

INGEGNERIA TISSUTALE E CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI: PROTOCOLLO SPERIMENTALE DI RIGENERAZIONE PARODONTALE. PRIMA PARTE

TISSUE ENGINEERING AND MESENCHIMAL STEM CELLS: EXPERIMENTAL PROTOCOL OF PERIODONTAL REGENERATION. PART 1

Fabrizio Carini*, Massimiliano Ciaravino*, Marco Baldoni*, Giovanni Tredici**

*Università degli Studi di Milano Bicocca, Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria, Scuola di Specializzazione in Chirurgia Odontostomatologica, Direttore: professor M. Baldoni

**Università degli Studi di Milano Bicocca, Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche

PAROLE CHIAVE

Ingegneria tissutale, cellule staminali mesenchimali, rigenerazione parodontale, protocollo clinico sperimentale.

RIASSUNTO

Scopo del lavoro. Scopo di questo lavoro è valutare l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali nella rigenerazione del tessuto osseo orale.

Materiali e metodi. Viene proposto uno studio di fase I il cui protocollo sperimentale prevede il trapianto di MSCs umane autologhe prelevate dal midollo osseo, cresciute su scaffold in collagene (Gingistat - Vebas), differenziate ex vivo in senso osteogenico tramite l'utilizzo di reagenti clinical-grade.

Risultati e conclusioni. L'ingegneria tissutale costituisce un settore delle ricerche biomediche applicate rivolto allo sviluppo di procedure e biomateriali per la rigenerazione dei tessuti danneggiati. Si tratta di un'area di ricerca in cui convergono la biologia cellulare e dello sviluppo e le scienze dei biomateriali. Le attuali scoperte in merito a fattori di crescita e polimeri biodegradabili hanno creato i presupposti per lo sviluppo in vitro di numerosi tessuti, tra cui quello osseo e cartilagineo, ed i tessuti parodontali risultano ottimi candidati per l'applicazione di tali procedure.

ABSTRACT

Aim of the work. The aim of this study was to evaluate if Mesenchymal Stem Cells (MSC) are a possible cell source for tissue engineering, in particular for periodontal tissue regeneration.

Materials and methods. A phase I study is reported: the protocol describes the autograft of human MSCs harvested from a sample of percutaneously aspirated bone marrow; the bone marrow stromal cells are managed ex vivo for the isolation of the MSCs populations and finally they are implanted in a periodontal alveolar defect by means of a biomimetic scaffold (Gingistat - Vebas) and an osteogenic medium.

Results and conclusions. Tissue engineering is a field of applied biomedical research aiming at developing procedures and biomaterials for the regeneration of damaged tissues and is based on principles of cell biology, developmental biology and biomaterials science. Recent advances in growth factor biology and biodegradable polymer construct have set the stage for successful tissue engineering of cartilage, bone and related tissues. The periodontium could be considered an ideal candidate for such procedures.

KEY WORDS

Tissue engineering, mesenchymal stem cells, periodontal regeneration, research protocol.

INTRODUZIONE

La scoperta dell'esatta struttura del DNA e la recente decodificazione del genoma umano hanno contribuito ad inaugurare una nuova era scientifica, in cui la biologia è diventata "una scienza dell'informazione" (1-5).

Questa era post-genomica ha aperto nuove frontiere nella ricerca, fornendo nel contempo gli strumenti per comprendere il potenziale ruolo delle informazioni genetiche nella diagnosi e nello sviluppo delle malattie. Un nuovo paradigma scientifico sta prendendo piede nella medicina e nell'odontostomatologia: "soluzioni biologiche a problemi biologici". Si sta consolidando, dunque, la tendenza a modificare l'approccio a prevenzione, diagnosi e trattamento, con una crescente valorizzazione delle soluzioni biologiche (1, 3, 5-11).

Nell'attuale panorama scientifico si sta verificando una straordinaria convergenza tra medicina, odontoiatria, genetica umana, biologia molecolare e dello sviluppo, biotecnologie, bioingegneria e bioinformatica (1-11). All'apice di questa convergenza vi è l'opportunità offerta dall'ingegneria tissutale di rigenerare numerosi tessuti, tra cui quelli parodontali.

INGEGNERIA TISSUTALE E CELLULE STAMINALI

Il ripristino delle funzioni lese mediante la sostituzione dei tessuti o degli organi danneggiati rappresenta il principale oggetto di ricerca della medicina contemporanea.

L'utilizzo di tecniche di trapianto o di sostituzione con materiali sintetici risulta fortemente condizionato da numerosi fattori come la risposta immunitaria del soggetto ricevente, la scarsa disponibilità di tessuti od organi utilizzabili e la morbidità del sito donatore (12).

L'ingegneria tissutale è un'area di ricerca multidisciplinare rivolta a rigenerare i tessuti e ripristinare la funzionalità di organi mediante il trapianto di cellule e tessuti sviluppati in vitro o stimolando la crescita

cellulare in una matrice sintetica (13). I principi base dell'ingegneria tissutale prevedono la combinazione di cellule vitali con una matrice naturale o sintetica al fine di generare un tessuto vitale che risulti immunologicamente, funzionalmente, strutturalmente e meccanicamente identico al tessuto nativo.

Al fine di ottenere un restituito ad integrum stabile e duratura, è necessario soddisfare alcuni fondamentali criteri:

- generare un numero di cellule, e quindi un tessuto, dalle dimensioni adeguate al singolo caso;
- differenziare correttamente le cellule e mantenere il corretto fenotipo;
- creare un agglomerato cellulare che risulti organizzato correttamente nelle tre dimensioni e che produca una matrice extracellulare adeguata;
- produrre cellule e tessuti adatti strutturalmente e meccanicamente alle caratteristiche del tessuto nativo;
- ottenere una completa integrazione con il tessuto ricevente dal punto di vista immunologico ed un'adeguata neoangiogenesi che assicuri l'integrazione anche dal punto di vista vascolare.

L'elemento chiave nel far fronte a tutti questi criteri risiede nella qualità dei materiali di partenza ed in particolare modo in un'affidabile fonte di cellule.

Lo spettro delle possibili fonti di cellule utilizzabili nell'ingegneria tissutale include cellule mature già differenziate prelevate dal paziente, cellule staminali "adulte" prelevate dal paziente (cellule staminali mesenchimali) e cellule staminali embrionali.

Nonostante la buona disponibilità e l'assenza di reazioni immunitarie avverse, le cellule mature non rappresentano una buona fonte per l'ingegneria tissutale: l'alto grado di differenziazione implica una minor capacità proliferativa e restringe il campo di utilizzo al fenotipo cellulare specifico del tessuto da cui vengono prelevate.

Cellule staminali

Le cellule staminali vengono descritte come cellule immature o indifferenziate in grado di generare cellule figlie identiche o di differenziarsi in diversi fenotipi cellulari (14, 15).

Le cellule staminali presentano una capacità di autoreplicarsi potenzialmente illimitata e sono in grado di generare una o più linee cellulari altamente differenziate a seconda della loro potenzialità replicativa:

- cellule staminali "totipotenti" possono generare tutti i tipi di cellule e tessuti presenti in un organismo (per esempio cellula uovo fertilizzata o zigote);
- cellule staminali "pluripotenti" possono generare la maggior parte delle cellule e dei tessuti presenti in un organismo (per esempio cellule staminali embrionali);
- cellule staminali "multipotenti" possono generare un numero limitato di cellule e tessuti, normalmente legati allo strato germinale da cui sono originate (cellule staminali mesenchimali).

Il tipo ed il numero di linee cellulari altamente differenziate che una cellula staminale è in grado di generare sono determinati geneticamente.

Tuttavia l'ambiente esterno gioca un ruolo fondamentale nei processi di attivazione genica mediante la modificazione del gradiente di citochine, le interazioni intercellulari e tra cellule e matrice extracellulare, guidando il processo di differenziazione.

Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali sono quelle prelevate dalla massa cellulare interna della blastocisti prima del suo impianto (16, 17).

Sono cellule pluripotenti, che mantengono la possibilità di generare la maggior parte dei tessuti in vivo ed in vitro. In presenza del fattore inibitore leucemico (LIF), queste cellule possono essere mantenute e fatte replicare in vitro in modo illimitato. Una volta rimosso tale fat-

tore di crescita, le cellule staminali embrionali si differenziano spontaneamente in specifici aggregati di cellule o corpi embrionali che contengono cellule in fase di differenziazione verso la linea mesodermica, ectodermica ed endodermica (18, 19, 20).

Manipolando questa coltura cellulare è possibile controllare e restringere le linee di differenziazione e generare delle colture ricche di specifici precursori cellulari. Utilizzando questo approccio, si sono ottenuti da cellule staminali murine dei precursori di cellule ematopoietiche, di cellule nervose, di adipociti, di miociti, di condrociti e di isole pancreatiche (21-26).

La recente possibilità di isolare cellule staminali embrionali umane dal liquido amniotico ha aperto nuove frontiere nella ricerca per l'ingegneria tissutale. Nonostante le marcate differenze morfologiche, nella modalità di replicazione e nei terreni stessi di coltura, queste cellule sembrano avere lo stesso potenziale di differenziarsi in più linee cellulari (27).

I fattori chiave nell'indirizzare lo sviluppo cellulare verso uno specifico fenotipo possono essere così riassunti (22, 24, 26):

- ▶ utilizzo di fattori di crescita e di differenziazione, come il transforming growth factor- (TGF-), le proteine morfogenetiche (BMP), l'acido retinoico (RA), il fibroblast growth factor (FGF), il platelet-derived growth factor (PDGF);
- ▶ scelta di uno specifico timing nella stimolazione delle cellule;
- ▶ colture cellulari in associazione a cellule già differenziate;
- ▶ selezione biochimica mediante inserimento di particolari marker di superficie per poter purificare il campione cellulare;
- ▶ manipolazione genetica delle cellule staminali, mediante inserimento di un particolare gene in grado di favorire il processo di selezione del fenotipo di interesse o riprogrammazione cellulare mediante trasferimento nucleare o ancora modifica-

zione del complesso maggiore di istocompatibilità.

Cellule staminali adulte

Il proprio corpo è una delle fonti maggiori di cellule staminali: le "cellule staminali adulte" (14, 15) sono infatti presenti in specifiche sedi chiamate "nicchie delle cellule staminali", in corrispondenza di tutti gli organi, specie in quelli che presentano un rapido turnover cellulare (15, 27).

Ne sono state identificate numerose, per esempio le ematopoietiche, le neurali, quelle del derma, del cordone ombelicale e quelle dello stroma midollare o mesenchimali (28, 29, 30).

Le cellule staminali adulte meglio caratterizzate sono quelle derivanti dal midollo osseo. Ve ne sono due tipi: le cellule ematopoietiche, che possono generare l'intera linea cellulare del sangue, e quelle dello stroma midollare o mesenchimali (MSC) che possono generare numerosi tessuti connettivi, tra cui il tessuto osseo e quello adiposo.

Vi sono in letteratura numerosi studi che evidenziano la grande potenzialità differenziativa delle cellule staminali adulte prelevate da diversi tessuti o nicchie. Per esempio cellule staminali neurali sono risultate in grado di generare cellule della linea del sangue, ed anche cellule staminali prelevate dal tessuto adiposo possono formare fenotipi cellulari propri del tessuto osseo, cartilagineo e muscolare (31).

Tra tutte, le MSC hanno dimostrato la maggiore duttilità: nel modello animale sono risultate in grado di generare fenotipi propri del tessuto nervoso, osseo e miocardico, ma anche della linea cellulare epatica, renale, intestinale, ematopoietica e della cute (32-35).

Questa straordinaria capacità differenziativa ha contribuito ad amplificare la ricerca sulle cellule staminali adulte ed intensificare il dibattito sulla necessità di ricorrere alle cellule staminali embrionali, che presentano maggiori rischi di reazioni immunologiche avverse e risultano meno prevedibili per ciò che

concerne eventuali degenerazioni in senso neoplastico (36).

APPLICAZIONI CLINICHE DI SCAFFOLD E BIOMATERIALI NELL'INGEGNERIA TISSUTALE

I fattori chiave coinvolti nella rigenerazione dei tessuti e degli organi sono tre:

- ▶ una fonte affidabile di cellule (cellule staminali, eccetera);
- ▶ molecole in grado di indurre la differenziazione delle cellule (proteine, fattori di crescita);
- ▶ matrici in cui far crescere le cellule (scaffold).

Queste ultime devono permettere alle cellule di migrare al loro interno, di fissarsi alla struttura e quindi proliferare e differenziarsi. Devono poi offrire un ambiente che permetta alle cellule di mantenere il loro fenotipo e di sintetizzare le proteine e le molecole necessarie al loro sviluppo. Tali strutture devono presentare inoltre un'estesa superficie di impianto, una resistenza meccanica sufficiente, una forma tridimensionale adeguata ed un'eventuale completa biodegradabilità. Una caratteristica cruciale deve essere poi la corretta porosità del materiale, per permettere la migrazione cellulare e l'angiogenesi, e fornire una ampia superficie per le interazioni intercellulari (37).

Tipologie di scaffold disponibili

Esistono due categorie di scaffold, quelli costituiti da materiali naturali e quelli di sintesi:

- ▶ Materiali naturali (collagene, glicosaminoglicani, alginati eccetera). I principali vantaggi dei materiali naturali sono la scarsa tossicità e la scarsa risposta infiammatoria cronica; inoltre possono essere combinati in masse composite biodegradabili, acquisendo caratteristiche meccaniche proprie dei materiali di sintesi e mantenendo caratteristiche di biocompatibilità (38). Gli svantaggi includono la scar-

sa resistenza meccanica ed una complessità strutturale che rende difficile l'utilizzo e che richiede spesso una manipolazione chimica. Il collagene, principale proteina della matrice extracellulare, è uno dei biomateriali di più comune utilizzo.

- Materiali di sintesi (polimeri, materiali ceramici, biovetri eccetera). Esistono tre classi principali di materiali di sintesi: i polimeri, i materiali ceramici ed i biovetri. Per ciò che riguarda i polimeri, ve ne sono di riassorbibili, come il poliglicolato (PGA), il polilattato (PLA) ed il polilattato-poliglicolato (PLG), utilizzati per esempio nelle suture, ed anche di non riassorbibili come il politetrafluoroetilene (PTFE) utilizzato per innesti vascolari e nella rigenerazione parodontale. I materiali ceramici presentano una composizione inorganica e non metallica e vengono comunemente utilizzati nella chirurgia ossea. I biovetri sono costituiti da una struttura a base di silicio combinata con ioni come il calcio, il sodio o il fosforo; i campi di applicazione principali sono nell'ambito della rigenerazione ossea per la loro capacità di legarsi in modo specifico a questo tessuto (39).

Applicazioni cliniche

Le principali applicazioni cliniche della rigenerazione tissutale per mezzo di scaffold interessano il tessuto osseo, il tessuto cartilagineo, il tessuto nervoso, l'apparato vascolare e la pelle.

- Tessuto osseo. La resistenza meccanica rappresenta in questo caso una delle caratteristiche predominanti richiesta allo scaffold, che deve essere progettabile nelle tre dimensioni, al fine di rispondere alle specifiche esigenze delle porzioni anatomiche interessate. Lo scaffold deve poi presentare una superficie porosa in grado di promuovere il processo di neoformazione ossea. Un esempio può essere lo scaffold in corallo, u-

tilizzato su modello animale per rigenerare del tessuto osseo con cellule staminali mesenchimali (40); si tratta di un esoscheletro naturale in cui il carbonato di calcio inorganico cresce seguendo una matrice organica e presenta ottime caratteristiche meccaniche (41, 42).

- Tessuto cartilagineo. Le peculiari caratteristiche del tessuto cartilagineo rendono molto complesse le ipotesi rigenerative. Si tratta infatti di un tessuto non vascolare che possiede scarse capacità riparative. Uno scaffold ideale in questo caso dovrebbe impedire la trasformazione in senso fibroblastico dei condrociti, mantenendoli nel fenotipo condrogenico. Uno dei materiali proposti a tale scopo è il copolimero polilattato-poliglicolato (PGA/PLA), utilizzato con successo per rigenerare tessuto cartilagineo a partire da condrociti articolari bovini (43).
- Tessuto nervoso. Attualmente le tecniche di riparazione utilizzate in caso di sezione dei tronchi centrali o periferici prevedono il ricongiungimento chirurgico dei capi tagliati. La rigenerazione guidata del tronco nervoso può essere anche favorita da strutture in grado di guidare le cellule, come dei particolari polimeri in grado di promuovere l'adesione cellulare e la crescita dell'assone (44).
- Apparato vascolare. L'ingegneria tissutale consente attualmente di produrre degli innesti vascolari in grado di sostituire vasi di piccolo diametro, coltivando cellule proprie del tessuto muscolare liscio in strutture tubolari di poliglicolato (45).
- Pelle. L'ingegneria tissutale rappresenta attualmente una solida alternativa nel trattamento delle lesioni da ustione. Il tessuto ottenuto con queste tecniche può essere applicato sulle ferite e favorire la fase ricostruttiva. Vi sono in commercio due tipi di scaffold per la rigenerazione della pelle: il Dermagraft, prodotto da Advanced Tis-

sue Science (46), e l'Appligraf, prodotto da Organogenesis (47).

RIGENERAZIONE DEI TESSUTI A LIVELLO CRANIOFACCIALE: TESSUTO OSSEO E TESSUTI DENTARI

Gli attuali traguardi raggiunti in ambito di ingegneria tissutale contribuiscono a delineare un futuro in cui sarà possibile utilizzare tessuti sintetizzati con la bioingegneria per sostituirne altrettanti mancanti o danneggiati per malattia o per trauma. Tali tecniche risulteranno applicabili anche ad organi altamente mineralizzati come i denti, risultato di un complesso sistema di reciproco controllo tra l'epitelio ed il mesenchima dentale.

Recenti studi in merito alla biologia dei fattori di crescita ed alla produzione di strutture di supporto biodegradabili hanno creato le basi per produzione di tessuto cartilagineo ed osseo mediante bioingegneria. Il parodonto risulta essere un ottimo candidato per tali procedure: studi preliminari hanno infatti confermato l'assenza di reazioni immunologiche o infiammatorie in caso di trapianto in tale sede di cellule del legamento parodontale e del tessuto osseo.

Applicazioni nella rigenerazione del tessuto osseo

La ricostruzione dei difetti craniofacciali mediante l'utilizzo di MSC permette di ovviare a tutti i limiti legati alle tecniche di innesto autologo ed eterologo. Studi su modelli animali hanno comprovato la possibilità di utilizzare procedure di rigenerazione dei tessuti craniofacciali basate su cellule staminali (48).

Dal punto di vista pratico, la procedura prevede l'isolamento dal midollo osseo o dal tessuto dentale di cellule staminali mesenchimali (MSC), che vengono messe in coltura in matrici biodegradabili (scaffold) con fattori morfogenetici in grado di guidare la differenziazione nella linea cellulare di interesse. Il tessuto ibrido ottenuto viene quindi inserito nel

difetto osseo stimolando una potente risposta osteogenetica.

Lo sviluppo di nuove tecnologie nella fabbricazione di queste matrici in cui far replicare le cellule staminali ha semplificato la rigenerazione di difetti tridimensionali molto estesi (49).

In uno studio di Abukawa e collaboratori (2004) è stato trattato, in un modello animale, un difetto mandibolare segmentale con delle cellule staminali mesenchimali prelevate dall'osso iliaco, fatte replicare in vitro e quindi incubate in una matrice biodegradabile di acido polilattico-poliglicolico combinata con fattori di crescita. Il tessuto ottenuto a 6 settimane dall'impianto è risultato indistinguibile all'esame istologico rispetto al tessuto nativo: sono stati identificati osteoblasti, osteociti e trabecole anastomotiche con canali haversiani contenenti strutture vascolari immature e periostio in corrispondenza delle superfici della matrice sintetica (50).

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Yamada (2004) che in un modello animale ha indagato il livello di osteointegrazione di impianti endossei inseriti in zone ricostruite con innesti di PRP combinate con cellule staminali mesenchimali e PRP combinate con un prelievo di osso autologo. A due mesi dal posizionamento degli impianti, l'entità del contatto osso-impianto (Bone-implant contact) e la densità ossea nel gruppo trattato con cellule staminali mesenchimali sono risultate in linea con quelle ottenute con l'innesto di osso autologo (51).

Recentemente è stata dimostrata la possibilità di correggere un'eventuale discontinuità mandibolare utilizzando un sostituto osseo fatto sviluppare all'interno di una griglia in titanio, inserita nel muscolo latissimo del dorso del paziente stesso, combinando precursori di origine midollare con proteine morfogenetiche e osso bovino deproteinizzato (52).

Per potenziare la capacità rigenerativa delle MSC, è stato proposto inoltre di ricombinarne il genoma mediante tecniche di ingegneria genetica inserendo delle telomerasi umane (transcrittasi inversa). L'analisi

quantitativa dei tessuti ottenuti ha confermato un significativo incremento nella rigenerazione ossea (53, 54).

Applicazioni nella rigenerazione del complesso dento-pulpare

Nonostante la morfologia della matrice dentinale differisca in modo sostanziale dalla matrice ossea, la composizione biochimica delle stesse è invece molto simile. Anche la dentina contiene proteine morfogenetiche (BMPs) e la matrice dentinale demineralizzata può stimolare la formazione di tessuto osseo quando viene posta sperimentalmente in un muscolo. Sia il tessuto osseo che la matrice dentinale possono infine stimolare la formazione di dentina se impiantate nella polpa dentale (13).

Sebbene la dentina non abbia un turnover cellulare simile all'osso, è stata ben dimostrata la sua capacità riparativa in caso di danno pulpare. Come sono state rilevate cellule staminali osteoblastiche nel midollo osseo, così sono state recentemente isolate cellule staminali a livello della polpa dentale. In uno studio di Gronthos (2000) sono state isolate dalla polpa dentale adulta delle cellule con alta capacità proliferativa e immuno-fenotipo simile alle MSC di origine midollare (55). In coltura queste cellule presentavano una rilevante attività fosfatasi-alcalina e tendenza a formare noduli densi calcificati. Trapiantate in vivo, hanno poi dimostrato la capacità di formare strutture simili alla dentina, ma non di differenziare in altri fenotipi.

Applicazioni nella rigenerazione del cemento radicolare

L'assenza di marker specifici per l'identificazione dei cementociti impedisce di identificare con chiarezza le cellule progenitrici del cemento radicolare: non è infatti chiaro se si tratti di cellule tipo osteoblastico che sintetizzano questo tessuto in risposta a stimoli ambientali spe-

cifici delle cosiddetta "nicchia dentale" o vi sia un fenotipo cellulare specifico deputato a tale scopo. Tuttavia l'identificazione di cellule della linea dei cementociti isolate da elementi dentari sani combinata all'utilizzo di tecniche di ingegneria tissutale e genetica sta aprendo nuovi fronti nella ricerca (56, 57).

Recentemente è stato presentato in letteratura uno studio di Saito (2005) in cui sono state isolate cellule progenitrici della linea cementoblastica da colture cellulari di follicoli dentali di origine bovina (58). È stata quindi creata una linea cellulare clonale immortalizzata di cellule progenitrici cementoblastiche con la quale si è riusciti a creare un tessuto simile a quello osseo, con cellule simili a cementociti in una matrice mineralizzata.

In uno studio di Seo (2004) sono state isolate cellule staminali totipotenti dal legamento parodontale umano. In vitro è stata quindi verificata la capacità di queste cellule di differenziarsi in cellule della linea cementoblastica, adipociti e cellule capaci di produrre tessuto collagene. Utilizzando un modello animale, si è poi riusciti a stimolare la rigenerazione di tessuto simile al cemento e di strutture proprie del complesso parodontale (59).

Applicazioni nella rigenerazione dello smalto

Rigenerare lo smalto è sicuramente più complesso rispetto ad altri tessuti come osso e dentina.

Con l'eruzione dell'elemento dentario, l'epitelio dell'organo dello smalto si dissolve impedendo al tessuto di rigenerare in caso di lesione. Nonostante si possa escludere l'esistenza in un tessuto adulto di cellule staminali deputate a differenziarsi in ameloblasti, è tuttavia possibile che alcune cellule dei tessuti orali in presenza di stimoli specifici possano iniziare a sintetizzare smalto. In uno studio di De Mooerloose (2000) è stata suggerita la possibilità che sia il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFs) a mantenere e determinare il differenziamento di queste linee cellulari (60). La compren-

sione dei reali meccanismi alla base di tale differenziazione permetterebbe di indurre tale trasformazione in altri ceppi di cellule dell'epitelio orale.

TECNICHE MOLECOLARI ED INGEGNERIA TISSUTALE NELLA RIGENERAZIONE PARODONTALE

Le attuali conoscenze relative alla biologia dello sviluppo dentario e la scoperta dei fattori di crescita coinvolti nel determinare tale sviluppo hanno suggerito l'utilizzo di tali fattori nelle procedure di rigenerazione parodontale (61-69).

Tra i fattori più comunemente utilizzati vi sono il Platelet-derived Growth Factor, l'Insulin-like Growth Factor (70-75), il Transforming Growth Factor- β (76), il Basic Fibroblast Growth Factor (77), il desametasone (78) e le BMPs (79, 80).

Trial clinici sull'utilizzo in combinazione del Platelet-derived Growth Factor e dell'Insulin-like Growth Factor nel trattamento di difetti parodontali hanno dimostrato come solo alte dosi di tali fattori siano in grado di stimolare un incremento statisticamente significativo nella neoformazione di osso (72).

Quando il Platelet-derived Growth Factor viene utilizzato in combinazione con innesti di materiale alloplastico nel trattamento di forcazioni di secondo grado e difetti infraossei, i risultati istologici confermano la rigenerazione di osso alveolare, cemento e legamento parodontale (81, 82).

Un'alternativa all'utilizzo dei singoli fattori di crescita è la combinazione di innesti alloplastici e gel piastrinico, ossia una frazione di plasma contenente Platelet-derived Growth Factor e Transforming Growth Factor- β (PRP) (83, 84, 85).

Tuttavia esistono dei problemi relativi all'attività non specifica dei singoli fattori sulle diverse linee cellulari e delle limitazioni legate al rapido smaltimento di tali fattori applicati per via topica. Per superare questi problemi, sono stati condotti studi di ingegneria genetica su cel-

lule prelevate dal parodonto, utilizzando un adenovirus come carrier del gene del Platelet-derived Growth Factor per promuovere e sostenere il suo rilascio e la conseguente attività biologica (86, 87, 88). Il potenziale ricorso alla terapia genica in vivo per stimolare la rigenerazione parodontale è stato studiato in modelli animali, confermando la rigenerazione di osso alveolare e cemento in gravi difetti parodontali dopo il trasferimento diretto del gene del Platelet-derived Growth Factor (89).

Anche l'utilizzo delle BMPs risulta richiedere alti dosaggi e presenta delle limitazioni legate all'azione non specifica sulle diverse linee cellulari ed al rapido smaltimento in caso di applicazione topica (73, 90). Anche in questo caso il ricorso alla terapia genica mediante adenovirus contenente BMP-7 ha confermato le potenzialità di tale tecnica (91).

Recenti revisioni in merito a tali argomenti (92) sembrano confermare le buone prospettive per la ricerca in tale senso, ma evidenziano i limiti legati all'attuale carenza di dati che impedisce l'esecuzione di meta-analisi sull'effetto dei fattori di crescita nella rigenerazione parodontale.

L'utilizzo di MSC nella rigenerazione parodontale ha aperto tecniche alternative all'utilizzo dei singoli fattori di crescita. In uno studio di Kawaguchi (2004) vengono espone le linee guida di tale sperimentazione. Una volta isolate delle MSC dal midollo osseo del modello animale, si sono fatte espandere in vitro e quindi combinate con del collagene di tipo I al 2 per cento. Tale medicazione è stata poi inserita in difetti di classe III ed è stata eseguita una valutazione istologica e morfometrica ad un mese dal trapianto. I risultati hanno indicato una rigenerazione dei difetti con cemento, legamento parodontale e tessuto osseo (93).

L'auto trapianto di MSC rappresenta dunque un'opzione innovativa per la rigenerazione dei tessuti parodontali e costituisce attualmente il principale campo di ricerca nella parodontologia sperimentale.