

**Esami di ammissione dottorato di ricerca in Oncologia e Chirurgie Sperimentali**  
**(Indirizzo: Scienze Stomatologiche e Chirurgia Cervico-Facciale)**  
**XXIX Ciclo – Progetto di ricerca di Rodolfo Mauceri**

**Titolo specifico del progetto di ricerca**

Ricerche in vitro e in vivo su cellule staminali di origine pulpare e di origine gengivale da elementi dentari parodontopatici.

**Stato dell'arte:**

L'ingegneria tissutale potrebbe rappresentare un nuovo approccio per la terapia riabilitativa del paziente affetto dalla malattia parodontale. La malattia parodontale è una malattia infiammatoria cronica che produce la distruzione dei tessuti di supporto del dente e che è causata da un'infezione polimicrobica di batteri gram negativi anaerobi<sup>1</sup>. Oltre il 30% degli adulti negli Usa ed in Europa presentano malattia parodontale, oltre il 10% in forma grave<sup>2-3</sup>. La malattia parodontale, negli stadi avanzati, è associata alla perdita degli elementi dentari e a un severo riassorbimento osseo, inoltre costituisce un crescente problema tra la popolazione per la conseguente perdita di funzione e il peggioramento della qualità di vita che ne deriva<sup>4-5-6</sup>. L'attuale terapia della malattia parodontale mira all'arresto della progressione della malattia ma non alla *restitutio ad integrum*.

L'ingegneria tissutale è una branca medica che mira alla rigenerazione o alla riparazione di tessuti o organi danneggiati mediante l'utilizzo di biomateriali, fattori di crescita e cellule staminali<sup>7</sup>. I biomateriali, o "scaffold", sono impalcature che favoriscono la proliferazione e differenziazione delle cellule, possono avere composizioni chimiche e geometriche differenti, inoltre il loro utilizzo può essere associato o meno a fattori di crescita tissutale. Gli scaffold vengono divisi in riassorbibili e non riassorbibili, possono essere concavi, piatti o convessi<sup>8</sup>.

A proposito delle cellule staminali, in letteratura sono state descritte 6 differenti nicchie di cellule staminali mesenchimali nel cavo orale: le cellule staminali di origine pulpare da denti permanenti (DPSC) o decidui (SHED), cellule staminali del legamento parodontale (PDLSC), cellule staminali dalla papilla apicale (SCAP), cellule staminali del follicolo dentario (DFSC) e le cellule staminali derivate dalla gengiva e mucosa orale (GMSC)<sup>9-10-11</sup>. Le cellule staminali di origine dentale non solo hanno dimostrato ottime capacità di differenziazione in cellule osteogeniche, ma sono di più facile reperimento rispetto alle cellule staminali mesenchimali prelevate dal midollo osseo. Più dettagliatamente, si è dimostrata la formazione di matrici extracellulari mineralizzate in vitro, mentre in vivo si è osservata la formazione di tessuto osseo lamellare vascolarizzato<sup>12-13</sup>. Le nicchie di cellule staminali dentali più accessibili sono: la polpa dentale, la mucosa gengivale e il legamento parodontale<sup>10-12-14</sup>.

Sarebbe molto interessante verificare se a partire dalla polpa dentale di elementi dentari parodontopatici e dai tessuti gengivali circostanti fosse possibile ottenere cellule staminali mesenchimali osteogeniche, non essendo presente in letteratura nessuno studio che valuta questa ipotesi. La possibilità di sfruttare un elemento dentale parodontopatico, in ogni caso da estrarre, per rigenerare tessuto osseo nello stesso paziente potrebbe essere un'utile procedura ai fini riabilitativi del paziente. Il progetto di ricerca si focalizzerà solo sullo studio delle cellule staminali di origine pulpare e di origine gengivale di elementi dentari parodontopatici, si precisa che per motivi di tempo e sostenibilità del progetto le capacità rigenerative delle cellule staminali del legamento parodontale non verranno prese in osservazione.

La descrizione del progetto di ricerca sarà articolata in semestri (I-VI).

**Obiettivi del progetto di ricerca**

- Valutare la capacità in vitro di formare matrice extracellulare mineralizzata delle DPSC e delle GMSC provenienti da elementi dentari estratti per malattia parodontale;
- confrontare le caratteristiche istomorfologiche e immunistochemiche delle matrici extracellulari sviluppate in vitro;
- valutare la capacità della matrici extracellulari mineralizzate di formare osso lamellare vitale in vivo su animale;
- effettuare le analisi istomorfologiche, immunistochemiche e mediante il Test HLA dell'eventuale osso lamellare neoformato.

**Obiettivi secondari del progetto di ricerca:**

- Eseguire una revisione sistematica della letteratura riguardo alle DPSC e delle GMSC.

*Rodolfo Mauceri*

### **Obiettivi opzionali del progetto di ricerca (IV e V semestre del progetto di ricerca):**

- Sviluppare uno scaffold con tecnologia Cad/Cam, da associare all'utilizzo delle DPSC e delle GMSC, con caratteristiche chimiche e fisiche ideali per la riabilitazione delle atrofie ossee in funzione della classificazione dei difetti ossei di Cawood e Howell<sup>15</sup>, e valutarne l'efficacia con test in vivo su animali;
- eseguire sperimentazione in vivo su animale per il trattamento di difetti ossei parodontali provocati mediante l'utilizzo di DPSC e GMSC;
- formulare ipotesi di applicazioni in vivo su umani di DPSC e GMSC per il trattamento di difetti ossei;
- Analisi dei campioni tissutali attraverso il laser confocale.

### **Disegno dello studio:**

Il presente studio sarà di tipo sperimentale, caso-controllo, con un gruppo Test (T) formato da cellule staminali di origine pulpale e di origine gengivale da elementi dentari parodontopatici e un gruppo Controllo (K) formato da cellule staminali di origine pulpale e di origine gengivale da elementi dentari sani.

### **Materiali**

Per lo studio in vitro:

- Gruppo T:

- premolari o molari parodontopatici (mobilità grado III);
- tessuti gengivali prelevati a livello del sito dell'estrazione chirurgica del dente, nel rispetto della guarigione dei tessuti.

- Gruppo K:

- denti del giudizio e premolari da estrarre per motivi ortodontici;
- tessuti gengivali prelevati a livello del sito dell'estrazione chirurgica del dente, nel rispetto della guarigione dei tessuti.

Le fasi di laboratorio prevedono l'utilizzo delle apparecchiature del Laboratorio di Medicina Rigenerativa-U.O.C. di Endocrinologia Responsabile Prof.ssa Carla Giordano-A.O.U.P. "Paolo Giaccone" di Palermo.

Per lo studio in vivo saranno utilizzati topi NOD.SCID dello stabulario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, sezione territoriale di Palermo.

Tale progetto di ricerca sarà eseguito in collaborazione con *The University Hospital of Antwerp*.

### **Metodi:**

Il progetto di ricerca verrà diviso in 4 *work packages*, integrati funzionalmente e cronologicamente. I *working packages* a loro volta saranno suddivisi in una o più *task* da eseguire.

### **Work Package 1 : Coordinamento del progetto e continuo aggiornamento della letteratura**

- WP1/Task1: Coordinamento del progetto di ricerca attraverso la redazione di diario giornaliero.

- WP1/Task2: Ricerca elettronica degli articoli scientifici effettuata tramite il database di Pubmed, con le parole chiave: *pulp, stem cells, dental pulp stem cells, bone regeneration, osteoblastic differentiation, bone defects, periodontal disease, tissue engineering*. I criteri di inclusione ed esclusione saranno applicati con uno screening iniziale del titolo e dell'abstract degli articoli presenti sul database, secondo la tabella 1.

Criteri Inclusionea	<ul style="list-style-type: none"><li>• studio di cellule staminali mesenchimali di origine pulpale (DPSC)</li><li>• utilizzo in vivo delle DPSC per la rigenerazione ossea</li><li>• valutazione istologica del tessuto osseo rigenerato</li><li>• valutazione immunohistochimica attraverso marker tissutali ossei del tessuto rigenerato.</li></ul>
Criteri Esclusione	<ul style="list-style-type: none"><li>• utilizzo delle DPSC per la rigenerazione di tessuti non ossei</li><li>• assenza di una valutazione istologica del tessuto osseo</li></ul>

Tabella 1 - Criteri inclusione/esclusione review della letteratura

## Work Package 2: Reclutamento pazienti, campionamento, estrazione cellule staminali e studio in vitro di DPSC e GMSC

### - Wp2/Task 1 – Reclutamento pazienti per prelievo tessuti

Previa approvazione del Comitato Etico dell'A.O.U.P. "Paolo Giaccone" di Palermo, i pazienti saranno reclutati consecutivamente presso l'U.O.C. di Odontostomatologia del Dipartimento delle Scienze Specialistiche Medico-Chirurgiche e Riabilitative dell'A.O.U.P. "Paolo Giaccone" di Palermo.

Criteri di inclusione Gruppo T e del Gruppo K sono descritti in tabella 2:

<b>Gruppo Test (T)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>età dei pazienti compresa tra i 18 e 80 anni</li> <li>assenza di sospetto o evidente stato di gravidanza nei soggetti di sesso femminile</li> <li>presenza di molari e premolari con malattia parodontale in stato avanzato, con mobilità grado III, secondo la classificazione proposta da Lindhe<sup>16</sup></li> <li>risposta positiva al test di vitalità effettuato sui denti parodontopatici da estrarre</li> <li>Lettura, comprensione e firma del consenso informato per le fasi chirurgiche e l'utilizzo dei tessuti prelevati</li> </ul>
<b>Gruppo Controllo (K)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>età dei pazienti compresa tra i 18 e 80 anni</li> <li>assenza di sospetto o evidente stato di gravidanza nei soggetti di sesso femminile</li> <li>denti del giudizio o premolari da estrarre chirurgicamente per motivi ortodontici</li> <li>i denti da estrarre non devono essere affetti da malattia parodontale</li> <li>risposta positiva al test di vitalità effettuato sui denti da estrarre</li> <li>Lettura, comprensione e firma del consenso informato per le fasi chirurgiche e l'utilizzo dei tessuti prelevati</li> </ul>

Tabella 2 – Criteri Inclusione Gruppo T e Gruppo C

### - WP2/Task 2 – Fase Clinica per prelievo tessuti

Si dividerà in tre *step*, come descritto in tabella 3:

<b>Step Pre-Chirurgico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Una settimana prima della fase chirurgica, i pazienti verranno sottoposti ad una seduta di igiene professionale e istruiti al mantenimento del igiene domiciliare</li> </ul>
<b>Step Chirurgico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Applicazione di gel a base di Clorexidina allo 0,3% per 2 minuti</li> <li>Estrazioni semplici o complesse degli elementi dentari<sup>17</sup></li> <li>Prelievi del tessuto gengivale</li> </ul>
<b>Step Post-Chirurgico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apertura camera pulpare e prelievo polpa tramite l'utilizzo di curette di Gracey (strumenti chirurgici sterili, monouso per singolo paziente)</li> </ul>

Tabella 3 – Fase Clinica prelievo tessuti

### - WP2/Task 3 – Fase di trasporto, estrazione cellule staminali e studio in vitro:

- Isolamento delle Cellule Staminali da Tessuto Donatore;
- Coltura Primaria;
- Analisi Citofluorimetrica;
- Purificazione della popolazione cellulare staminale;
- Proliferation Rating;
- Differenziamento in Osso;
- Analisi Qualitativa – Quantitativa del Differenziamento:
  - Saggio Alizarin Red;
  - Saggio ELISA della Fosfatasi Alcalina (ALP);
- Analisi Molecolare.

## Work package 3: Studio in vivo

### - WP3/Task 1: Modelli di studio in vivo

Saranno utilizzati 10 topi NOD.SCID dello stabulario della sezione territoriale di Palermo.

- Le matrici extracellulari mineralizzate formate in vitro dal Gruppo T e dal Gruppo C verranno innestate sul dorso di topi NOD.SCID immuno-compromessi;
- a 8 settimane dall'innesto sarà prelevato chirurgicamente il tessuto osteoide innestato.

### - WP3/Task 2: Analisi di laboratorio tessuto bioptico

- Analisi Microscopia Elettronica;
- Analisi Immuno-istochimica.

### Working Package 4: Analisi statistica dati

- WP4/Task1: Analisi dei dati raccolti di WP2 e WP3 mediante pacchetto software StataMP version 11.0 (StataCorp LP, College Station, TX).
- WP4/Task2: Confronto dei risultati ottenuti nei WP2 e WP3 con dati presenti in letteratura (WP1).

### Punti di verifica

Durante i 36 mesi del progetto di ricerca si valuteranno i progressi della ricerca attraverso punti di verifica (Tabella 4). In Tabella 5 le fasi del progetto di ricerca.

Fasi Progetto di ricerca	Work Package	Punti di verifica	Working Group
Fine I Semestre	WP1, WP2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>Reclutamento 20 pz Gruppo T e Gruppo K</li> <li>Analisi laboratorio matrici mineralizzate prodotte in vitro</li> </ul>	UNIPA
Fine II Semestre	WP1, WP2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>Reclutamento 20 pz Gruppo T e Gruppo K</li> <li>Analisi laboratorio matrici mineralizzate prodotte in vitro</li> </ul>	UNIPA
Fine III Semestre	WP1, WP2, WP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>Reclutamento 20 pz Gruppo T e Gruppo K</li> <li>Analisi laboratorio matrici mineralizzate prodotte in vitro</li> <li>Sperimentazione in vivo su animale</li> </ul>	UNIPA
Fine IV Semestre	WP1, WP2, WP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>Analisi istomorfologiche e immunoistochimiche campioni tissutali</li> <li>Possibile ampliamento sperimentazione in vitro o in vivo</li> <li>Ipotesi sviluppo obiettivi opzionali</li> </ul>	University Hospital of Antwerp
Fine V Semestre	WP1, WP2, WP3, WP4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>Analisi istomorfologiche e immunoistochimiche campioni tissutali</li> <li>Possibile ampliamento sperimentazione in vitro o in vivo</li> <li>Ipotesi sviluppo obiettivi opzionali</li> </ul>	University Hospital of Antwerp
Fine VI Semestre	WP1, WP6	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>Revisione sistematica dati presenti in letteratura su DPSC e su GMSC</li> <li><i>Submission</i> articoli scientifici</li> </ul>	UNIPA

Tabella 4 – Punti di Verifica

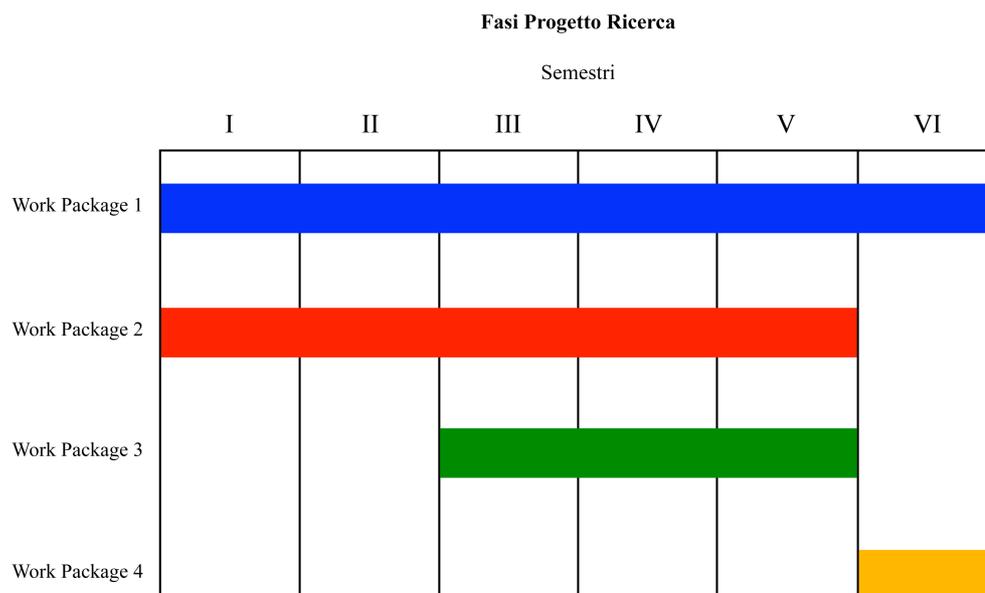


Tabella 5 – Fasi progetto di ricerca

## Risultati attesi dal progetto di ricerca (tab.6)

	Risultati Attesi
<b>Work Package 1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Coordinamento del progetto di ricerca attraverso la redazione di diario giornaliero</li><li>• Revisione sistematica della letteratura sulle capacità di rigenerazione tissutale ossea in vivo delle cellule staminali mesenchimali di origine pulpale (DPSC) e di origine gengivale (GMSC)</li></ul>
<b>Work Package 2</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Reclutamento di 60 pazienti per il gruppo Test e altrettanti pazienti per il gruppo di Controllo</li><li>• Formazione di matrice extracellulare contenente tessuto osseo nodulare in vitro dalle cellule staminali mesenchimali di origine pulpale (DPSC), derivate da denti di pazienti adulti parodontopatici, e dalle cellule staminali mesenchimali di origine gengivale (GMSC), derivate da tessuti gengivali infiammati</li><li>• Analisi delle caratteristiche istomorfologiche, immuno-istochimiche ed i risultati al test HLA dei tessuti osteoidi formati</li><li>• Esecuzione di foto di ogni singolo campione studiato</li></ul>
<b>Work Package 3</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Durante la sperimentazione in vivo su animale, valutazione delle caratteristiche istomorfologiche, immunoistochimiche ed i risultati al test HLA dei tessuti innestati</li><li>• Esecuzione di foto di ogni singolo campione studiato</li></ul>
<b>Work Package 4</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Analisi dei dati raccolti durante la sperimentazione in vitro (WP2) e in vivo (WP3) e confronto con la revisione sistematica della letteratura eseguita (WP1)</li><li>• Valutazione della formazione di tessuto osseo lamellare in vivo a partire da DPSCs prelevate da tessuti parodontopatici e GMSCs dei tessuti gengivali infiammati</li></ul>

Tabella 6 – Risultati attesi dal progetto di ricerca

### Ricadute

La collaborazione di competenze scientifiche diverse porterà non solo ad unire la loro esperienza professionale, ma anche alla possibilità di valutare i dati raccolti attraverso differenti interpretazioni interdisciplinari e considerare i possibili modi per implementare la ricerca.

Ci si aspetta di avere la dimostrazione scientifica che anche dalle cellule staminali mesenchimali di origine pulpale e di origine gengivale prelevate da pazienti parodontopatici si possa avere la formazione di osso lamellare vascolarizzato in vivo, in modo da fornire un ulteriore fonte di tessuto osseo autologo per le terapie rigenerative ossee.

### Prodotti del progetto di ricerca:

Al termine del progetto si effettuerà la divulgazione dei dati attraverso la presentazione a congressi nazionali ed internazionali dei risultati della ricerca, e la pubblicazione di articoli su riviste di rilevanza internazionali.

### Bibliografia:

1. Sanz M, et al. European Workshop in Periodontology group A. Advances in the aetiology of periodontitis. Group A: consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. J Clin Periodontol 2005; 32 (Suppl 6), 54-56.
2. Albandar JM, et al. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. J Periodontol 1999; 70, 13-29.
3. Hugoson A, et al. Distribution of periodontal disease in a Swedish adult population 1973, 1983 and 1993. J Clin Periodontol 1998; 25,542-548.
4. Ikebe K, et al. Masticatory performance in older subjects with varying degrees of tooth loss. J Dent. 2012 Jan; 40(1):71-6.
5. Nordenram G, et al. Qualitative studies of patients' perceptions of loss of teeth, the edentulous state and prosthetic rehabilitation: a systematic review with meta-synthesis. Acta Odontol Scand. 2013 May-Jul;71(3-4):937-51.
6. Tomasi C, et al. Longevity of teeth and implants - a systematic review. J Oral Rehabil. 2008; 35(Suppl.1):23-32.
7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993; 260(5110): 920-926.
8. Graziano A, et al. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. J Cell Physiol. 2008 Jan; 214(1):166-72.
9. Gronthos S, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:13625-13630.
10. Kawashima N. 2012. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration?. Arch Oral Biol. 2012 Nov;57(11):1439-58.
11. Xu X, et al. Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. J Dent Res. 2013 Sep;92(9):825-32.
12. Laino G, et al. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: An useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). J Bone Mineral Res 2005; 20: 1394 – 1402.
13. D'Aquino R, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Eur Cell Mater. 2009 Nov 12; 18:75-83.
14. Arnold WH, et al. Morphological characterization of periodontium-derived human stem cells. Ann Anat. 2010 Aug 20; 192(4):215-9.
15. Cawood JI, Howell RA. A classification of the edentulous jaws. Int J Oral Maxillofac Surg. 1988; 17:232-236.
16. Lindhe J. (1983) Clinical Periodontology and Implant Dentistry (4<sup>th</sup>ed.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
17. Chiapasco M. (2002). Manuale Illustrato di Chirurgia Orale (2<sup>a</sup>ed.). Masson S.p.a., Milano.

*Roberto Allucier*