



IMPIEGO DI hASCs (HUMAN ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS) NELLA RIGENERAZIONE OSSEA

hASC (Human Adipose-derived Stem Cells) in bone tissue regeneration

de Girolamo L^{o§}, Brini AT*, Weinstein RL^o

^oClinica Odontoiatrica, Università degli Studi di Milano, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano;

*Dipartimento di Farmacologia Chemioterapia e Tossicologia Medica, Facoltà di Medicina, Università degli Studi di Milano; [§]IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano

^oDepartment of Stomatology, University of Milan, IRCCS Orthopedic Institute Galeazzi, Milan (Italy);

*Medical Pharmacology Department, Faculty of Medicine, University of Milan (Italy);

[§]IRCCS Orthopedic Institute Galeazzi, Milan (Italy)

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "H.M. GOLDMAN" / PROCEEDINGS BOOK RESEARCH SESSION "HENRY M. GOLDMAN" PRIZE - 2007

RIASSUNTO

Le hASC (human Adipose-derived Stem Cells) possiedono caratteristiche di staminalità sovrapponibili alle MSC isolate da midollo osseo e sono ottenibili più facilmente e in maggior quantità. Le hASC differenziano con efficienza verso la linea osteogenica e mostrano un ottimo adattamento *in vitro* al Bio-Oss® e alla idrossiapatite, in associazione al quale mantengono inalterato il loro potenziale proliferativo e differenziativo.

SUMMARY

hASCs (human Adipose-derived Stem Cells) are very similar to MSCs from bone marrow and they are available more easily and in a larger amount. hASC are able to efficiently differentiate into osteogenic lineage and they show a very good *in vitro* adaptation to ceramic materials like HA and to Bio-Oss®: when they are seeded on it, they maintain their proliferative and differentiation potential.

INTRODUZIONE

Lo sviluppo di modalità terapeutiche capaci di sostituire le cellule di organi irreversibilmente danneggiati costituisce un nuovo settore della medicina definito "Medicina Rigenerativa". La base biologica di questa nuova frontiera della medicina è rappresentata dallo straordinario potenziale delle cellule staminali, progenitori immaturi in grado di differenziare nei diversi tipi cellulari.

Le cellule staminali isolabili da tessuti adulti, nonostante siano dotate di una capacità differenziativa ridotta rispetto a quella delle cellule staminali embrionali, sono tuttavia in grado di differenziarsi in diverse linee cellulari. Dagli studi fino ad oggi condotti emerge un particolare interesse per le cellule staminali adulte della linea mesenchimale (MSC, Mesenchymal Stem Cells), isolabili più comunemente dal midollo osseo, ma ritrovate anche in siti alternativi quali il periostio, i muscoli, la membrana sinoviale e il tessuto adiposo (Zuk *et al.*, 2001; De Ugarte *et al.*, 2003; Dragoo *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2006), che, grazie alla loro elevata capacità differenziativa, possono essere utilizzate nella rigenerazione di un tessuto o di un organo danneggiato o distrutto. Nei modelli sperimentali animali è evidente come tali cellule, espansive numericamente ed indotte a differenziarsi appropriatamente *in vitro*, possono essere poi reinfuse nell'organismo e ricostituire il patrimonio cellulare danneggiato.

Attualmente, in implantologia orale, la carenza di un adeguato volume osseo viene principalmente trattata con il trapianto di osso autologo, ancora ritenuto il *gold standard* grazie alle sue proprietà osteogeniche, osteoconduttive e osteoinduttive (Garg, 2001). L'impiego di osso autologo, tuttavia, implica la necessità di un sito di prelievo, che può essere intra-orale, se il volume richiesto è di dimensioni ridotte, oppure extra-orale nel caso di ampi difetti. Nell'ultimo caso la procedura risulta piuttosto gravosa per il paziente, richiedendo l'ospedalizzazione per l'intervento di prelievo, l'anestesia totale, dolore e limitazione funzionale a carico del sito donatore per alcuni giorni, associato a consumo di farmaci analgesici e antinfiammatori.

Alcuni materiali alloplastici e xenoplastici possono essere utilizzati come sostituti dell'osso, con risultati buoni nel caso di difetti ridotti, ma inadeguati in presenza di ampie perdite, a causa dello scarso numero di precursori degli osteoblasti disponibili in tali situazioni cliniche. Tali evidenze portano a considerare che l'impiego combinato di sostituti dell'osso e di cellule progenitrici potrebbe indurre un forte miglioramento nelle terapie mirate alla rigenerazione ossea.

Questo studio si propone quindi di indagare il potenziale osteogenico *in vitro* di cellule staminali mesenchimali umane isolate da tessuto adiposo sottocutaneo (hASC, human Adipose-derived Stem Cells) da sole e in associazione ad un sostituto osseo di origine bovina, usato con successo in chirurgia oro-maxillo-facciale (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Germania).

MATERIALI E METODI

Il tessuto adiposo utilizzato nello studio per l'isolamento delle cellule staminali mesenchimali (hASC, human Adipose-derived Stem Cells) è stato ottenuto dal materiale proveniente da 19 pazienti sottoposti a liposuzione estetica (di età compresa tra i 21 e i 60 anni, 20% uomini, 80% donne), come precedentemente descritto (Zuk *et al.*, 2002), sotto consenso informato.

La componente cellulare è stata separata dal tessuto mediante digestione enzimatica con 0,075% Collagenasi di tipo I (209 U/mg, Worthington, Lakewood, NJ, USA), preceduta da alcuni cicli di lavaggio/centrifugazione per eliminare la componente ematica contaminante. Al termine della digestione, le cellule isolate sono state seminate in pia-

stre da coltura alla densità di 4×10^4 cellule/cm² e purificate per adesione dalle popolazioni cellulari contaminanti.

Le cellule sono state mantenute in coltura in terreno completo (DMEM, 10% FBS, 50U/ml penicillina, 50 µg/ml streptomina, 2mM L-Glutamina), effettuando nei primi giorni alcuni lavaggi con PBS (Phosphate Buffer Saline).

Il tasso di crescita delle hASC è stato valutato mediante conta cellulare eseguita ad ogni passaggio in coltura.

La frequenza di cellule clonogeniche è stata valutata attraverso un saggio in diluizioni limitanti, come precedentemente descritto (Castro-Malaspina *et al.*, 1980).

Le hASC sono state caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica con citofluorimetro a flusso (BD FACScalibur System), utilizzando anticorpi specifici per marcatori di superficie caratterizzanti le MSCs, quali CD13, CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD49d, CD54, CD71, CD 90 e CD105 (Ansell, Bayport, MN, USA; LabVision, Fremont, CA, USA). La multipotenzialità differenziativa delle hASC è stata dimostrata mediante l'induzione verso le linee condrogenica, osteogenica ed adipogenica, utilizzando specifici medium di coltura (Albisetti *et al.*, 2005, Guilak *et al.*, 2005).

Differenziamento osteogenico

hASC al IV passaggio in coltura sono state seminate in piastre da coltura alla densità di 15000 cells/cm² e indotte a differenziare usando uno specifico terreno di coltura costituito da DMEM, 10% FBS, 10 nM desametasone, 10 mM β-glicerofosfato, 150 µM ascorbato-2-fosfato e 10 nM Colecalciferolo.

Le cellule sono state mantenute in coltura per 21 giorni, sostituendo il terreno di crescita tre volte alla settimana.

È stata quindi valutata la capacità delle hASC non differenziate e differenziate verso la linea osteogenica di aderire e crescere su alcuni sostituti dell'osso, quali granuli di idrossiapatite (HA, 70% di porosità) e granuli di Bio-Oss® spongiosa (0,25-1 mm), al fine di valutare il comportamento *in vitro* di questo costruito cellule-scaffold. Le hASC sono state mantenute in terreno di coltura osteogenico in presenza di Bio-Oss® per 3 settimane, alla concentrazione di 1×10^7 cellule/ml. Al termine del periodo di coltura i granuli di Bio-Oss® seminati con le hASC sono stati processati per le successive analisi al microscopio elettronico a scansione (dati non mostrati). Il differenziamento osteogenico delle hASC coltivate in monostrato e seminate su Bio-Oss® e HA è stato determinato attraverso la valutazione di alcuni marcatori specifici delle cellule del tessuto osseo, quali l'attività della fosfatasi alcalina, la formazione di depositi di calcio e l'espressione di osteopontina.

Il deposito di calcio prodotto dalle hASC cresciute per 20 giorni in differenziamento allo stato imperturbato sia in monostrato che a contatto con il Bio-Oss®, è stato analizzato mediante colorazione specifica con Alizarin Red S (pH 4.1). La deposizione di colore è stata quantificata mediante estrazione del colorante con 10% di cetilpiridinio cloruro (CPC) e successiva lettura allo spettrofotometro della densità ottica (450 nm).

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il programma GraphPad Prism Versione 4.00 (GraphPad Software, San Diego California USA). I dati sono stati sottoposti al test "t" di Student e valori di P value < 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

L'isolamento delle cellule staminali dal tessuto adiposo si è dimostrato piuttosto rapido ed efficiente. La resa di hASC è di circa 3×10^5 cellule/ml di lipoaspirato grezzo, seppur con un'elevata variabilità inter-paziente non correlabile all'età e al sesso (Tabella 1). Le cellule, dopo circa una settimana di quiescenza dal prelievo, cominciano a proliferare attivamente, assumendo una morfologia simil-fibroblastoide tipica delle cellule staminali mesenchimali (Fig. 1).

La capacità clonogenica, ricavata mediante saggi in diluizioni limitanti, varia dal 3 al 20%, con valori più elevati associati a cellule mantenute in coltura per minor tempo, mentre il tempo di *doubling* cellulare tra il secondo e il terzo passaggio in coltura è mediamente di 80 ore (Tabella 1).

Tabella 1: Rese cellulari, tempi di *doubling* cellulare e percentuale di cellule clonogeniche di tre popolazioni cellulari analizzate

Sample	Cellular yield (per ml of low lipoaspirates)	Doubling time (between II and III passage)	% of clonogenic cells
1	2×10^5	04 h	9 (V passage)
2	2×10^4	120 h	10 (IV passage)
3	$3,5 \times 10^3$	02 h	20 (I passage)

L'espressione dei marcatori di superficie analizzati è sovrapponibile a quella delle MSC isolate da midollo osseo, ad eccezione dell'espressione del CD 34 che è più elevata nelle hASC, e il cui significato è attualmente oggetto di indagine (Tabella 2).

Tabella 2: Espressione di marcatori di superficie: confronto tra hASC e MSC da midollo osseo

	hASC	hBMSC
CD 13	+++	+++
CD 14	-	-
CD 29	+	+
CD 34	+/	-
CD 44	++	++
CD 45	-	-
CD 49d	++	++
CD 54	++	+/-
CD 71	-	-
CD 90	++	++
CD 105	++	++

Il differenziamento verso la linea osteogenica delle hASC è stato analizzato mediante la valutazione di specifici marcatori, quali le mutazioni morfologiche, l'attività della fosfatasi alcalina, la formazione di depositi di calcio e l'espressione dell'osteopontina.

Le cellule mantenute in coltura monostrato in terreno differenziativo mostrano una morfologia piuttosto diversa da quella simil-fibroblastoide delle hASC coltivate in terreno non inducente: esse infatti, alla colorazione con ematossilina e eosina, appaiono di forma sferica e con tendenza al raggruppamento (Figg. 2 a, b).

A 7, 14 e 21 giorni di coltura è stato valutato, mediante saggio enzimatico, l'incremento di attività della fosfatasi alcalina, un marcatore precoce della differenziazione in senso osteogenico, delle hASC coltivate in terreno differenziativo rispetto a quella mantenute in terreno controllo, che risulta statisticamente significativo tra la seconda e la terza settimana di differenziamento in tutte le popolazioni cellulari analizzate (dati non mostrati).

Dopo 21 giorni di coltura in piastra in terreno differenziativo, le hASC mostrano un'elevata deposizione di matrice extracellulare, assente invece nelle cellule coltivate in terreno non inducente (Figg. 2 c, d). L'incremento di deposizione di calcio delle cellule differenziate rispetto al controllo, calcolato mediante lettura della densità ottica, è in media di 20 volte. Inoltre, ad ulteriore conferma del progressivo differenziamento delle hASC, è stata valutata a 14 giorni di differenziamento, l'espressione dell'osteopontina, una glicoproteina secreta nella matrice extracellulare, con esperimenti di immunofluorescenza: essa risulta rilevabile nelle cellule differenziate in terreno specifico verso la linea osteogenica e assente nelle cellule mantenute in terreno non inducente.

Le analisi dei costrutti hASC/Bio-Oss® e hASC/HA al microscopio ottico ed elettronico a scansione (dati non ancora pubblicati) hanno permesso di osservare che le hASC aderiscono stabilmente alla superficie esterna dei granuli e penetrano all'interno delle microporosità del materiale (Fig. 3). Non è stato osservato nessun effetto citotossico del Bio-Oss® e dell'HA: le cellule si sono infatti mantenute vitali e proliferanti.

La deposizione di calcio extracellulare è stata ampiamente osservata anche per le cellule differenziate in presenza di Bio-Oss® e risulta di circa 3 volte maggiore rispetto alla deposizione rilevata in cellule coltivate su altri sostituti ossei sintetici, tra cui l'idrossiapatite.

DISCUSSIONE

Lo studio condotto ha permesso di verificare la possibilità di isolare cellule staminali mesenchimali dal tessuto adiposo. Tale sito di prelievo offre numerosi vantaggi, tra cui l'abbondanza del materiale e la mini-invasività della procedura correlata ad una scarsa sensazione dolorosa avvertita dal paziente.

Le analisi condotte hanno messo in evidenza una buona resa di isolamento della componente staminale dal tessuto adiposo, non età-dipendente, così come invece è riportato per le MSC da midollo (Shi *et al.*, 2005).

L'elevata resa, unita alla possibilità di disporre di elevate quantità di tessuto adiposo, rendono tale metodica assai valida per la potenziale rigenerazione di ampi difetti tissutali. Il potenziale differenziativo *in vitro* verso la linea osteogenica delle hASC è stato ampiamente verificato, sia in coltura monostrato che in associazione a *scaffold*, in particolare

al Bio-Oss®. La capacità di differenziare verso altre linee cellulari, tra cui quella condrogenica e adipogenica, qui non riportate ma verificate nei nostri laboratori, conferma la multipotenzialità delle hASC.

Essendo di derivazione naturale il Bio-Oss® vanta notevoli analogie con l'osso umano. L'elevata porosità favorisce *in vitro*, così come *in vivo*, la migrazione delle cellule attraverso il sistema di pori interconnessi, che incontrano un ambiente biologico ideale per adesione, differenziazione e produzione di matrice ossea.

I passi successivi previsti dal nostro studio comprendono la valutazione del potenziale osteogenico delle hASC *in vivo* in associazione a Bio-Oss®, dapprima in animali immunodeficienti, utilizzando cellule umane, e quindi su modelli animali di taglia superiore. Gli Autori dichiarano che si tratta di una ricerca indipendente, totalmente finanziata dal Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica dell'Università di Milano e dall'IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano.

Fig. 1. Aspetto morfologico di hASC indifferenziate al IV passaggio in coltura (4X)

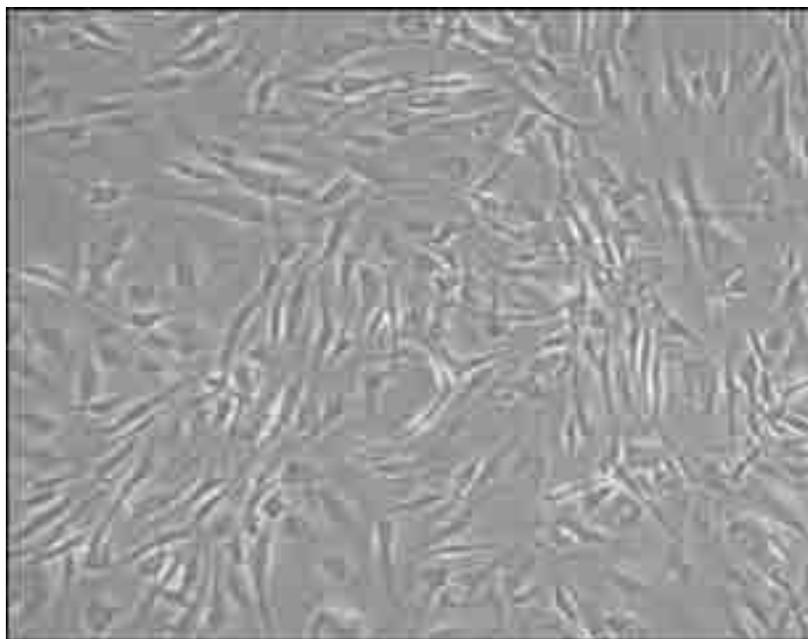


Fig. 2. Morfologia di hASC indifferenziate (a, 4X) e differenziate verso la linea osteogenica (b, 4X). Deposizione di calcio rilevata con colorazione con Alizarin Red S in cellule indifferenziate (c, 4X) e differenziate verso la linea osteogenica (d, 4X)

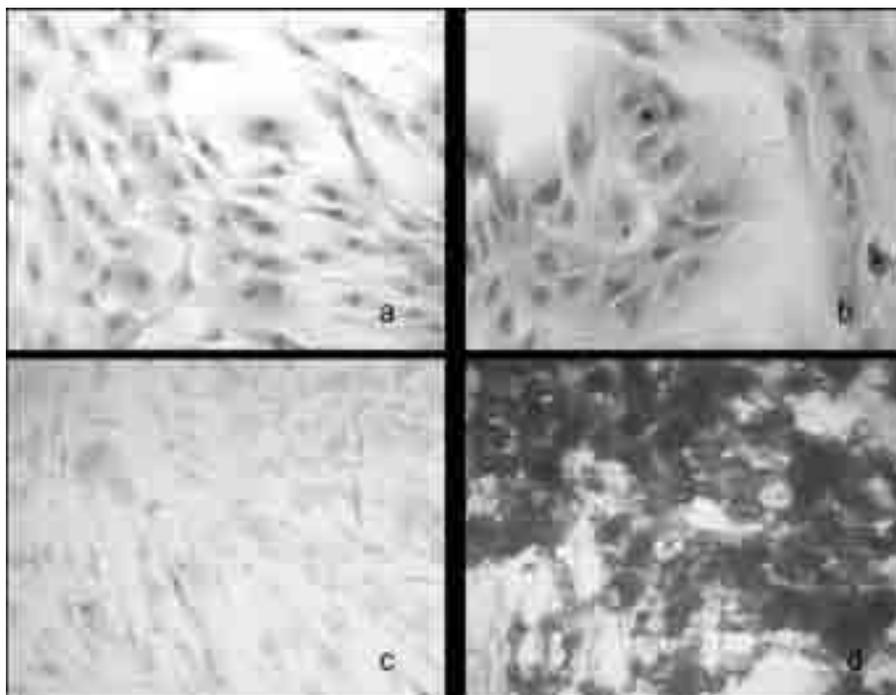
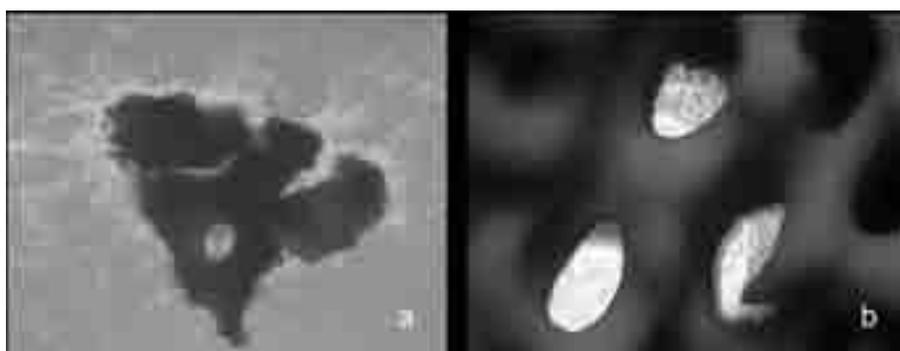


Fig. 3. hASC differenziate verso la linea osteogenica su Bio-Oss (a, 4X) e su granuli di idrossiapatite (b, 10X) al microscopio ottico



BIBLIOGRAFIA

1. Zuk PA, Zhu M *et al.*, 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng*, 7(2): 211-228.
2. De Ugarte DA, Morizono K *et al.*, 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow, *Cell Tissues Organs*, 174(3): 101-109.
3. Drago J, Choi JY *et al.*, 2003. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat, *J Orthop Res*, 21(4): 622-629.
4. Choi YS, Cha SM *et al.*, 2006. Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse, *Biochem Biophys Res Commun*, 345: 631-637.
5. Garg AK, 2001. Current concepts in augmentation of the maxillary sinus for placement of dental implants. *Dent Implants Update*, 11: 17-22.
6. Zuk PA, Zhu M *et al.*, 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Mol Biol Cell*, 13(12): 4279-4295.
7. Castro-Malaspina H, Gay RE, *et al.*, 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny, *Blood*, 56(2): 289-301.
8. Albisetti W, de Girolamo L, Parafioriti A, Rovati LC, Brini AT, 2005. Caratterizzazione di cellule mesenchimali staminali da tessuto adulto nella differenziazione in tessuti scheletrici, *Archivio di Ortopedia e Reumatologia* 116(3): 19-20.
9. Guilak F, Lott KE, *et al.*, 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206(1): 229-237.
10. Shi YY, Nacamuli RP *et al.*, 2005. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging, *Plast Reconstr Surg*, 116(6): 1686-1696.