



SIP
Società Italiana
di Parodontologia



DEPOSIZIONE DI MATRICE OSSEA UMANA IN VITRO DA CELLULE ISOLATE DALLA MEMBRANA DI SCHNEIDER

A. Graziano¹, L. Benedetti L.², G. Massei G.³, M. Aimetti¹

¹ Reparto di Parodontologia, Dental School, Università di Torino

² Sezione di Anatomia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Pavia

³ Libero Professionista, Torino

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2010

RIASSUNTO

La membrana di Schneider è la mucosa che riveste la porzione interna delle cavità sinusali mascellari. Sebbene sia nota la capacità della membrana di ripararsi spontaneamente dopo un insulto, non è nota l'eventuale capacità di rigenerare tessuto osseo. Obiettivo del nostro studio è stato l'isolamento e la caratterizzazione di progenitori mesenchimali presenti all'interno della membrana Schneideriana e la valutazione della loro capacità differenziativa in senso osteoblastico.

INTRODUZIONE

La membrana di Schneider è la mucosa che riveste la porzione interna delle cavità sinusali mascellari. La superficie libera è formata da un epitelio di tipo psuedostratificato ciliato mentre la porzione basale è costituita da un connettivo lasso molto vascolarizzato. Sebbene sia nota la capacità della membrana di ripararsi spontaneamente dopo un insulto (Caylakli et al., 2006), non è nota l'eventuale capacità di rigenerare tessuto osseo. Nel 2004 Gruber identificò alcuni progenitori stromali all'interno di mucosa porcina con attività di sintesi per la fosfatasi alcalina, enzima responsabile nel tessuto osseo della calcificazione della matrice extracellulare. Nel 2009 il gruppo di Srouji dimostrò come cellule estratte da mucosa sinusale umana, in coltura con sostanze osteoinducenti e sedimentate con materiali osteoconduttivi in grado di sostenerne lo sviluppo e il differenziamento, potevano differenziare in osteoblasti in grado di formare matrice ossea in modelli animali sperimentali. La composizione di questa matrice è regolata dall'intera-

zione di due citotipi, gli osteoblasti e gli osteoclasti, le cui proporzioni numeriche sono regolate da processi di proliferazione e inibizione reciproca. Queste due cellule, sebbene profondamente legate, provengono da progenitori differenti. Gli osteoclasti derivano dalla linea ematico monocitaria marcata dalla proteina CD14, mentre gli osteoblasti provengono da precursori mesenchimali residenti all'interno delle guaine vasali di determinati distretti come il midollo osseo e il periostio. Questi ultimi, all'inizio esprimono proteine di membrana come c-kit e CD90; attraverso l'attivazione di alcuni geni chiave, tra cui Runx2, differenziano in maniera irreversibile fino a esprimere proteine e funzioni di un osteoblasta maturo, quali l'osteocalcina (OC), la fosfatasi alcalina (ALP) l'osteopontina (OPN) e la bone sialo protein (BSP) (Valverde 2008). Obiettivo del nostro studio è stato l'isolamento e la caratterizzazione di eventuali progenitori mesenchimali presenti all'interno dello stroma della membrana Schneideriana e la valutazione della loro spontanea capacità di differenziamento in senso osteoblastico, in assenza di fattori osteoinducibili e biomateriali osteoconduttivi di supporto.

MATERIALI E METODI

Selezione dei pazienti

Sei campioni di membrana di Schneider sono stati prelevati durante altrettanti interventi di rialzo del seno mascellare in cui si era verificata la perforazione accidentale della stessa. I pazienti, appartenenti a entrambi i sessi, non presentavano controindicazioni sistemiche e locali all'intervento. Come controllo cellulare sono stati prelevati dagli stessi pazienti 6 campioni di periostio alveolare. Tutti i campioni, dopo il prelievo, sono stati lavati e mantenuti in soluzione fisiologica refrigerata (+4°C). La processazione avveniva entro le ventiquattro ore.

Processazione tessutale

I tessuti sono stati immersi in una soluzione digestiva di collagenasi 3mg/ml e dispasi 4 mg/ml per un'ora a 37°C. La soluzione è stata filtrata su un filtro da 70 micron (Falcon Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La sospensione cellulare è stata centrifugata; il pellet recuperato è stato messo in coltura in α -MEM medium supplementato con 20% FCS, 100 mM 2-P-ascorbic acid, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen, Italy) in 2 flask da 25 ml. Le flask sono state incubate a 37°C a 5% di CO₂ e il mezzo cambiato 2 volte la settimana. Le cellule sono state mantenute in coltura con lo stesso mezzo per l'intera durata dell'esperimento.

Citofluorimetria attivata dalla fluorescenza - FAC

Dopo almeno 5 passaggi le cellule sono state analizzate per la presenza dei seguenti antigeni di superficie mesenchimali: CD34, CD45, CD14, CD117, CD90, CD31 (BD Bioscience), CD44, CD105 (AbD Serotec) e CD133 (Miltenyi Biotec). Le cellule sono state staccate con PBS con lo 0,5% BSA, incubate con l'anticorpo in diluizione 1:10 nello stesso buffer per 30' al buio. Dopo due lavaggi con PBS 0,5% BSA le cellule sono state analizzate con citofluorimetria FAC (Calibur Becton&Dickinson).

Osteogenicità delle cellule di membrana e di periostio

Negli esperimenti a lungo termine, per verificare l'effettiva osteogenicità, dopo 2 settimane di coltura le cellule sono state poste in α -MEM contenente il 10% FCS, 100mM 2-P-ascorbic acid, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and b-glycerophosphate (Sigma) ad una concentrazione finale di 3,5 mM. Le colture sono state fermate a 15, 30, 38 giorni per l'analisi.

Colorazione con Alizarin Red

Le cellule sono state piastrate a 5.000 cellule/cm². Dopo 30 e 38 giorni di coltura in mezzo di mantenimento le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS. I depositi di calcio sono stati colorati con rosso di alizarina (40 mM 10min a RT e in lieve agitazione). Successivamente il colorante è stato solubilizzato in 10% Cetylpyridinium in 10mM phosphate buffer e la concentrazione di ciascun campione è stata valutata allo spettrofotometro a 562 nm come descritto da Stanford e collaboratori.

Valutazione PCR e qPCR di espressione genica

L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita coltivando le cellule in mezzo nutritivo (fbs al 20%) per 15 giorni e in mezzo standard (fbs al 10%) per altri 22 giorni. I punti di analisi sono stati a 0, 15 e 38 giorni. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule usando RNeasy Mini Kit (Qiagen) e digerito con RNase-free DNase (Qiagen) per rimuovere ogni contaminazione di DNA. La sintesi del cDNA dall'RNA totale con iScriptTM cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). L'amplificazione della PCR amplification è stata effettuata in 25 μ l che contengono 2 μ l di cDNA, 2 mM di MgCl₂, 0,2 mM di dNTP's, 0,025U/ μ l di Taq DNA polymerase (Platinum Taq Invirogen). L'amplificazione dei prodotti è stata visualizzata su gel di agarosio dopo colorazione con ethidio bromuro. Per successive analisi è stata utilizzata una RT-PCR quantitativa usando una Mini-Opticon® Real-Time PCR System e relativo software (BioRad), ogni campione è stato analizzato in triplicato in un volume totale di 20 ml di soluzione contenente 20 μ l amplification mixture containing 2x (10 μ l) Brilliant® SYBR® Green PCR Master Mix (Stratagene), 2 μ l of cDNA, 0,4 μ l of each primer, 7,2 μ l of H₂O.

RISULTATI

La membrana esprime sin dal giorno 0 trascritti per antigeni precoci di differenziamento osseo, come Runx-2. Accanto a questi troviamo trascritti di antigeni più tardivi come osteocalcina e osteopontina, oltre a marker generici di differenziamento mesenchimale quali collagene tipo I e CD90. Negativa in tutti i cloni la banda relativa a BOSP (Fig. 1). L'analisi del trascritto a 14 gg ha confermato l'espressione di OC e OP, con maggiore omogeneità e intensità rispetto al giorno 0, dato che viene confermato al giorno 38, sebbene con una lieve depressione dell'intensità di banda per OP. Negativa in tutti i cloni la banda relativa a BOSP anche ai giorni 14 e 38 (Fig. 2). L'analisi della presenza di HA effettuata mediante colorazione con Alizarin Red ha confermato la presenza di HA già al giorno 14 per tutti i 6 cloni, quantità che mediamente aumenta al giorno 38, con la sola eccezione del clone SB in cui non è stato possibile ripetere l'analisi per precoce

senescenza della coltura e conseguente apoptosi (Fig. 3). L'analisi FAC effettuata al giorno 20 ha confermato la presenza di popolazioni mesenchimali eterogenee dal punto di vista differenziativo in senso osteogenico, con presenza di una subpopolazione che esprime, sebbene in percentuali basse (3,83%), antigeni di staminalità quali c-kit. La quasi totalità delle cellule esprime CD44 e conferma la presenza dell'antigene CD90, entrambi marker mesenchimali e CD105, marker vascolare. Negativi invece i marker di staminalità CD34 e CD133. Negativi per questo tipo di cellule stromali HLA II e il CD14 e il CD45 e il CD31 (Fig. 4). Il periostio all'analisi FAC ricalca il pattern espresso dalle cellule della mucosa sinusale, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, con 3 cloni che esprimono antigeni di staminalità c-kit, sebbene in percentuale media leggermente minore (3,05%). L'analisi del trascritto al giorno 0 evidenzia per il clone GB una marcata positività sia dei marker precoci che tardivi di differenziamento osteogenico, quali Runx-2, OC e BOSP. Quest'ultima che invece risulta negativa per MB e RT. Tutti i cloni risultano negativi per OP. L'analisi del trascritto a 14 gg conferma l'analisi del giorno 0 e trova positiva la banda relativa a BOSP anche per i cloni MB e RT; l'analisi al giorno 38 conferma le positività del giorno 14 ad eccezione della banda della BOSP che scompare nel clone RT. Il dato è stato confermato da analisi Real Time PCR. La banda relativa alla OP permane negativa invece in tutti i cloni sia a 14 che 38 gg. Il contenuto di HA, già presente nei cloni al giorno 14, risulta incrementato al giorno 38 all'analisi Alizarin Red.

DISCUSSIONE

Obiettivo del lavoro è stato la valutazione delle capacità osteogeniche intrinseche alla membrana di Schneider. Sebbene sia stata dimostrata l'ossificazione all'interno della cavità sinusale del seno dopo semplice elevazione della membrana, i meccanismi cellulari e molecolari che sovrintendono a questi meccanismi non sono chiari (Palma 2006). L'identificazione di progenitori ALP positivi e di cellule che sotto stimolazione possono andare incontro a differenziamento osteogenico indirizza la ricerca verso l'identificazione di popolazioni cellulari sito specifiche in grado di dare luogo ad osteogenesi. In questo lavoro sono stati identificati progenitori estremamente indifferenziati, cellule che esprimono c-kit, il recettore per lo stem cell factor. È stata inoltre dimostrata la possibilità per questa popolazione di cellule indifferenziate di andare incontro a un self-commitment, auto programmazione in senso osteogenico, in coltura di mantenimento standard in piastra, senza induzione chimica fisica o meccanica. Ciò proverebbe che all'interno della membrana esistono dei progenitori "programmati" per strutturare la popolazione cellulare e dare origine a centri di nucleazione in cui depositare HA. L'origine di questi progenitori sembrerebbe da ricercare nelle guaine perivasali, come evidenziato dalla marcata positività al CD105, marker dell'endoglia, proteina presente in cellule di derivazione vasale. Nel nostro studio abbiamo preferito evitare l'utilizzo dell'antigene STRO-1 precedentemente utilizzato in quanto ridimensionato ultimamente il suo ruolo nell'osteogenesi propriamente detta. Il fatto che al giorno 20, quando all'interno della popolazione totale sono già ben presenti i marker di differenziamento osseo, vi sia ancora una subpopolazione, sebbene esigua, che esprime marker di staminalità, testimonia un'alta capacità rigenerativa delle cellule da membrana, superiore allo stesso periostio come risulta dalle percentuali più alte di cellule c-kit+ a 20 gg (3,83 VS 3,05). La negatività al

CD34 e al CD133 invece ci elimina la possibilità di una pluripotenzialità staminale e restringe il campo all'ambito rigenerativo mesenchimale, confermato dalla positività altissima al CD44 e al CD90. Come dimostrato queste cellule sono in grado di andare incontro ad un differenziamento osteoblastico, come risulta dai trascritti mRNA a 38gg e dalla sostanziale sovrapposizione dei risultati con quelli risultanti dal periostio. Di particolare interesse, sebbene necessiti di maggiori approfondimenti, è l'espressione differenziale nei due siti di OP e BOSP, la prima presente nella membrana ma non nel periostio, con pattern opposto la seconda. Queste due proteine sono marker dei diversi stadi maturativi che un progenitore mesenchimale attraversa prima del differenziamento osteoblastico. L'assenza sembra indirizzare verso una diversità architettrale dell'osteogenesi da membrana sinusale e periostio, con un'ossificazione prevalentemente intramembranosa nella prima e con una prevalenza di neoapposizione a una matrice preesistente nel secondo. In altre parole a livello della membrana sinusale l'ossificazione avverrebbe per mezzo di un'infiltrazione e sostituzione secondo gli schemi Dynamic Bone Formation nella mucosa sinusale e della Static Bone Formation a livello periostale. (Palumbo et al, 2003). L'osteopontina è una proteina chiave per il metabolismo osseo e di altri tessuti; modula l'interazione tra questi e il torrente ematico, mediando l'adesione cellulare, l'angiogenesi e la risposta infiammatoria (Denhardt et al, 2001). L'osteopontina costituisce circa il 2% di tutte le proteine non collageniche dell'osso. Qui le sue funzioni precise non sono ancora state completamente identificate, sebbene ci sia uniformità di pensiero nel suo coinvolgimento, insieme al CD44, nei processi di deposizione di HA e nel rimodellamento osseo, mediando l'equilibrio tra osteoblasti e osteoclasti attraverso meccanismi pro-aptotici mediati dalla concentrazione di calcio (Hu et al.1995). L'apoptosi, che OP indurrebbe attraverso il legame con le integrine di membrane delle cellule bersaglio è ciò che maggiormente regola i meccanismi di neoapposizione nell'osso in via di sviluppo secondo le linee dettate dalla Dynamic Bone Formation (DBF). L'importanza di OP è stata messa in evidenza in topi in cui il gene per OP era stato inattivato dalla nascita: in questi animali si riscontrava il fenomeno dell'osteopetrosi così come di una generale difficoltà alla resistenza alle infezioni e ad un ritardo nei meccanismi cellulari di riparazione delle ferite, compresa la rigenerazione ossea (McKee & Nanci, 1996, O'Regan & Berman, 2000). Da segnalare inoltre il coinvolgimento di OP nella formazione della cosiddetta "linea cementante", la possibilità cioè di un'ossificazione "de novo" su substrati organici o inorganici, fondamentale nei risvolti clinici e di ingegneria tissutale che questi potrebbero avere. Questi dati, se confermati in un campione più ampio, pongono una luce nuova sui meccanismi biologici di sviluppo dello splancocranio e avrebbe risvolti clinici per la pianificazione razionale di procedure clinico chirurgiche quali quelle del cosiddetto rialzo del seno mascellare. Tecniche chirurgiche rigenerative senza l'ausilio di materiali da innesto potrebbero trovare un loro razionale biologico.

Analisi RT-PCR a 0gg in alcuni cloni di membrana

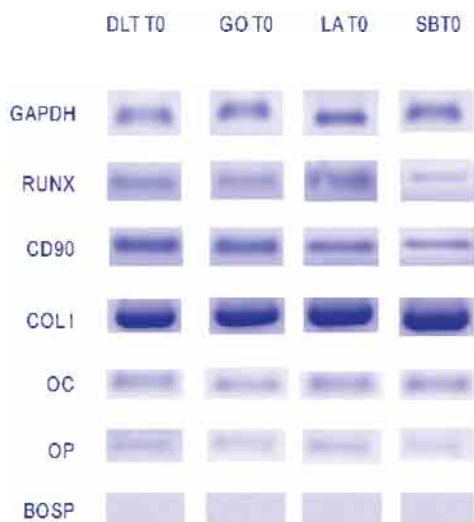


Fig. 1 - Analisi RT-PCR a oggi in alcuni cloni di membrana

Analisi RT-PCR a 0gg in alcuni cloni di membrana

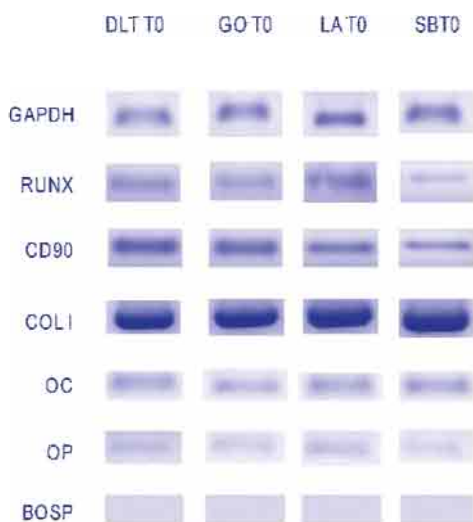


Fig. 2 - Analisi RT-PCR a 14e 38 gg in alcuni cloni di membrana

Contenuto di HA in cellule di membrana

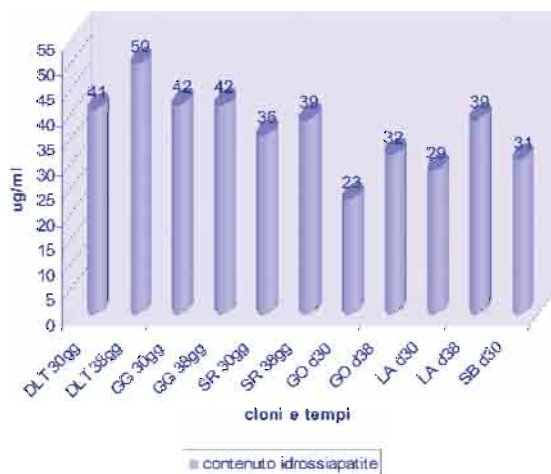


Fig. 3 -Contenuto di HA in cellule di membrana

Cellule di Membrana di Schneider

HLA DR/HLA ABC	-/+
CD34/CD45	-/-
CD14/CD117	-/(3,5%)
CD44/CD133	+(99,4%)-
CD90	+(99%)
CD105/CD31	+(88%)-

Fig. 4 - Cellule di membrana di Schneider

BIBLIOGRAFIA

1. Caylakli F, Yavuz H, Cagici AC, Ozluoglu LN. Endoscopic sinus surgery for maxillary sinus mucoceles. *Head Face Med.* 2006; 2: 29.
2. Gruber R, Kandler B, Fuerst G, Fischer MB, Watzek G. Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein (BMP)-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Oct; 15(5): 575-80.
3. Srouji S, Kizhner T, Ben David D, Riminucci M, Bianco P, Livne E. The Schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: in vivo and in vitro study. *Calcif Tissue Int.* 2009 Feb; 84(2): 138-45.
4. Valverde P, Zhang J, Fix A, Zhu Ji, Ma W, Tu Q, and Chen J. Overexpression of Bone Sialoprotein Leads to an Uncoupling of Bone Formation and Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res.* 2008 November; 23(11): 1775–1788. Published online 2008 June 30 doi: 10.1359/JBMR.080605.
5. Palma VC, Magro-Filho O, de Oliveria JA, Lundgren S, Salata LA, Sennerby L. Bone reformation and implant integration following maxillary sinus membrane elevation: an experimental study in primates. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2006; 8: 11-24.
6. Palumbo C, Ferretti M, De Pol A. Apoptosis during intramembranous ossification. *J Anat.* 2003 Dec; 203(6): 589-98.
7. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: Regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107: 1055-1061.
8. Hu DD, Hoyer JR, Smith JW. 1995a. Ca2p suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin alpha v beta 3. *J Biol Chem* 270: 9917-9925.
9. McKee MD, Nanci A, Khan SR. 1995. Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J Bone Miner Res* 10: 1913-1929.
10. O'Regan A, Berman JS. 2000. Osteopontin: A key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 81: 373-390.