mostrano una produzione di matrice mineralizzata fortemente maggiore rispetto alle WJMSCs. Questo dato viene confermato se gli scaffolds vengono sottoposti a coltura dinamica nel bioreattore, dove c'è una netta anticipazione di deposito di matrice già dopo 14 giorni in terreno osteogenico, dimostrato da un'intensa colorazione in seguito ad Alizarin Red S. Inoltre in Fig. 4C è apprezzabile il fatto che la coltura nel bioreattore Rotary Cell Culture System™ mantenga le cellule maggiormente responsive agli induttori osteogenici modulando positivamente l'espressione di Runx2 e Col1A1.

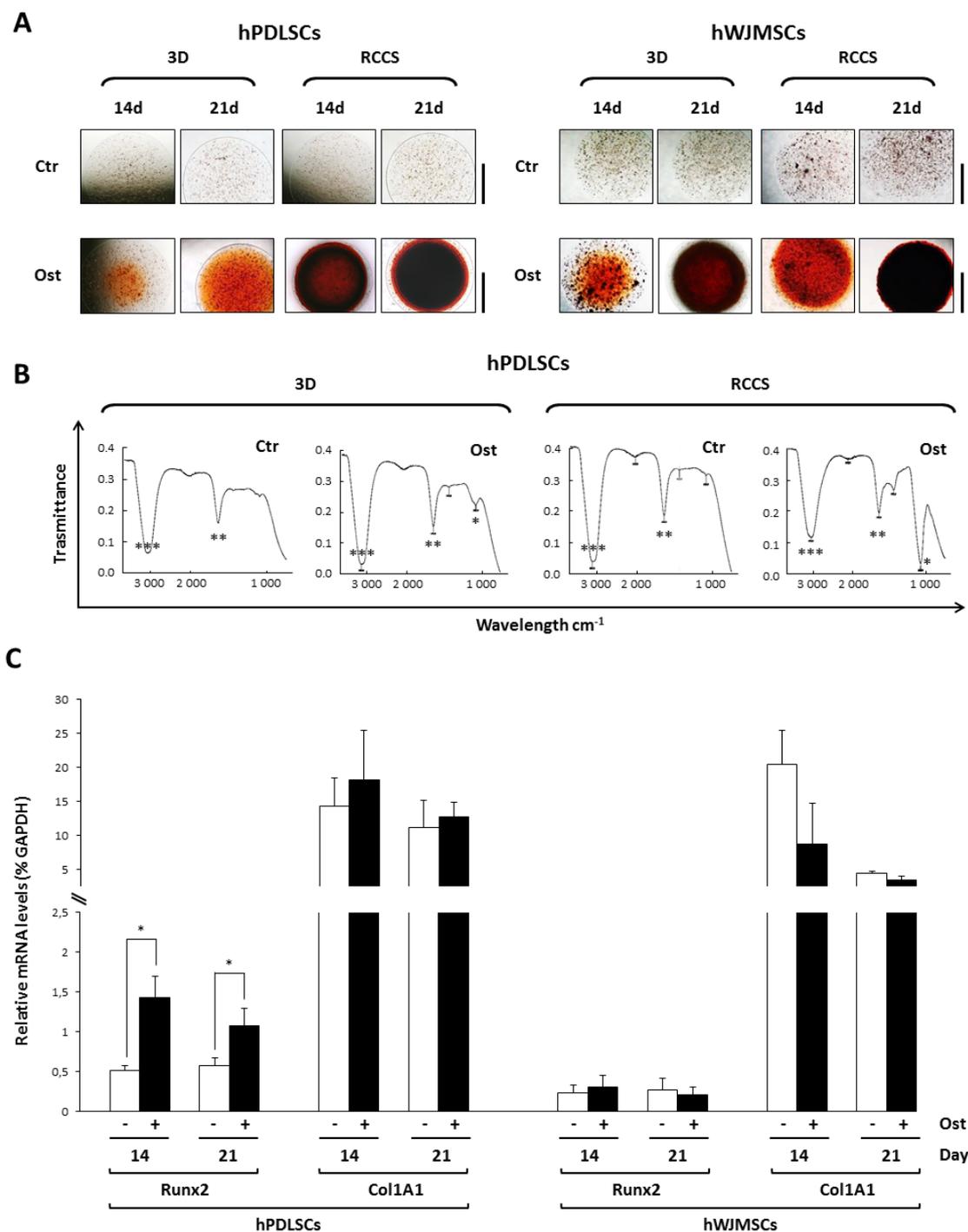


Fig. 4 Vecchiatini R et al

Figura 4.

CONCLUSIONI

In questo studio è stata dimostrata l'efficacia di un nuovo sistema di coltura *in vitro* basato sulla combinazione di hPDLSCs, scaffolds di alginato e una strategia di coltura dinamica nel bioreattore Rotary Cell Culture System™ per la produzione di matrice ossea. L'aumento e l'anticipazione nei tempi di deposizione di matrice mineralizzata supporta l'idea che questo tipo di approccio sia in grado di ottimizzare le potenzialità di cellule con capacità rigenerativa quali le hPDLSCs. Questo sistema si propone dunque come una soluzione alla necessità di colmare il gap presente tra la coltura 2D e l'applicazione in vivo, garantendo una strategia basata su un ambiente 3D in grado di riprodurre la complessa struttura dei tessuti nativi.

In particolare il bioreattore Rotary Cell Culture System™ si è dimostrato in grado di incrementare gli scambi tra le cellule contenute nei costrutti impiantabili e l'ambiente esterno, migliorando le capacità osteogeniche delle hPDLSCs e prevenendo la formazione di centri necrotici. Infine è importante sottolineare che l'utilizzo di tecniche di incapsulazione cellulare, come quella qui riportata, possa essere di grande aiuto nelle terapie basate sul trapianto cellulare, supportando l'integrazione delle cellule con capacità rigenerativa nel tessuto danneggiato, in particolare permettendo loro di "eludere" l'attività del sistema immunitario che potrebbe portare ad un fallimento nella rigenerazione del tessuto stesso.

BIBLIOGRAFIA

1. Jung H, Kim JC, Jung IH et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (hPDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 721-731.
2. Mrozik K, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. A method to isolate, purify, and characterize human periodontal ligament stem cells. *Methods Mol Biol* 2010;666: 269-284.
3. Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis* 2006; 12: 358-363.
4. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold, PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J* 2014;59: 1-14.
5. Li S, Ma Z, Niu Z et al. NASA-approved rotary bioreactor enhances proliferation and osteogenesis of human periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev* 2009;18: 1273-1282.
6. Yeatts AB, Choquette DT, Fisher JP. Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:2470-80.
7. Iwata T, Yamato M, Zhang Z, et al. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol* 2010;37:1088-1099.
8. Capretto L, Mazzitelli S, Colombo G, Piva R, Penolazzi L, Vecchiatini R et al. Production of polymeric micelles by microfluidic technology for combined drug delivery: application to osteogenic differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells (hPDLSCs). *Int J Pharm* 2013;440:195-206.
9. Penolazzi L, Tavanti E, Vecchiatini R, Lambertini E, Vesce F, Gambari R et al. Encapsulation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in alginate microbeads. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;161: 141-55.
10. Mazzitelli S, Luca G, Mancuso F et al. Production and characterization of engineered alginate-based microparticles containing ECM powder for cell/tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2011;7: 1050-1062.