

**Dottorato di ricerca in Oncologia e Chirurgie Sperimentali  
(PON DOTTORATI INDUSTRIALI - a.a. 2016/2017)**

**(Indirizzo: Scienze Stomatologiche e Chirurgia Cervico-Facciale)  
XXXII Ciclo – Progetto di ricerca di Marta Cristaldi**

**Titolo specifico del progetto di ricerca**

Ricerche in vitro e in vivo sul differenziamento in senso osteogenico di cellule staminali di origine pulpale (DPSC) e di origine gengivale (GMSC) mediante scaffolds nanostrutturati.

**Background**

La malattia paradontale è una patologia infiammatoria cronica che comporta la progressiva perdita dell'osso alveolare e, se non adeguatamente trattata, negli stadi più avanzati porta alla perdita degli elementi dentari. Secondo le linee guida nazionali per la promozione della salute orale e prevenzione delle patologie orali del Ministero Della Salute, le paradontiti croniche colpiscono maggiormente la popolazione tra i 35 e i 40 anni di età, con una prevalenza che oscilla dal 70% al 95% in Europa e circa del 60% nella popolazione italiana di cui il 10-14% costituisce le forme gravi o avanzate.

I pazienti che perdono gli elementi dentari a causa della parodontite necessitano spesso di procedure chirurgiche per la rigenerazione ossea al fine di favorire la sostituzione degli elementi dentari persi mediante fixture implantari. Tra le tecniche medico-chirurgiche oggi adottate per la rigenerazione ossea tissutale, l'innesto di osso autologo rappresenta il gold standard, nonostante questo sia associato alla creazione di un secondo sito chirurgico intra-/extra-orale con possibilità di complicazioni e aumento di morbilità post-chirurgica. Recentemente, è cresciuto l'interesse nell'ambito delle biotecnologie e, in particolar modo, dell'ingegneria tissutale (TE) che, supportata da innovative tecniche medico-chirurgiche, ha offerto nuove prospettive ed opportunità per la rigenerazione ossea guidata (GBR).

E' stato già ampiamente dimostrato *in vitro* e *in vivo* che le cellule staminali derivanti da polpa dentale e gengivale, definite rispettivamente *Dental Pulp Stem Cells (DPSCs)* e *Gingival Mesenchymal Stem Cells (GMSCs)*, posseggono proprietà di multipotenza essendo, infatti, in grado di differenziare in differenti popolazioni cellulari tra cui condrociti, adipociti e osteociti; inoltre, diversi studi hanno dimostrato come DPSCs e GMSCs siano in grado di supportare anche la rigenerazione ossea *in vivo*[1-5]. Tuttavia poco o nulla si conosce sull'influenza nei confronti delle proprietà staminali mesenchimali delle DPSCs e GMSCs da parte di un microambiente infiammatorio.

**Obiettivi**

Questo studio ha come *obiettivo primario* quello di individuare una nuova procedura per la rigenerazione ossea basata sull'impiego di DPSCs e GMSCs isolate da elementi dentari compromessi da paradontite severa, e quindi in ogni caso da estrarre, riducendo sia le possibili complicanze post-chirurgiche, con miglioramento della qualità di vita del paziente, che i costi e le terapie necessarie al paziente per il recupero delle funzioni dell'apparato stomatognatico.

La collaborazione con l'azienda farmaceutica GHIMAS (Bologna), da anni produttrice di sostituti ossei per le procedure di chirurgia rigenerative in ambito odontoiatrico, e con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), consentirà di valutare ed individuare il materiale da innesto (scaffold) maggiormente affine alle caratteristiche delle DPSCs e GMSCs e adatto a supportarne la rigenerazione ossea *in vivo*.

*Obiettivo secondario* del progetto sarà quello di indagare presso l'Università di Anversa (sede partner estera) il ruolo di microRNAs, in associazione o meno a nanovesicole esosomiali nel

differenziamento osteoblastico, allo scopo di sviluppare nuovi potenziali marker per lo studio del differenziamento osseo e/o mediatori del differenziamento in senso osteogenico.

## **Materiali e Metodi**

Arruolamento pazienti e raccolta dei campioni: dopo aver arruolato un gruppo di pazienti sani (gruppo controllo) e di pazienti affetti da paradontite cronica (gruppo test), presso gli ambulatori odontoiatrici verranno prelevati i campioni di polpa dentale e polpa gengivale, e questi trasferiti in terreno di coltura alpha-MEM contenente antibiotici. Le cellule DPSCs e GMSCs saranno isolate dalla polpa dentale e gengivale, rispettivamente, tramite digestione enzimatica con Collagenasi di tipo I.

Analisi citofluorimetrica: dopo isolamento, sarà effettuata un'analisi al citofluorimetro dei principali markers di staminalità mesenchimale (Stro-1; DC46; CD29 e SSA4).

Valutazione differenziamento osteogenico *in vitro*: le cellule staminali mesenchimali isolate verranno fatte crescere in terreno D-MEM addizionato di FBS 10% e acido ascorbico per 21 giorni, allo scopo di indurre il differenziamento osteogenico *in vitro*.

Quest'ultimo sarà valutato tramite saggio di immunoistochimica Red Alizarin (ARS), saggio ELISA dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP) e Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) dei principali fattori coinvolti nell'osteogenesi quali RUNX2 e Osteocalcina (OCN).

Valutazione differenziamento osteogenico *in vivo*: con la collaborazione tra il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) e l'azienda farmaceutica GHIMAS (Bologna) verranno investigati i materiali da innesto (scaffold) maggiormente adatti a supportare la crescita e il differenziamento in senso osteogenico delle DPSCs e GMSCs, questi ultimi valutati tramite saggio Arancio d'Acridina, saggio DAPI e analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

Lo studio *in vivo* sarà effettuato su topi NOD.SCID presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (IZS) impiegando lo scaffold ritenuto più adatto alla crescita e al differenziamento delle cellule. La neoformazione ossea *in vivo* sarà valutata a 4, 6 e 8 settimane dall'impianto tramite esame immunoistochimico e analisi di espressione RT-qPCR dei principali fattori osteocitari.

Valutazione del ruolo di microRNAs e/o esosomi nel differenziamento osteoblastico: sarà tracciato il profilo di microRNAs delle DPSCs e GMSCs, indagandone in seguito, il ruolo nel differenziamento osteoblastico in associazione o meno alle nanovesicole esosomiali. La valutazione del ruolo di "cell-generated exosomes" nel differenziamento in senso osteogenico delle DPSCs e GMSCs in assenza di altri mediatori di differenziamento avrà lo scopo di sviluppare nuovi potenziali marker per lo studio del differenziamento osseo e/o mediatori del differenziamento in senso osteogenico.

## **Risultati attesi**

Lo sviluppo di matrice mineralizzata *in vitro* e la rigenerazione ossea *in vivo* su opportuno scaffold da parte di DPSCs e GMSCs isolate da elementi dentari compromessi da paradontite cronica, con le stesse caratteristiche e potenzialità delle cellule del gruppo controllo.

## **Conclusioni**

Il goal dello studio è, quindi, quello di individuare una nuova sorgente di cellule staminali mesenchimali adulte da impiegare nelle procedure di rigenerazione ossea autologa, impiegando tessuti ottenuti da estrazione dentale e finora rimasti inutilizzati.