SECONDA UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Ortopediche, Traumatologiche,
Riabilitative e Plastico-Ricostruttive
Direttore: Prof. Vincenzo Riccio

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

STUDIO SULL'INFLUENZA DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI PULSATI SULLA FORMAZIONE E DIFFERENZIAZIONE DI TESSUTO OSSEO DA CELLULE STAMINALI

Relatore:
Chiar.mo Prof.
Vincenzo Riccio

Candidato:
Porpora Giovanni
Matricola: 824/106

ANNO ACCADEMICO 2007 – 2008

INDICE

Introduzione pag. 3

Cellule staminali embrionali pag. 6

Cellule stromali di midollo osseo (cellule staminali adulte) pag. 11

- Identità e origine delle cellule stromali midollari pag. 12
- Rinnovamento contro plasticità: tessuti, progenitori, molecole pag. 16
- Cellule staminali stromali midollari e le patologie scheletriche pag. 21

Campi elettromagnetici pulsati (CEMP) pag. 24

- Meccanismo d'azione dei CEMP a livello cellulare pag. 26

Obiettivi pag. 29

Materiali e metodi pag. 30

- Dati dell'RT-PCR semiquantitativa pag. 32
- Colorazione con rosso di Alizarina pag. 34
- Saggio dell'attività fosfatasica pag. 35

Risultati pag. 36

Discussione pag. 43

Bibliografia pag. 48

INTRODUZIONE

La ricerca di nuove e differenti procedure per facilitare la riparazione dei vari tessuti scheletrici è sempre stato un obiettivo primario della chirurgia ortopedica. Queste diventano pratiche di uso comune quando si mostrano più vantaggiose e di successo rispetto a quelle precedenti.

L'uso e lo sviluppo dell'ingegneria tissutale rappresenta il punto di arrivo e contemporaneamente il punto di partenza degli sforzi fatti in quest'ultimo decennio alla ricerca di procedure capaci di favorire la riparazione e la rigenerazione di tessuti scheletrici funzionali.

Il cardine di questa nuova tecnica è la cellula: tutti i tessuti artificiali devono includere cellule, perché la cellula costruisce il tessuto.

Le cellule infatti sono le unità funzionali e strutturali di tutti i tessuti, scheletrici e non. E' importante però che ciascun tessuto sia dotato non solo di cellule adulte altamente differenziate, ma anche di cellule "immature" capaci di rimpiazzare, nel normale processo di turnover tissutale, le cellule morte con altre nuove e differenziate. Queste cellule "immature" sono le cellule staminali o meglio le cellule stromali del midollo osseo (BMSC) ed è perciò molto importante che ciascun tessuto le contenga nel suo interno o ne renda possibile l'accesso ogni qual volta ce ne sia bisogno. (Wakitani e coll., 1989; Friedenstein, 1990; Caplan e coll., 1991; Brittberg e coll., 1994; Pereira e coll., 1998; Onnyia e coll., 1998; Cancedda e coll., 2000).

Il trapianto di cellule stromali del midollo osseo rappresenta il futuro approccio per la riparazione di tessuti danneggiati altrimenti difficilmente riparabili o non riparabili. I presupposti di questo nuovo approccio terapeutico sono essenzialmente due:

1) la necessità di avere un tessuto neoformato che sia strutturalmente e funzionalmente identico alla tessuto nativo
2) la possibilità di una terapia che garantisca risultati a lungo termine.

La possibilità di coltivare queste cellule consente da una parte di migliorare le conoscenze sui processi che portano al loro differenziamento in senso osseo o cartilagineo, dall'altra di ottenere tessuti artificiali capaci di riprodurre strutturalmente e funzionalmente quelli nativi. In aggiunta, le cellule staminali rappresentano anche degli ottimi vettori per la terapia genica grazie alla possibilità di inserire nel genoma di tali cellule specifici geni senza alterare in alcun modo le loro proprietà di cellule progenitrici.

La riparazione di tessuti danneggiati altrimenti difficilmente riparabili o non riparabili può, quindi, essere ottenuta ricostruendo e trapiantando tessuti umani ottenuti prelevando cellule dal paziente, espandendole in coltura e associandole con biomateriali riassorbibili di natura diversa, sia di sintesi sia d'origine estrattiva. L'ingegneria dei tessuti e la terapia cellulare rappresentano il settore più avanzato nella terapia di una numerosa serie di situazioni patologiche. In particolare, mediante l'uso di cellule staminali osteogeniche e di biomateriali appropriati è possibile ipotizzare un approccio

terapeutico innovativo alla riparazione di lesioni e perdite di sostanza del tessuto osseo di dimensioni anche molto significative. Un aspetto di interesse notevole per accelerare i tempi di rigenerazione, riducendo quindi i tempi ed i costi per paziente a carico della società, può essere rappresentato dall'utilizzo di metodiche non invasive in ausilio all'approccio biotecnologico. In particolare negli ultimi anni si sono studiati gli effetti dei campi elettromagnetici pulsati nella riparazione delle lesioni ossee.

CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali hanno la capacità di scegliere tra un prolungato automantenimento e la differenziazione. La scelta di questa "sorte" è strettamente regolata da segnali intrinseci e dal microambiente esterno, elementi questi che sono già stati ampiamente comprovati in letteratura (Thomson e coll., 1998; Watt e coll., 2000). Le cellule staminali posono essere identificate in molti tessuti adulti di mammifero. In alcuni quali gli epiteli, il sangue e gli elementi della linea germinale contribuiscono a rimpiazzare le cellule normalmente perse con l'invecchiamento o durante una malattia. Le cellule staminali possono anche essere presenti in altri organi dell'adulto come il cervello e il pancreas, nei quali normalmente provvedono ad una rigenerazione o turnover cellulare molto limitato. Sebbene le cellule staminali nei tessuti adulti possono avere maggiore "plasticità" rispetto a quanto originariamente si pensava, esse per lo più danno luogo solo ad un limitato numero di tipi cellulari. Le cellule staminali di un embrione (ES) di mammifero allo stadio iniziale, al contrario, hanno la capacità di formare molti tipi cellulari.

In un embrione non manipolato allo stadio di blastocisti, le cellule staminali del bottone cellulare interno (ICM) differenziano prontamente per formare l'ectoderma primitivo, che successivamente differenzia durante la gastrulazione nei tre foglietti germinali embrionali (EG). Quando le cellule

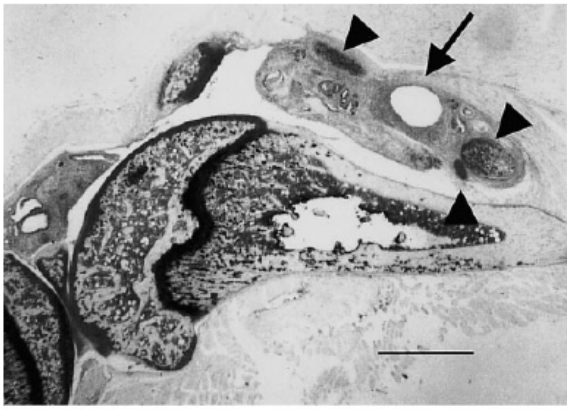
staminali embrionali vengono rimosse dal loro normale microambiente e coltivate in appropriate condizioni, le ICM danno origine a cellule che sono capaci di proliferare e automantenersi indefinitamente. Ed ancora, quando in questo stadio indifferenziato sono poste in coltura, le cellule mantengono la propria capacità di sviluppo così da dare origine ad elementi cellulari in uno stadio più avanzato di differenziamento derivati da tutti e tre i foglietti germinali embrionali. Le cellule del bottone cellulare interno sono la fonte dalla quale generalmente derivano cellule staminali embrionali pluripotenti di topo, di primati non umani e di uomo, sebbene sia evidente che le cellule staminali embrionali di topo possano essere più strettamente correlate all'ectoderma primitivo (Evans e coll., 1981; Martin, 1981; Thomson e coll., 1995; Brook e coll., 1997).

Amit e coll. (2000) hanno dimostrato, inoltre, la notevole longevità in vitro di questo tipo cellulare che, dopo 8 mesi di coltura, continuava ad esprimere tutte le caratteristiche proprie delle cellule staminali e cioè la pluripotenzialità, le capacità di proliferare illimitatamente e di automantenersi.

Tuttavia recenti studi, hanno messo in evidenza le molte difficoltà legate ad un eventuale indiscriminato utilizzo terapeutico di queste cellule. Infatti, cellule staminali embrionali di topo trapiantate nel sottocute e nel ginocchio di topi immunodepressi (SCID), a distanza di 4 settimane dagli innesti, in entrambe le sedi dei trapianti hanno sviluppato tumori identificati

dagli autori come teratomi (fig. 1 e 2), (Amit e coll., 2000; Odorico e coll., 2001; Wakitani e coll., 2003).

Da quanto ora esposto diviene facile da una parte intuire le enormi potenzialità terapeutiche di un tale tipo di approccio, dall'altra, però, emergono anche le numerose difficoltà legate all'utilizzo ed alla "maneggevolezza" delle cellule staminali embrionali. Allo stato attuale, si rende dunque evidente la necessità di ulteriori studi atti a migliorare le conoscenze sulla possibilità di regolare ed indirizzare il differenziamento di questo interessantissimo tipo cellulare.



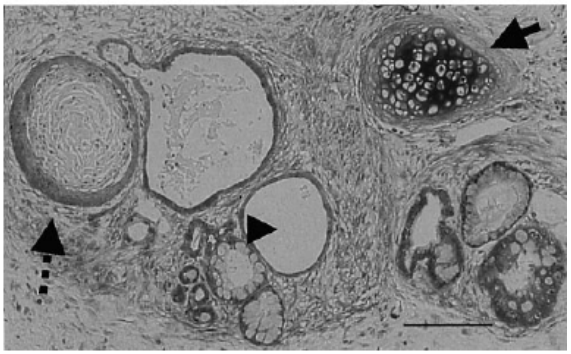


Figura 1. Teratomi formati nell'articolazione di ginocchio e nel sottocute di topi SCID in seguito ad impianto ES umane. (In alto) Teratoma in articolazione di ginocchio contenente tre masse cartilaginee (frecce), 4 sett. dopo l'impianto. Colorazione blu di toluidina; bar = 1 mm. (In mezzo) Ampio tumore (frecce) che ha distrutto la struttura del ginocchio, 8 settimane dopo l'impianto. Colorazione ematossilina-eosina; bar = 1 mm. (In basso) Teratoma costituito da tessuti derivati dall'ectoderma (cute), dal mesoderma (cartlagine) e dall'endoderma (epitelio ghiandolare), 4 sett. dopo l'impianto sottocutaneo. Colorazione blu di toluidina; bar = 100 µm. La freccia tratteggiata indica la cute, la testa di freccia l'epitelio ghiandolare mentre la freccia intera la cartilagine. (Wakitani e coll.,(2003): Rheumat.; 42:162-165)

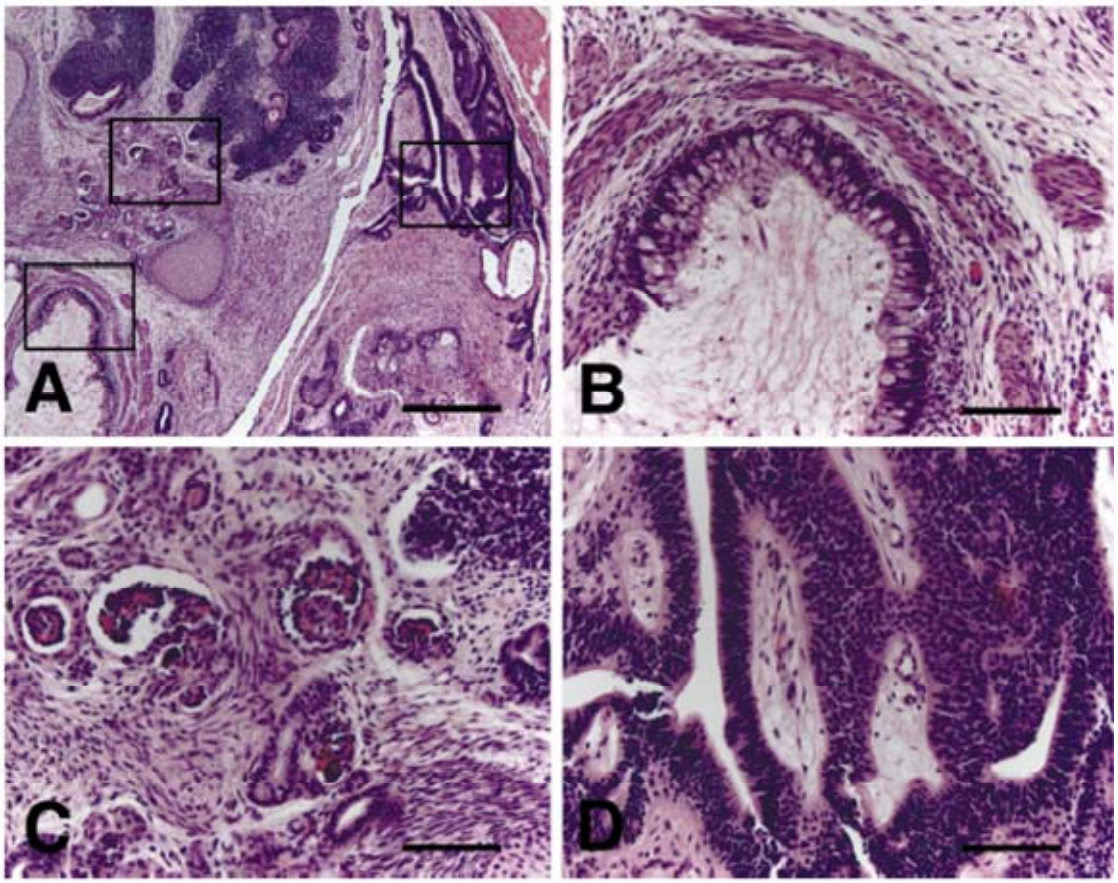


Figura 2. Teratomi formati a partire da cellule embrionali staminali umane linea H9.1. Approssimativamente 5 x 106 cellule H9.1 coltivate per 6 mesi sono state iniettate nella muscolatura della zampa di un topo SCID. Il tumore risultante è stato asportato ed analizzato 3 mesi dopo l'impianto. (A) Visione a basso ingrandimento di un campo microscopico in cui si evidenzia la presenza di elementi provenienti da tutti e tre i foglietti germinali. Le aree circoscritte dai quadranti sono ingrandite nelle figure B, C e D (bar, 500 µm). (B) Epitelio intestinale con adiacente muscolatura liscia (bar, 100 µm). (C) Glomeruli e tubuli renali embrionali (bar, 100 µm). (D) Epitelio neurale (bar, 100 µm). (Da: Amit e coll., (2000) Develop. Biol. 227, 271-278.)

CELLULE STROMALI DI MIDOLLO OSSEO (CELLULE STAMINALI ADULTE)

Le cellule staminali stromali midollari multipotenti sono conosciute sin dal 1968 grazie alle ricerche di Friedestein e collaboratori, i quali trovarono che cellule aderenti, clonogeniche, non-fagocitiche e fibroblastiche nell'aspetto, definite come unità fibroblastiche formanti colonie (CFU-F), potevano essere isolate anche dopo la nascita dallo stroma del midollo osseo. Come osservato da questi ricercatori, le CFU-F danno origine, sotto appropriate condizioni sperimentali, ad un ampio spettro di tessuti connettivali completamente differenziati, tra cui cartilagine, osso, tessuto adiposo, tessuto fibroso e stroma di supporto per la mielopoiesi.

Friedenstein (1968), Owen (1988) ed altri autori, hanno anche definito che le cellule stromali sono elementi che persistono nel midollo osseo post-natale e nell'organismo adulto. Tuttavia, notevoli differenze sono state osservate tra singole CFU-F, variando la morfologia cellulare ed il tasso di proliferazione, come pure la capacità di formare strutture multistrato o nodulari. L'espressione dei vari markers dei fenotipi osteoblastico, condrogenico e adipogenico è funzione variabile del tempo di coltura, non solo delle differenti famiglie cellulari, ma anche degli elementi di una stessa famiglia. Inoltre, per quanto riguarda il trapianto, alcune CFU-F formano osso, tessuto di supporto per l'emopoiesi e tessuto adiposo, altre solo osso, altre ancora soltanto tessuto connettivo.

Identità e origine delle cellule stromali midollari

Nell'organismo post-natale, cellule stromali midollari risiedono sulla superfice extraluminale dei sinusoidi midollari e formando un network cellulare tridimensionale rivestono la sottostante rete di sinusoidi. Questi due network si originano rispettivamente dalle diramazioni di arteriole midollari terminali e dallo strato avventiziale.

Le cellule reticolari avventiziali sono elementi critici di supporto per la mielopoiesi che possono sia trasformarsi direttamente in adipociti che generare osteoblasti in vivo. Esse rappresentano il più probabile termine di correlazione in vivo alle CFU-F, sebbene le proprietà clonogeniche di intere popolazioni stromali, così come osservato in vivo, non possono essere facilmente investigate.

Cellule stromali midollari si stabiliscono in una cavità midollare in sviluppo dopo la formazione di un colletto osseo all'esterno dell'abbozzo, prima che inizi l'emopoiesi. Paradossalmente, il tessuto nel quale risiedono i precursori osteogenici si forma ed inizia a funzionare dopo la comparsa di osteoblasti pienamente differenziati. Il colletto osseo primitivo formato da questi osteoblasti viene eroso dagli osteoclasti permettendo così l'invasione vascolare e la formazione di una cavità midollare. L'invasione vascolare trasporta le cellule osteogeniche, che si sono precedentemente differenziate nel periostio, nella cavità midollare come cellule perivascolari. Lo sviluppo

dei sinusoidi (caratterizzati da un lento flusso ematico e da una parete endoteliale permeabile) permette, poi, la diffusione nell'ambiente extravascolare di cellule staminali emopoietiche (HSC) che formano le cellule ematiche, le quali poi interagiscono con il primitivo microambiente stromale. Questa interazione permette all'emopoiesi di aver luogo e sembra essere capace di arrestare simultaneamente l'ulteriore differenziamento osteogenico delle cellule stromali primitive, permettendo così che si sviluppi uno spazio midollare in quello che altrimenti sarebbe dovuto essere osso compatto. In ultimo, un network continuo di cellule si forma all'interno dello spazio midollare. Esso si estende dalla superficie extraluminale dei vasi ematici alla superficie ossea attraverso le cellule stromali interposte tra le cellule emopoietiche. Questo spiega la continuità fisica e biologica dell'osso e del midollo, che insieme formano un unico organo: l'organo osso-midollo osseo.

Nel primitivo midollo non-emopoietico, le cellule stromali, che appaiono molto simili ai preosteoblasti, si dividono attivamente, mentre cellule stromali del midollo ematopoieticamente attivo sono mitoticamente quiescenti pur continuando ad esprimere elevati livelli di fosfatasi alcalina, marker specifico osteoblastico. La formazione della cavità e dello stroma midollare richiede un fattore di trascrizione cardine, il cbfa 1, che controlla il differenziamento osteogenico e guida la formazione di osso. Nel corso dell'accrescimento, la comparsa fisica di cellule stromali midollari si verifica dopo la comparsa di osso e cellule osteogeniche, nonchè dopo un controllo

trascrizionale di rilievo (fig. 3). In organismi post-natali, il cbfa 1 è comunemente e costantemente espresso nei cloni e nelle linee non trasformate di cellule staminali stromali umane o murine ma non si prevede una sua attuale capacità osteogenica nel trapianto in vivo. L'espressione del cbfa 1 in alcune di queste famiglie cellulari non previene la differenziazione verso fenotipi non-osteoblastici, come adipociti e condrociti. Queste osservazioni suggeriscono che il commissionamento osteogenico diretto dal cbfa 1 avviene a monte dell'ontogenesi delle cellule stromali midollari le quali sono precursori post-natali di cellule osteogeniche. Queste cellule mantengono l'espressione del cbfa 1, probabilmente come eredità della loro origine osteogenica, ma restano capaci di entrare in pathways di differenziamento multiplo e non sono commissionate verso un destino osteogenico obbligato. Il cbfa 1 è visto come un gene chiave per il commisionamento in senso osteogenico, mentre le cellule stromali midollari sono reversibilmente commissionate e multipotenti.

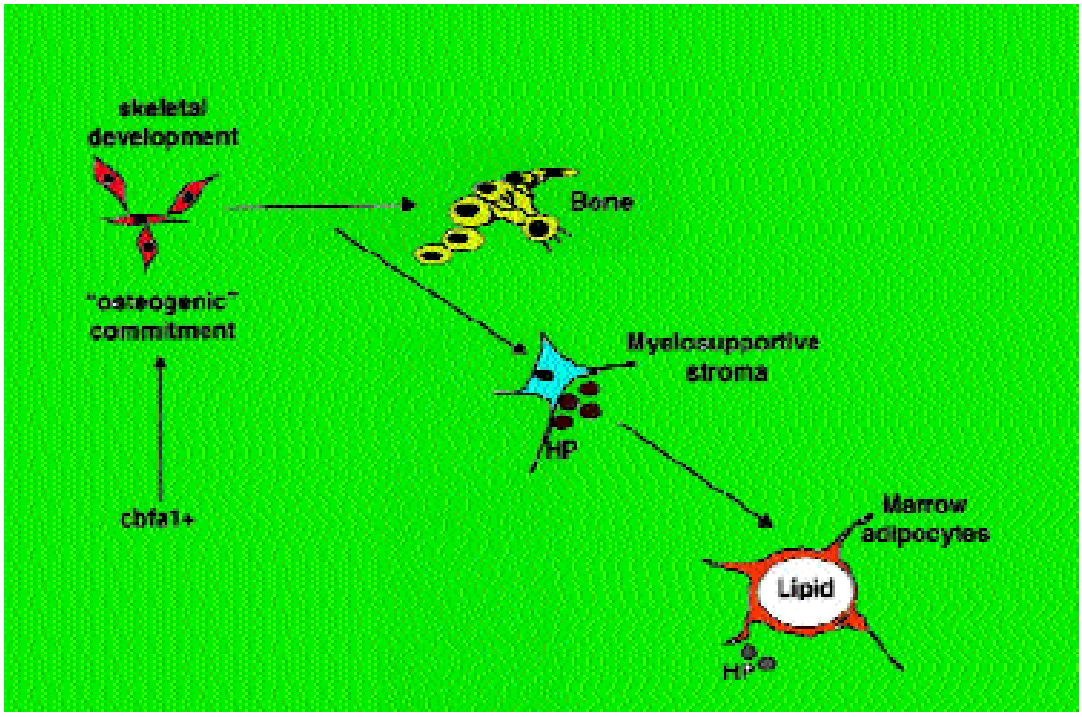


Figura 3. Durante lo sviluppo, le cellule progenitrici vengono commissionate verso la scheletogenesi sotto l'induzione di un fattore di trascrizione osteogenico critico, il **cbfa 1**. L'iniziale fenotipo espresso da queste cellule è quello di osteoblasti completamente maturi. Successivamente,quando si forma una quantità soglia di osso, queste cellule formano lo stroma primitivo del midollo osseo che fa da supporto all'emopoiesi. A questo punto durante il periodo post-natale, quando l'emopoiesi è sufficiente alcune di queste cellule cambiano ancora il loro fenotipo, divenendo adipociti midollari. Le cellule di questi tre fenotipi specifici (osteoblasti, cellule mielosupportive e adipociti) formano un continuo network che si estende da un capo all'altro nell'organo osso-midollo osseo, conservando l'espressione di **cbfa 1**. Queste cellule differenziate sono capaci di passare da un fenotipo all'altro, in relazione allo stato metabolico dell'organismo.

Rinnovamento contro plasticità: tessuti, progenitori, molecole.

Cellule differenziate post-embrionali o post-natali all'interno del sistema stromale possono, in verità, adottare sia *in vitro* che *in vivo* fenotipi alternativi di altre cellule all'interno di questo sistema. Ad es. dal midollo postnatale di coniglio possono essere riconvertite verso un fenotipo pienamente osteogenico, cambiando le caratteristiche del siero (Bennet e coll., 1991). Sospensioni di condrociti ipertrofici di pollo differenziati in vitro virano verso un destino fibroblastico e osteoblastico quando vengono fatte aderire ad un appropriato substrato (Gentili e coll., 1993). Nei roditori si sono ottenute *in vivo* alcune evidenze circa il differenziamento diretto di condrociti preipertrofici verso cellule formanti osso (Riminucci e coll., 1998). *In vivo* cellule reticolari avventiziali umane differenziate, fosfatasi alcalina +, che normalmente hanno la funzione di elementi di supporto per la mielopoiesi, possono rapidamente accumulare grasso e divenire adipociti in condizioni di mielosoppressione farmacologica. Queste cellule sono perciò capaci di cambiare dinamicamente tra due distinti fenotipi "terminali" (reticolare e adipocitico) all'interno della progenie delle cellule staminali stromali. Il fenomeno ora descritto riflette la plasticità del sistema stromale del midollo osseo e lo differenzia dal sistema emopoietico, nel quale non avvengono cambiamenti fenotipici delle cellule differenziate; il commissionamento di precursori a valle delle HSC è generalmente considerato progressivo e

irreversibile. Nel sistema stromale, la plasticità dei fenotipi differenziati implica che il commissionamento e il differenziamento potrebbero non essere irreversibili, anche in cellule completamente differenziate come i condrociti ipertrofici o le cellule mielosupportive.

Un altro aspetto ben chiarito, è che cellule stromali disposte a valle di una putativa cellula staminale indifferenziata potrebbero simultaneamente differenziare e divenire multipotenti, con una notevole combinazione di caratteristiche il cui significato è stato poco apprezzato fino all'attuale esplosione di interesse per la plasticità delle cellule somatiche. La plasticità delle cellule del tessuto connettivo si estende alla loro funzione nello sviluppo e nella crescità post-natale. Queste cellule vengono rimpiazzate lentamente e per la maggior parte sono esposte a stimoli provenienti da una abbondante matrice extracellulare (ECM), che concorrono al mantenimento del fenotipo differenziato. Il rimodellamento della ECM altera i segnali che giungono alle cellule residenti e potrebbe contribuire al cambiamento nella morfologia cellulare e nei pattern d'espressione genica. Si deve inoltre tener conto che lo stroma midollare è probabilmente un tessuto connettivo singolare caratterizzato da una notevole scarsità di ECM, fatto questo che potrebbe in parte spiegare la facilità con la quale le cellule stromali possono passare da un fenotipo all'altro.

Il mesoderma è un tessuto in fase solida necessariamente plastico. La generale rilevanza fisiologica, per la crescita dell'organismo e l'integrità dei

tessuti, degli eventi che rimodellano la matrice sono stati illustrati recentemente in topi con deficit di metalloproteinasi di matrice tipo 1 (MT1-MMP-deficient), nei quali il rimodellamento del tessuto connettivo è inibito con il risultato di una ridotta degradazione della matrice che conduce a cambiamenti sfavorevoli generalizzati all'interno dei tessuti mesodermici (Holmbeck e coll., 1999). Durante l'accrescimento d'organo, il rimodellamento coordinato e l'adattamento dei tessuti confinanti (per esempio, osso/tendini, osso/legamenti, osso/cartilagine, tendini/mu-scolo) richiedono che i limiti fisici tra i differenti tessuti siano capaci di modificarsi spazialmente. La plasticità e la multipotenzialità di cellule residenti nei tessuti mesodermici possono essere proprietà tanto fondamentali per il tessuto connettivo ed i suoi progenitori quanto lo è l'autorinnovamento per il sangue e l'HSC (tabella 1). L'autorinnovamento e i pattern di replicazione cellulare e di differenziamento associati, devono essere sviluppati per offrire la necessità di rimpiazzare cellule non-aderenti a breve sopravvivenza in un organismo a lungo-vivente, mentre la flessibilità fenotipica e la flessibilità nel controllo trascrizionale, durante il differenziamento, permettono l'adattamento tissutale.

Diversi studi hanno recentemente risvegliato interesse verso un differente campo della plasticità biologica, che è attribuito alle cellule staminali associate a vari tessuti. Alcuni di questi studi hanno dimostrato che cellule somatiche (staminali) post-natali possono dare origine a tessuti normalmente originati dai differenti foglietti embrionali. Per esempio, è stato

riportato che cellule stromali midollari trapiantate nel cervello possono acquisire un destino neurale (Azizi e coll., 1998) e che cellule staminali neurali o muscolari possono dare origine a cellule ematiche (Ornson e coll., 1998)

"Cellule staminali", apparentemente, permettono straordinarie per non dire miracolose trasformazioni : dell' osso in cervello, del cervello in muscolo o in sangue. Se confermate, queste scoperte indicherebbero che cellule somatiche con un range di differenti capacità differenziative simili a quelle delle cellule staminali embrionali persistono nell'organismo post-natale in siti non correlati allo sviluppo multiplo, includendo lo stroma del midollo osseo. Ovviamente, il sangue di norma non si forma nel cervello o nel muscolo, né tantomeno il tessuto nervoso dallo stroma midollare. Così come è improbabile che alcuni di questi potenziali di differenziamento non ortodossi o inaspettati potrebbero essere applicati per scopi clinici. Tuttavia queste scoperte che sollevano affascinanti domande richiedono un rigoroso studio dei pathways di sviluppo per mezzo dei quali ipotetiche cellule staminali totipotenti somatiche potrebbero essere ottenute e mantenute attraverso lo sviluppo e la crescita post-natale. A tutt' oggi, un tale modello non è conosciuto e i modelli prevalenti nella biologia dello sviluppo considerano solo l'esistenza nei tessuti in accrescimento di progenitori locali commissionati. Una chiara definizione dei meccanismi con i quali cellule staminali somatiche si originano e sono mantenute, aiuterebbe a capire le loro caratteristiche

biologiche distintive e, in ultima analisi, i loro possibili usi clinici e svelerebbero indubbiamente nuovi aspetti dello sviluppo pre e post-natale. Le cellule stromali midollari e le loro proprietà plastiche possono rappresentare un caso speciale in un più esteso sistema di cellule staminali somatiche. Se così fosse, le loro proprietà fornirebbero, intuizioni, di rilevanza generale. Le cellule stromali midollari (un tipo cellulare che mostra impressionante plasticità) sono, infatti, cellule perivascolari, molto simili ai periciti della retina, cellule perivascolari all'interno del sistema nervoso centrale. Doherty e coll. (1998) hanno dimostrato che i periciti retinici bovini sono in grado di dare origine in vitro a cartilagine ed osso. Cellule embrionali ricavate dall' aorta possono dare origine a cellule satellite e muscolari scheletriche (De Angelis e coll., 1999). E' stato inoltre stabilito che, nei tessuti adulti, i distretti microvascolari possono rappresentare nicchie specifiche dove sono contenuti i progenitori multipotenti (Bianco e Cossu, 1999). Mentre si sta tentando di dare una spiegazione alla presenza di cellule staminali post-natali in una varietà di diversi tessuti ed organi, stessa ipotesi collega questa inaspettata comune proprietà ad un semplice motivo strutturale comune a tutti i tessuti: l'esistenza di una vascolarizzazione e la capacità di accrescimento durante la crescita corporea.

Per confermare questa ipotesi sono tuttavia necessari ulteriori lavori sperimentali che puntano sulla questione se il motivo comune dei progenitori somatici post-natali è il sistema vascolare e se il potenziale di

differenziamento embriogenico, come il potenziale per l'angiogenesi, sia presente in esse allo stato quiescente.

Cellule staminali stromali midollari e le patologie scheletriche

Una logica conseguenza del principio secondo il quale un osso in miniatura normale può formarsi a partire da cellule staminali stromali, sarebbe rappresentata dal fatto che queste stesse cellule, con difetti genetici intrinseci, formerebbero miniature di ossa patologiche. Questo principio è stato originalmente applicato alla fibrodisplasia ossea dell'uomo (Bianco e coll., 1998), un disturbo in cui mutazioni somatiche del gene GNAS1 provocano severe lesioni scheletriche. Esso è stato poi esteso alle anormalità scheletriche osservate in topi con una riconosciuta mutazione null del gene MT1-MMP (Holmbeck e coll., 1999). In entrambi i casi, trapiantando famiglie di cellule stromali mutate, si sono ottenuti ossicini patologici con anormalità fenotipiche che riflettevano direttamente le mutazioni osservate rispetto agli organismi sani. Usando saggi di trapianto in vivo, possono, in questo modo, essere selezionate patologie o mutazioni scheletriche dovute alla disfunzione intrinseca delle cellule osteogeniche. Le cellule staminali stromali midollari e la loro progenie in tal modo appaiono come elementi di patologie scheletriche. Questo approccio fornisce un utile mezzo per creare modelli animali di patologie scheletriche e conferma l'uso delle cellule

stromali in vitro per analizzare la fisiopatologia del tessuto scheletrico. Per esempio, la possibilità di trapiantare cellule progenitrici in topi permette lo sviluppo di un modello di fibrodisplasia e mostra che la formazione di lesioni tissutali dipende dal mosaicismo somatico (Bianco e coll. 1998).

Il riconoscimento dell'ampia crescita, e del potenziale di differenziamento delle cellule stromali midollari e della facilità con la quale esse possono essere ottenute ed espanse nel numero, ha aperto la porta alle ultime tre classi di applicazioni cliniche, ciascuna delle quali con benefici e problemi connessi. Probabilmente l'utilizzo molto precoce del potenziale osteogenico di cellule stromali midollari favorisce la ricostruzione localizzata di difetti scheletrici. Il vantaggio prodotto rispetto alle metodiche alternative esistenti (come ad esempio, l'uso di midollo precoce o di biomateriali), consiste nella teorica completa compatibilità biologica di un dispositivo protesico costituito interamente da sole cellule, che permetterebbe di superare le abituali limitazioni rappresentate dalla grandezza e dalla forma dei difetti da riparare. Secondariamente, cellule stromali midollari possono essere usate per la terapia genica, una sfida ancora più difficile, dal momento che cellule stromali umane non possono essere trasdotte con un' alta efficienza per generare il numero richiesto di cellule ingegnerizzate. Inoltre, in queste cellule appare problematica la corretta regolazione dell'espressione di un dato gene e i transgeni, che sono espressi con successo in linee cellulari standard, continue o immortalizzate, non possono essere impiegati direttamente per

modelli in vitro che usano cellule umane, autorizzati solo per applicazioni cliniche. In fine, probabilmente l'uso più ambizioso per queste cellule dovrebbe essere la ricostruzione in parte o di tutto il sistema scheletrico per la cura di patologie sistemiche dell'osso.

CAMPI ELETTROMAGNETICI PULSATI (CEMP)

La stimolazione elettrica e magnetica della osteogenesi riconosce le sue origini scientifiche negli studi ormai classici condotti prima da Fukada e Yasuda (1957) e quindi da Basset e Becker (1962). Tali studi hanno messo in evidenza il rapporto fra tessuto osseo e potenziali elettrici. L'osso infatti genera due tipi di segnale elettrico: uno in risposta alla deformazione meccanica e l'altro a riposo in assenza di deformazione. Tali osservazioni hanno suscitato grande interesse circa la possibilità di intervenire attivamente, con campi elettrici e magnetici esogeni, sulla attività metabolica cellulare dell'osso, in particolare sugli osteoblasti. Nell'uomo la stimolazione elettrica e magnetica è stata studiata al fine di aumentare la capacità riparativa spontanea del tessuto osseo, ovvero di riattivarla in condizioni patologiche quali i ritardi di consolidazione e le pseudoartrosi. Le metodiche di stimolazione elettrica e magnetica dell'osteogenesi attualmente sviluppate sono tre:

1) correnti elettriche continue e direttamente applicate al tessuto osseo mediante elettrodi impiantati (**sistemi faradici**);
2) correnti elettriche alternate indotte dall'esterno mediante campi elettromagnetici pulsati (CEMP) nel tessuto osseo (**sistemi induttivi**);
3) correnti elettriche alternate indotte dall'esterno mediante campi elettrici puri (**sistemi capacitivi**).

Mentre i sistemi faradici richiedono un intervento chirurgico, seppur minimo, per posizionare gli elettrodi che rilasciano la corrente nella sede di frattura, i sistemi induttivi e capacitivi sono assolutamente non cruenti. In particolare, i sistemi induttivi non richiedono il contatto fisico tra applicatore e tessuto.

L'attività biologica dei CEMP si può esplicare sia tramite la componente magnetica variante nel tempo che tramite la componente elettrica, ovvero il campo elettrico indotto. Esperimenti condotti *in vitro* hanno dimostrato che l'esposizione ai CEMP favorisce la proliferazione sia di elementi del sistema immune che di osteoblasti umani ed infine è in grado di favorire la neoangiogenesi in colture di cellule endoteliali. *In vivo* si è osservato un aumento della formazione di tessuto osseo ed un accorciamento del tempo di consolidazione di fratture e/o lesioni ossee sperimentali. Indagini attuate con l'impiego di tecniche di marcatura con tetraciclina del tessuto osseo neoformato, hanno potuto dimostrare che, *in vivo* a seguito dell'esposizione a CEMP, la attività osteoblastica raddoppia la sua capacità di deporre tessuto osseo, ovvero di formare trabecole.

Le applicazioni ortopediche dei CEMP, fino ad oggi testate, sono rappresentate dalle psedoartrosi congenite ed acquisite, dai ritardi di consolidamento, dalle fratture recenti, dall'osteointegrazione di innesti ossei, dalla necrosi avascolare della testa del femore, dalla prevenzione o limitazione della degenerazione della cartilagine articolare e dalla prevenzione dell'osteoporosi.

Meccanismo d'azione dei CEMP a livello cellulare

Gli effetti dei campi elettromagnetici sono riconducibili principalmente all'interazione dei CEMP con la membrana cellulare ed in particolare alle modalità di traduzione all'interno della cellula dei segnali presenti sulla superficie della cellula stessa (Fig. 4).

Lo stimolo biofisico è in grado di intervenire sul trasporto del Ca^{++} attraverso la membrana che conduce ad una variazione della concentrazione del Ca^{++} intracellulare.

Gli effetti dei campi elettrici sul trasporto del Ca^{++} attraverso la membrana cellulare sono noti da tempo. Essi sono stati descritti per la prima volta da Gerber nel 1978. I CEMP determinano un aumento dell'influsso di Ca^{++} con una conseguente attivazione in senso proliferativo della cellula. Una volta che la cellula è stata attivata, per la progressione attraverso il ciclo cellulare assume particolare rilevanza la produzione di fattori di crescita e l'espressione sulla superficie della membrana di recettori specifici. E' stato dimostrato che l'esposizione ai CEMP aumenta il numero dei recettori per la IL-2 (Interleuchina-2) ed il suo utilizzo da parte della cellula. Parimenti la sintesi di IL-1 e IL-6 sono aumentate in conseguenza della esposizione al campo elettromagnetico (Cadessi R., 1999).

Nell'osteogenesi riparativa i CEMP sono capaci di accelerare gli eventi della fase infiammatoria tramite un aumento dei fattori di crescita quali il

TGF-β1 (Trasforming Growth Factor- β1) e l'IL-6 (Interleuchina-6), una riduzione della citochina infiammatoria TNF-α (Tumor Necrosis Factor- α) ed un aumento dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina e della fosfatasi acida resistente al tartrato. Tali attività, in associazione con l'aumento del turn-over cellulare indotto sugli osteoblasti dai campi elettromagnetici, determinano una più rapida ed abbondante deposizione d'osso nei siti di lesione (Canè V., 1993).

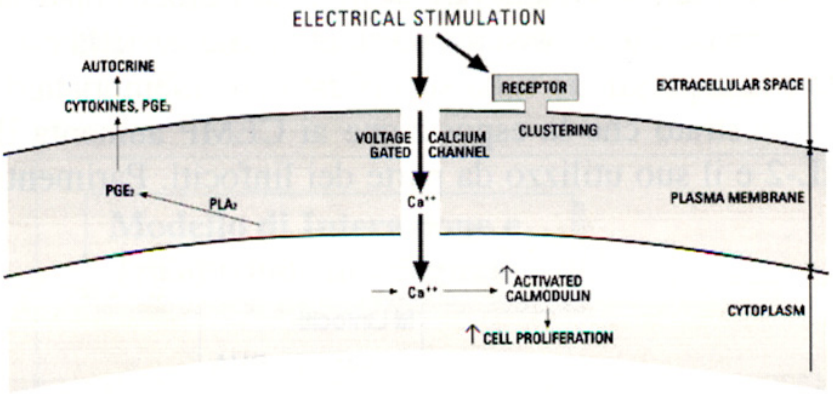


Fig. 4. Vie biochimiche che mediano la risposta cellulare allo stimolo elettromagnetico (modificato da Brighton C.T., 1998)

OBIETTIVI

Con questo studio ci siamo proposti di studiare gli effetti dei Campi Elettro-Magnetici Pulsati (CEMP) sulle cellule stromali di midollo osseo umano (BMSC), coltivate in mezzo standard.

Per tale motivo abbiamo valutato la capacità dei CEMP nell'indurre il differenziamento in senso ostogenico delle BMSC e nel ridurre i tempi di differenziamento delle cellule stromali coltivate in mezzi specifici per il differenziamento *in vitro* in senso osseo che, secondo quanto riportato in letteratura (Banfi A., Cancedda R., Quarto R., et al. Exp. Hemat.28: 707-715; 2000) sono di due settimane.

MATERIALI E METODI

Colture di BMSC

Cellule stromali (BMSC) sono state ottenute da aspirati midollari da cresta iliaca provenienti da donatori sani forniti dal Centro di Biotecnologie Avanzate dell'Ospedale San Martino di Genova. Il l'età dei donatori era compresa tra 5 mesi e 30 anni; tutti i donatori erano di razza bianca caucasica. Un consenso informato è stato firmato da tutti i donatori, e tutte le procedure sono state approvate dal comitato etico. Il midollo osseo così ottenuto è stato lavato due volte con soluzione tampone fosfato (PBS) pH 7.4 e le cellule nucleate sono state contate attraverso colorazione nucleare (0.1 % di metil violetto in acido citrico 0.1 M). Le colture di BMSC sono state allestite su piastre di Petri, e mantenute a 37° in atmosfera umidificata al 5% di CO2. Il mezzo di coltura utilizzato era il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplementato con siero fetale bovino al 10 % e 1 ng/ml di basic Fibroblast growth Factor (b-FGF ricombinante umano) (Sigma Chemicals, Milano, Italia). Il mezzo è stato cambiato per la prima volta due giorni dopo l'iniziale semina e successivamente due volte a settimana. Dopo due settimane, è stato determinato il numero di CFU-F. Le colture confluenti sono state separate con 0,05% tripsina –0,01% EDTA (Sigma, St Louse, Mo). Le cellule così ottenute sono state poi in parte ripiastrate per gli esperimenti di differenziamento *in vitro* in senso osteogenico tramite l'utilizzo di mezzi di differenziamento standard (Banfi A., Cancedda R., Quarto R., et al. Exp.

Hemat.28: 707-715; 2000) ed in parte inviate presso il nostro laboratorio. Tutte le BMSC inviateci, sono state ripiastrate su piastre di Petri alla concentrazione di $5x10^5$ cellule per ciascuna piastra. Quando veniva raggiunta la subconfluenza ciascuna piastra veniva divisa in un rapporto di 1:3. A questo punto le cellule sono state di nuovo staccate, lavate, contate ed analizzate per la determinazione del potenziale di differenziamento in senso osseo sotto l'effetto di campi elettro-magnetici pulsati (CEMP).

Differenziamento *in vitro* sotto l'azione dei CEMP

Tutte le piastre sono state mantenute in coltura a 37°C e 5% di CO_2 in incubatore all'interno del quale sono stati applicati 2 solenoidi disposti in parallelo tra di loro, collegati tramite un foro passante ad un apparecchio esterno capace di produrre un segnale elettro-magnetico del tipo onda quadra con una frequenza di 75 Hz ed un'intensità di 18-30 Gauss (Biostim, IGEA, Carpi-Italia). Tutte le piastre sono state sottoposte a cicli di stimolazione di otto ore al giorno per un massimo di quattordici giorni. Il terreno di coltura utilizzato durante il periodo di stimolazione era privo di b-FGF.

Il differenziamento in senso osteogenico è stato testato a 3, 7, 10 e 14 giorni di stimolazione valutando i seguenti parametri di differenziamento. Alcune piastre sono state utilizzate per l'estrazione dell' RNA e per l'analisi RT-PCR (reazione polimerasica a catena con trascrittasi inversa) al fine di valutare l'espressione del gene per l'osteocalcina (OC). La presenza di

depositi di calcio è stata messa in evidenza attraverso colorazione tipo rosso di alizarina. L'attività dell'enzima fosfatasi alcalina è stata saggiata tramite l'utilizzo di un kit di determinazione specifico (Boerhinger) seguendo le istruzioni del produttore.

Dati dell' RT-PCR semiquantitativa

L'RNA totale è stato estratto dalle BMSC utilizzando isotiocinato di guanidina secondo la procedura descritta da Chomczyscki e Sacchi (1987). L'esame RT-PCR semiquantitativo è stato eseguito attraverso l'utilizzo del kit GeneAmp RNA PCR fornito della Perkin Elmer. Per ciascun campione di RNA, è stata svolta una reazione RT principale con 2 mg dell' RNA totale posti in 40 ml di una miscela contenente un 1x di tampone per PCR, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM ciascuno di dATP, dGTP, dTTP, 1 U/ml di inibitore dell'RNAasi in 250 pmol di esameri primers random e 2,5 U/ml di MuLVRT.

Il tempo di reazione è stato di 1 ora a 42° C. Ciascun master cDNA prodotto è stato diviso in due parti uguali che sono state poi usate per l'amplificazione con PCR o del gene costitutivo gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH) (house keeping genes) o del gene specifico osteocalcina (oc). La reazione PCR è stata eseguita in 100-ml di una miscela contenenti 1x di tampone per PCR, 2 mM $MgCl_2$, 1mM ciascuno di dCTP,

dATP, dGTP e dTTP, 30 Pmol di 5^{I} e 3^{I} di primers specifici, e 2,5 U di amplitaq DNA polimerasi. Le sequenze primer per tutti i suddetti geni erano le seguenti:

GAPDH:

5^{1}-ACCACAGTCCAT-GCCATCAC-3^{1} e

5^{1}-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3^{1};

OC:

5^{1}-CATGAGAGCCCTCACA-3^{1} e 5^{1}-AGAGCGACACCCTAGAC-3^{1}.

Le dimensioni del prodotto atteso sono state di 450 bp per **GAPDH**, e di 195 bp (3 gg.), 215 bp (7 gg.), 295 bp (10 gg.) e 310 bp (14 gg.)per **OC**. Il numero dei cicli usati è stato nel range lineare di amplificazione per il prodotto gene-specifico. I profili di reazione usati erano i seguenti, tutti preceduti da una prima fase di denaturazione a 95° per 4 minuti; **GAPDH**: 95°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto, per 24 cicli; **OC**: 95°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto, per 30 cicli. Tutte le reazioni PCR sono terminate con un' incubazione di 7 minuti a 72°. I prodotti RT-PCR sono stati analizzati attraverso l' elettroforesi di un' aliquota di 20-mL immessa in un gel all'1% d'agarosio e visualizzati tramite l'uso di etidio bromide. L'intensità delle singole bande è stata quantificata attraverso l'analisi delle immagini fatta utilizzando il software di pubblico dominio NIH 1.60. La quantità di prodotto PCR per ogni singolo gene è stata normalizzata in accordo con il corrispettivo prodotto PCR del GAPDH.

Colorazione con rosso di Alizarina

L'osteogenesi è stata quantificata con la colorazione con alizarina S eseguita secondo il seguente protocollo. Dopo aver aspirato il mezzo di coltura da ciascuna piastra, si è proceduto a lavaggio con PBS 1x e fissazione con formalina al 4% per 10 minuti. Le piastre così preparate sono state poi lavate abbondantemente con acqua deionizzata e colorate con rosso di alizarina per 10 minuti. Successivamente, dopo aver aspirato il colorante in eccesso, si è proceduto a lavaggi con etanolo assoluto prima e acqua deionizzata, poi.

Le immagini delle piastre colorati sono state acquisite con una fotocamera digitale SAMSUNG Digimax A 400 ed analizzate con il software di pubblico dominio NIH-Image 1,60.

Saggio dell'attività fosfatasica

L'attività della fosfatasi alcalina (AlP) é stata misurata in lisati cellulari ed é utilizzata come marker di differenziamento cellulare in senso osteoblastico. Ai tempi stabiliti (giorni 3, 7, 10 e 14 di stimolazione) colture cellulari in duplicato sono state lavate con soluzione Phosphate Buffered Saline (PBS pH 7.4) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) fredda, raccolte in 2mM Tris HCl/50mM mannitolo (pH7.2) (volume finale 1 mL), sonicate in

ghiaccio e utilizzate per le misure (5 e 10 μL). L'attività fosfatasica é stata misurata attraverso la determinazione cinetica dell'idrolisi del p-nitrofenilfosfato utilizzando un kit commerciale (Boerhinger). I risultati sono espressi in milliunità per mg di proteina. La determinazione delle proteine totali é stata effettuata attraverso il metodo Bradford.

RISULTATI

Il differenziamento cellulare è stato indotto nel modo descritto nella sezione "materiali e metodi". La colorazione con rosso di alizarina delle piastre di coltura ha messo in evidenza la presenza di depositi di calcio nella matrice extracellulare sin dai primi tre giorni di stimolazione (fig. 5 A). Tale positività è andata crescendo con l'aumentare del tempo di stimolazione (fig. 5 B, C, e D)così come mostrato in figura 6 dove a 10 e 14 giorni le piastre risultano fortemente colorate.

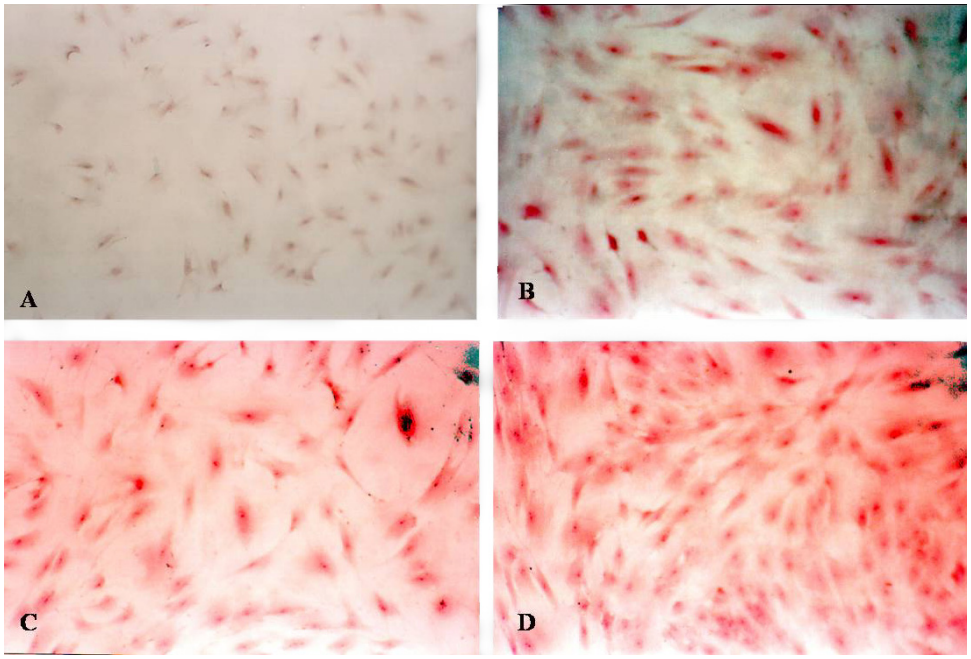


Fig. 5. *Colorazione con rosso di Alizarina.*

Le immagini delle piastre colorate sono state acquisite con microscopio Leitz Orthoplan a 3 (pannello A), 7 (pannello B), 10 (pannello C) e 14 (pannello D) giorni di stimolazione con CEMP.(Ingrandimento: A 40x; B, C e D 100x)

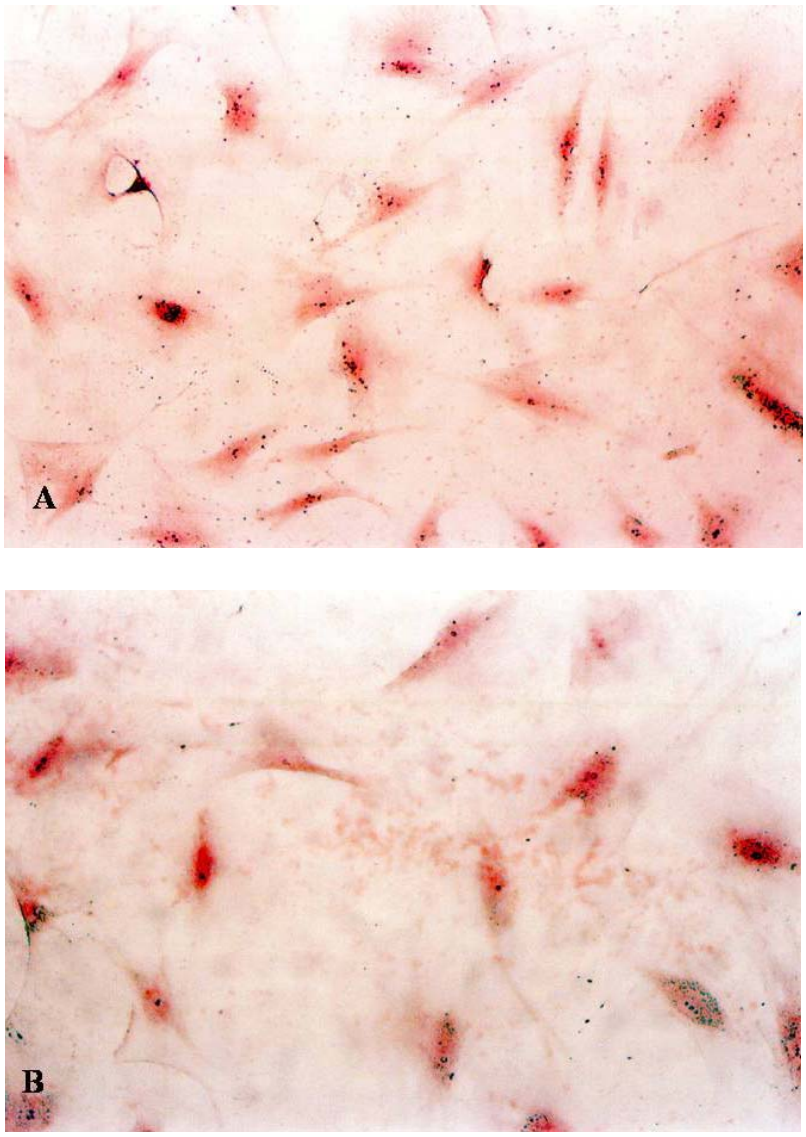


Fig. 6. *Colorazione con rosso di Alizarina.*

Particolare a più forte ingrandimento delle piastre a 10 (pannello A) e 14 (pannello B) giorni di stimolazione con CEMP.

(Ingrandimento: 250x)

Il differenziamento cellulare è stato successivamente verificato con analisi RT-PCR semiquantitativa utilizzando i primers specifici per l'osteocalcina (fig. 7). Tale esame ha messo in evidenza, già a partire dai primi giorni di stimolazione, una certa, sebbene variabile, espressione basale del marker specifico studiato (Fig. 7, banda 2, 3 e 4). Il livello di osteocalcina è appena al di sopra del *background* così come da confronto con il gene house keeping gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH) (Fig. 7, banda 7).

Un'espressione significativa è rilevabile, però, a partire dal decimo giorno di stimolazione (Fig. 7, banda 5) con un'intensità di banda massima al quattordicesimo giorno (Fig. 7, banda 6).

L'espressione di tale gene è stata, inoltre, confrontata con quella ottenuta da BMSC coltivate in mezzi di differenziamento standard (Fig. 7, banda 8) (Banfi A. e coll., 2000), nelle quali una significativa manifestazione del gene è presente solo dopo quattordici giorni di stimolazione. I risultati da noi ottenuti mostrano oltre a dati a 14 giorni sovrapponibili con quelli presenti in letteratura, anche un'espressione precoce del gene già a dieci giorni, dato questo del tutto assente se si utilizzano le metodiche "standard" di stimolazione *in vitro*.

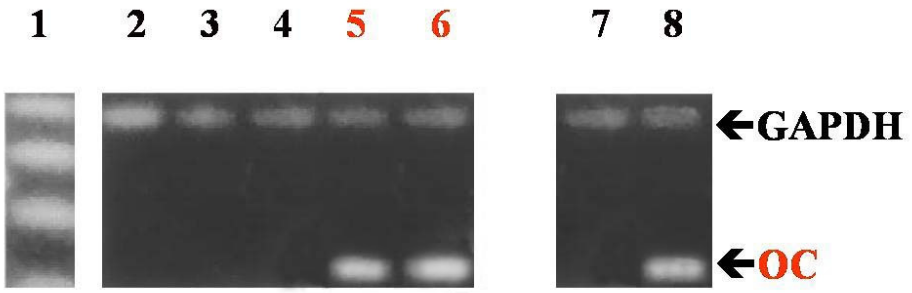


Fig. 7. *Analisi RT-PCR per l'espressione del gene per l'osteocalcina nelle BMSC.* L'RNA è stato estratto da BMSC proliferanti stimolate con campi elettromagnetici pulsati a 3 (bande 3 e 4), a 7 (banda 2), a 10 (banda 5) e a 14 giorni (banda 6) di stimolazione. L'RNA è stato anche estratto da BMSC stimolate con terreno di coltura specifico per il differenziamento in senso osteoblastico (banda 8). La banda 7 corrisponde al prodotto della GADPH. Una scala di 123 bp è stata usata come standard (banda 1).

I saggi della attività fosfatasica, utilizzato come parametro biochimico di differenziamento precoce, hanno portato a conclusioni analoghe a quelle ottenute con la RT-PCR e con la colorazione con rosso di alizarina.

La figura 8 mostra, infatti, come per le cellule stimolate con campi elettromegnetici l'attività aumenta con il progredire dei giorni di stimolazione, indicando quindi che le cellule staminali hanno avviato il loro differenziamento in senso osteoblastico.

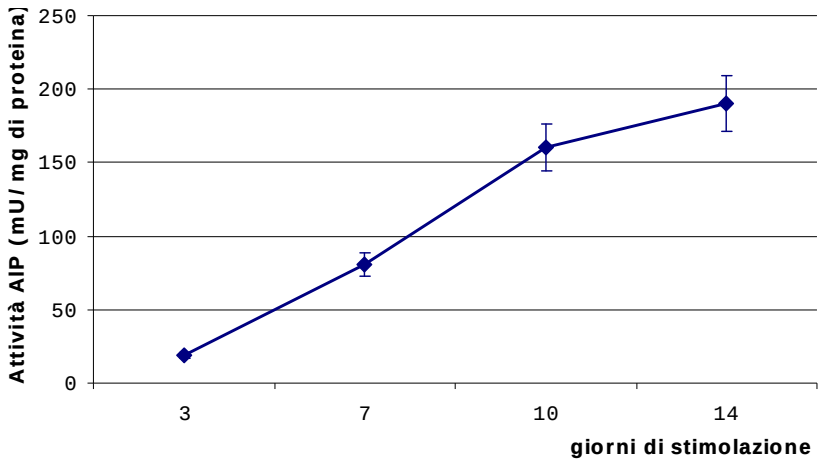


Fig. 8. *Saggio dell'attività dell'enzima fosfatasi alcalina.*

DISCUSSIONE

La capacità di auto-riparazione del sistema scheletrico è alla base della maggior parte delle procedure ortopediche di tipo ricostruttivo. Sebbene i risultati della chirurgia ortopedica in questo campo siano di solito buoni, frequentemente compaiono complicanze nel processo di riparazione scheletrica che inducono il chirurgo ad un nuovo intervento che richiede necessariamente l'uso di trapianti ossei o di materiale sostitutivo dell'osso (Bauer, 2002).

In quest'ottica, il ricorso all'ingegneria dei tessuti ed alla terapia cellulare diventa quasi un imperativo per il chirurgo ortopedico. In particolare, l'uso di cellule staminali osteogeniche e di biomateriali appropriati fornisce una possibilità terapeutica innovativa per la riparazione di lesioni e perdite di sostanza del tessuto osseo di dimensioni anche molto significative.

Il punto critico di questo tipo di approccio risiede nella possibilità di influenzare l'espressione del fenotipo delle cellule staminali verso le linee cellulari desiderate. Questo lo si è ottenuto *in vitro* stimolando in modo opportuno il viraggio fenotipico con appositi fattori di differenziamento, fattori, questi ultimi, di difficile impiego *in vivo* perché la loro produzione per fini terapeutici è molto elaborata e costosa.

Da quest'ultima osservazione nasce la necessità di ricercare una nuova via per dirigere e/o influenzare l'espressione fenotipica delle BMSC una volta impiantate nel sito della lesione. Tale via dovrebbe inoltre garantire semplicità di applicazione e bassi costi obiettivi, questi, sicuramente non trascurabili. Per tale motivo, abbiamo ritenuto opportuno sperimentare nel nostro studio la possibilità di un uso combinato di terapia cellulare e Campi Elettro-Magnetici Pulsati (CEMP).

I dati da noi ottenuti stanno ad indicare che la stimolazione con Campi Elettromagnetici Pulsati è capace non solo di indurre il differenziamento in senso osteogenico di cellule mesenchimali adulte ma anche che di ridurre i tempi di tale induzione rispetto a quelli indicati in letteratura con l'utilizzo di terreni di coltura specifici (Banfi e coll., 2000).

La stimolazione con BIOSTIM è stata condotta secondo le indicazioni date dalla casa produttrice per quanto riguarda la promozione dell'osteogenesi nelle applicazioni cliniche e cioè otto ore al giorno in maniera continuativa. All'interno dell'incubatore, le piastre sono state posizionate ad eguale distanza dai due solenoidi disposti tra di loro in parallelo e perpendicolarmente al piano d'appoggio, rispettando così il principio della "focalizzazione del segnale" in modo da mantenere costanti le caratteristiche fisiche del segnale di stimolazione.

I dati istologici, ottenuti attraverso la colorazione con rosso di alizarina, hanno messo in evidenza un'espressione precoce di depositi di calcio nella

matrice extracellulare sin dai primi giorni di stimolazione. Tale dato è confermato anche dal saggio di attività enzimatica per la fosfatasi alcalina il quale ha mostrato una discreta attività dell'enzima sin dai primi tre giorni di stimolazione.

Anche l'espressione del gene per l'osteocalcina, uno dei markers specifici per il differenziamento in senso osteoblastico insieme all'osteopontina, rilevata tramite RT-PCR semiquantitativa, risulta positiva a tre giorni di stimolazione così come da confronto con l'espressione del gene costitutivo gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH). C'è da dire, però, che un'espressione quantitativamente più significativa di tale gene si ha solo a partire dal decimo giorno di stimolazione. Tale espressione, risulta comunque del tutto sovrapponibile a quella ottenuta a 14 giorni con mezzi specifici per il differenziamento in senso osteoblastico. Tale dato sta ad indicare una capacità superiore dei CEMP ad indurre il differenziamento precoce delle cellule mesenchimali adulte rispetto alle metodiche standard di laboratorio.

Contrariamente a quanto descritto in letteratura (Bianco P., 2001; Banfi e coll., 2000) non abbiamo riscontrato nei vari passaggi in coltura una riduzione del potenziale osteogenico. E' presente, invece, un aumento dei markers di differenziamento con il prolungamento dei tempi di stimolazione.

In accordo con Bruder e coll. (1997), abbiamo riscontrato un rallentamento della proliferazione cellulare in funzione dell'aumentare dei

passaggi in coltura (dati non mostrati). Il numero di raddoppiamenti sembra ridursi notevolmente con i vari passaggi in coltura. Tale dato è, inoltre, in disaccordo con quanto affermato da Traina e coll. (1999) a riguardo della capacità dei CEMP di aumentare la capacità proliferativi degli osteoblasti.

In conclusione possiamo affermare che i dati forniti da questo studio indicano che i CEMP, oltre alle proprietà ampiamente documentate in letteratura di inibire l'osteoclastogenesi (Chang e coll., 2003 e 2004) e di modulare l'attività osteoblastica (Sollazzo V., 1996; Traina, 1999; Diniz P., 2002), risultano anche capaci di indurre il differenziamento in senso osteoblastico di cellule staminali adulte in tempi relativamente brevi rispetto alle metodiche standard di stimolazione *in vitro*.

L'utilizzo, quindi, di metodiche non invasive a supporto del differenziamento cellulare rappresenta un approccio terapeutico innovativo alla riparazione di lesioni e perdite di sostanza del tessuto osseo di dimensioni anche molto significative non riparabili o altrimenti difficilmente riparabili con le metodiche chirurgiche tradizionali. Tale metodica determina, inoltre, una riduzione dei tempi di rigenerazione con una conseguente diminuzione dei costi per paziente a carico della società.

Inoltre, è lecito ipotizzare che la stimolazione fisica indotta dai CEMP possa almeno in parte, in quelle condizioni patologiche dell'osso in cui la matrice extracellulare risulta danneggiata, "sostituirsi" a quei segnali osteogenici responsabili della formazione del microambiente favorevole al

differenziamento cellulare stimoli che, in condizioni fisiologiche, vengono apportati e/o trasdotti dalla matrice extracellulare stessa.

Risulta facile intuire le enormi prospettive terapeutiche che un approccio combinato tra terapia cellulare e terapia fisica con campi elettromagnetici può aprire. Sono comunque necessari ulteriori studi per comprendere meglio come i CEMP riescano ad influenzare la cinetica di crescita ed il potenziale di differenziamento delle cellule mesenchimali adulte e per valutare se tale differenziamento sia stabile o meno *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. Amit M, et al.: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 227: 271-278, 2000.
2. Bagnacani M., et al.: Effect of electromagnetic-field stimulation on avascular necrosis of the femoral head. In: *Electricity and Magnetism in Biology an Medicine. In Blank M. Ed. San Francisco Press,* 375-378, 1993.
3. Banfi A.,Quarto R., et al.: Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded bone marrow stromal cells: implication for their use in cell therapy. *Exp. Hemat*., 28; 707-715, 2000.
4. Basset C.A.L., Becker R.O. : Generation of electric potentials in response to mechanical stress. *Science,* 137:1063-1064; 1962.
5. Bauer T.W., Smith S.T.: Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations-Review. *Clin Orthop Relat Res.* Feb;(395):11-22; 2002.
6. Behari J.: Electrostimulation and bone fracture healing. *Biomed. Engin.,* 18:235-254; 1991.
7. Betti E., et al.: Effect of electromagnetic field stimulation on fractures of femoral neck. A prospective randomized double-blind study. *Second Word Congress for Electricity and Magnetism an in Biology and Medicine, Bologna* June 8-13,1997.
8. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G.: Bone marrow stromal stem cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem cells*, vol. 19; 3:180-192, May 2001.
9. Bigliani L.U., et al.: The use of pulsed electromagnetic field to achieve arthrodesis of the knee following failed total knee arthroplasty. *J. Bone Joint Surg.,* 65-A:480-485; 1983.

10. Black J.: Electrical stimulation. *Praeger*, New York, 1987.
11. Boyde A., Quarto R. et al: Osteoconduction in Large Macroporous Hydroxyapatite ceramic Implants: Evidence for a Complementary Integration and Disintegration Mechanism. *Bone* Vol. 24 n. 6; 579-589, 1999.
12. Brook FA, Gardner RL.: The origin and efficient derivation of embryionc stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 5709-5712, 1997.
13. Bucholz R.W.: Nonallograft osteoconductive bone graft substitute. *Clin. Orthop*. 395 :44-52, 2002.
14. Cadossi R.: Meccanismi d'azione e livello di interazione dei campi elettromagnetici pulsati. *Modulazione Biofisica della Osteogenesi mediante Campi Elettromagnetici Pulsati.* Ed. Walberti. Vol. 2: 41-47, 1999.
15. Cancedda R., Castagnola P., et al: Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *J. Dev. Biol*. 2000. 44:707-14, 2000.
16. Canè V., et al.: Pulsed magnetic fields improve osteoblast activity during the repair of an experimental osseus defect. *J. Orthop. Res.,* 11: 664, 1993.
17. Capanna R., et al.: Effect of electromagnetic fields on patients undergoing massive bone graft following bone tumor resection: a double-blind study. *Clin. Orthop.,* 306:213-221, 1994.
18. Caplan A., Goldberg V.M.: Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissue. *Clin. Orthop.* 367S :12-16,1999.
19. Chang W H, Chen LT, Sun JS, Lin FH : Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*, Sep;25(6):457-65, 2004.

20. Chang K, Hong-Shong Chang W, Yu YH, Shih C.: Pulsed electromagnetic field stimulation of bone marrow cells derived from ovariectomized rats affects osteoclast formation and local factor production. *Bioelectromagnetics.* Feb;25(2):134-41, 2004.
21. Chang K, Chang WH, Wu ML, Shih C. Effects of different intensities of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields on formation of osteoclast-like cells. *Bioelectromagnetics*. Sep;24(6):431-9, 2003.
22. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156, 1987
23. Dal Monte, et al.: Treatment of congenital pseudarthrosis and acquired non-union with pulsing electromagnetic fields (PEMFs). *Orthop. Trans., J. Bone Joint Surg.*, 10 (3):452, 1986.
24. Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*. Jul;23(5):398-405, 2002.
25. Evans M, Kaufman MH.: Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 292:154-156, 1981.
26. Fontanesi G., et al.: Terapia del Ritardo di Consolidazione e Pseudoartrosi con Campi Elettromagnetici Pulsati a Bassa Frequenza. *Giornale Italiano di Ortopedia,* IX, 319-333; 1983.
27. Fridenberg Z.B., et al.: The cellular origin of bioelectric potential in bone. *Calcified Tissue Int.*, 13: 53-62, 1973.
28. Fukada E., Yasuda I. : On the piezoelectric effect of bone. *J. Phys Soc. Japan,* 12: 121-128; 1957.

29. Gossling H.R., et al.: Treatment of ununited tibial fractures : a comparison of surgery and pulsed electromagnetic fields. *Orthop*., 16: 711-717; 1992.
30. Guzelsu N.: Piezoelectric- and electrokinetic effects in bone tissue – review. *Electro and Magnetobiology*, 12 (1): 51-82, 1993.
31. Martin GR.: Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78: 7634-7638, 1981.
32. Martin I., Muraglia A., Campanile G., Cancedda R., Quarto R.: Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology*, vol. 138, 10:4456-4462, 1997.
33. Meskens M.W.A., et al.: Treatment of nonunion using pulsed electromagnetic fields : a retrospective follow-up study. *Acta Orthop. Bel.*, 56:483-488; 1990.
34. Muschler G.F., Midura R.J.: Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical application. *Clin. Orthop*. 395 :68-80, 2002.
35. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA.: Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cell.* 19: 193-204, 2001.
36. Ogawa, H.: Effects of the localized thermal enhancement on new bone formation following mechanical expansion of the rat sagittal suture. *Nippon Kyosei Shika Gakkai Zasshi*. 49:485-496; 1990.
37. Pittenger M.F., Marshak D. et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, vol. 284(5411), 143-147, 1999.
38. Savini R., et al.: The use of pulsing electromagnetic fields in posterolateral lumbosacral spinal fusion. *J. Bioelect*., 9:9-17; 1990.
39. Shui C., Scutt A.,: Mild heat shock induced proliferation, alcaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow

stromal cells and Mg-63 cells in vitro. *J. Bone Miner Res.* 16 (4): 731-41; Apr., 2001.

40. Slavkin H., Panagis J.S., Kousvelari E.: Future opportunities bioengineering research at the National Institutes of Health. *Clin. Orthop*. 367S :17-30,1999.
41. Sollazzo V., et al.: Effects of Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Field on human osteoblast-like cells. In Vitro, vol. 15, (1): 75-83, 1996.
42. Thomson JA, et al.: Isolation of primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7844-7848, 1995.
43. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Hum repod.* 282:1145-1147, 1998.
44. Traina G.C., et al.: Effetto dei campi elettromagnetici pulsati(CEMP) sulle cellule dell'osso. *Modulazione Biofisica della Osteogenesi mediante Campi Elettromagnetici Pulsati.* Ed. Walberti. Vol. 2: 67-71, 1999.
45. Wakitani S. Et al.: Embryonic stem cell injected into mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology*. 42:162-165, 2003.
46. Watt FM, Hogan BL.: Out of Eden: stem cell and their niches. *Science.* 287: 1427-1430, 2000.
47. Yandow SM, et al.: Autogenic bone marrow injections as a trearment for simple bone cyst. *J. Pediatr. Orthop.*, Sep-Oct; 18(5): 616-20, 1998.