



SAPIENZA
UNIVERSITA' DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE
XXXIV CICLO

“Valutazione del potenziale angiogenico di cellule mesenchimali staminali adulte derivate
dalla polpa dentaria umana”

DOTTORANDO

FRANCESCA SANTILLI

DOCENTE GUIDA

ROBERTA MISASI

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

“Valutazione del potenziale angiogenico di cellule mesenchimali staminali
adulte derivate dalla polpa dentaria umana”

SAPIENZA
UNIVERSITA' DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE
XXXIV CICLO

DOTTORANDO

Francesca Santilli
Matricola 1052166

DOCENTE GUIDA

Roberta Misasi

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE

1.1 Le Cellule staminali: definizione e proprietà

1.1.1 Sorgenti di derivazione

1.1.2 Le cellule staminali embrionali (ESCs) e problemi di natura etica

1.1.3 Cenni bioetici e legislativi

1.1.4 Le cellule staminali adulte (ASCs)

1.1.5 Fonti di cellule staminali adulte

1.1.6 Le cellule staminali mesenchimali (MSCs)

1.1.7 Potenziale differenziativo delle MSCs e loro applicazione in medicina rigenerativa

1.1.8 Cellule staminali e terapia cellulare

2.1 Angiogenesi

2.1.1 Caratteristiche dell'angiogenesi

2.1.2 I periciti: morfologia e distribuzione

2.1.3 Periciti: funzioni canoniche, disfunzioni e funzioni innovative

2.1.4 Periciti: caratterizzazione e similarità con le MSCs

2.1.5 Periciti: potenziale applicazione in medicina rigenerativa

2.1.6 Periciti e DPSC

2. SCOPO DELLA RICERCA

3. MATERIALI E METODI

- 3.1 Etica della ricerca
- 3.2 Estrazione della polpa dentaria e separazione delle cellule staminali
- 3.3 Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali da polpa dentaria
- 3.4 Linee cellulari e condizioni di crescita
- 3.5 Separazione immunomagnetica della sottopopolazione NG2+ da DPSC
- 3.6 Valutazione quantitativa di strutture simili a isole su matrice extracellulare
- 3.7 Analisi Citofluorimetrica
- 3.8 Western Blot
- 3.9 Saggio di formazione dei tubuli di co-culture di DPSC e HUVEC
- 3.10 Immunofluorescenza
- 3.11 Saggio di migrazione
- 3.12 Analisi statistica

4. RISULTATI

- 4.1 Differenti condizioni di coltura modificano il fenotipo delle DPSC
- 4.2 Le E-DPSC supportano la formazione del tubulo endoteliale
- 4.3 Ruolo del FGF nella stabilizzazione del tubulo da parte delle DPSC
- 4.4 Isolamento dalle DPSC di specifici cloni cellulari e ruolo del FGF nella stabilizzazione del tubulo in formazione
- 4.5 Ruolo dei cloni DPSC NG2+ e DPSC NG2- nella formazione e stabilizzazione di nuovi tubuli

5. DISCUSSIONE

6. CONCLUSIONI

7. BIBLIOGRAFIA

RIASSUNTO

La polpa dentaria si è rivelata negli ultimi anni, una fonte di facile accesso e una sorgente di cellule staminali mesenchimali (MSCs), il suo potenziale biologico è attualmente oggetto di intense indagini. Le MSCs dalla polpa dentaria definite dall'acronimo DPSC (Dental Pulp Staminal Cells) sono state classificate come una popolazione eterogenea deputata non solo alla riparazione della dentina ma anche, al mantenimento dell'omeostasi vascolare e nervosa dei denti. In questo lavoro portato avanti in questi anni di dottorato ho cercato di caratterizzare il fenotipo delle cellule isolate dalla polpa dentaria di giovani donatori e di indagare *in vitro* la loro possibile capacità differenziativa e il loro ruolo come cellule simili a periciti. In particolare, ho valutato come diverse condizioni di coltura potessero modulare l'espressione dei marcatori tipici dei periciti nelle DPSC e la loro capacità di stabilizzare i tubuli endoteliali neosintetizzati *in vitro*. Le DPSC coltivate in condizioni standard esprimono marcatori tipici delle MSCs e allo stesso tempo presentano una popolazione clonale che esprime il marcatore dei periciti NG2. Queste DPSC sono state associate a una bassa capacità di germinazione nella matrice extracellulare e a una capacità limitata nel trattenere i tubuli formati dalle cellule endoteliali in un modello di angiogenesi in co-cultura. Quando le condizioni di coltura sono state modificate, utilizzando al posto del terreno standard (L-DMEM) il terreno di crescita endoteliale (EGM-2), le DPSC hanno mostrato un aumento significativo dell'espressione di NG2. In questo caso la popolazione ottenuta esprime CD73 (uno dei tipici marker di staminalità), ma non la calponina (marker specifico della muscolatura liscia che si ritiene essere coinvolto nella regolazione o modulazione della contrazione cellulare) e i marker endoteliali. Le DPSC condizionate da EGM-2 hanno mostrato una maggiore capacità di germinazione nella matrice extracellulare e un'associazione efficiente con le cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) consentendo la ritenzione parziale per diversi giorni dei tubuli endoteliali neoformati. Tra i fattori di crescita contenuti nell'EGM-2 abbiamo identificato il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) come il principale responsabile della sovra regolazione di NG2 e della stabilizzazione a lungo termine dei tubuli endoteliali. Secondo i risultati ottenuti *in vitro*, le DPSC rappresentano una fonte efficace di cellule staminali in grado di dar origine a periciti e le condizioni di coltura appropriate potrebbero indurre il differenziamento in una popolazione specializzata con una promettente capacità di stabilizzare i vasi e promuovere la maturazione vascolare.

Parole chiave: pericita, angiogenesi, cellule staminali mesenchimali, NG2, polpa dentaria

ABSTRACT

Dental pulp has been revealed as an accessible and a rich source of mesenchymal stem cells (MSCs) and its biological potential is currently under intense investigation. MSCs from dental pulp stem cells (DPSC) have been indicated as a heterogeneous population oriented not only in repairing dentine but also in maintaining vascular and nervous homeostasis of the teeth. We sought to verify the phenotype of cells isolated from dental pulp of young donors and to investigate *in vitro* their role as pericyte-like cells. Specifically, we evaluated how different culture conditions can modulate expression of pericyte markers in DPSC and their capacity to stabilize endothelial tubes *in vitro*. DPSC cultured in standard conditions expressed MSC markers and demonstrated to contain a population expressing the pericyte marker NG2. These DPSC were associated with low sprouting capacity in extracellular (EC) Matrix and limited ability in retaining tubes formed by endothelial cells in a coculture angiogenesis model. When cultured in endothelial growth medium (EGM-2), DPSC significantly upregulated NG2. The resulting population conserved the stem marker CD73 but was negative for calponin and endothelial markers. EGM-2-conditioned DPSC showed a higher sprouting ability in EC Matrix and efficient association with human umbilical vein endothelial cells allowing the partial retention of endothelial tubes for several days. Among growth factors contained in EGM-2 we identified basic fibroblast growth factor (FGF) as mainly responsible for NG2 upregulation and long-term stabilization of endothelial tubes. According to the *in vitro* analysis, DPSC represent an effective source of pericytes, and the appropriate culture conditions could result in a population with a promising ability to stabilize vessels and promote vascular maturation.

Keywords: pericyte, angiogenesis, mesenchymal stem cells, NG2, dental pulp

1. INTRODUZIONE

1.1 Le cellule staminali: definizione e proprietà

Le cellule staminali sono una popolazione di cellule primitive indifferenziate in grado di autoreplicarsi per periodi di tempo molto lunghi, spesso per l'intera vita dell'organismo, costituendo, così, una riserva inesauribile di cellule clonogeniche non specializzate (Bhartiya D., 2018). È stato visto che, in particolari condizioni ambientali, o in presenza di specifici stimoli, una cellula staminale può dare origine a differenti citotipi, assumendo morfologia e funzionalità specializzate. Infatti, la mancanza di qualsiasi tessuto-specificità conferisce loro la potenzialità di differenziare in cellule di diversi tessuti (Verfaillie C.M., 2002).

A differenza delle cellule non staminali, che si dividono in maniera simmetrica, le cellule staminali si dividono in modo asimmetrico infatti, ogni cellula madre si divide generando due cellule figlie, con proprietà differenti: una che mantiene il suo stato di staminalità (quiescenza) e una che invece, va incontro a differenziamento tessuto-specifico; in questo modo una parte va incontro a differenziamento mentre, le cellule che rimangono indifferenziate mantengono il loro numero costante all'interno del tessuto (Fig. 1) (Pavlović *et al.*, 2017, 1°ed.; Serakinci N., 2006). Questo tipo di divisione gioca un ruolo omeostatico essenziale: da una parte, garantisce infatti, la permanenza di un numero di cellule non differenziate, dall'altra, genera cellule progenitrici di transito da cui origineranno cellule mature che, diventeranno specializzate andando a fornire un ricambio cellulare di quelle morte o distrutte a causa di traumi o malattie (Galli R., 2003).

Le cellule staminali sono classificate in:

- labili, quando non operano più nella costruzione di nuove cellule;
- stabili, quando operano nella costruzione di nuove cellule in maniera ridotta;
- perenni, quando non cessano mai la loro attività di sostituzione o generazione di nuove cellule (Pollard T.D., 2008, 3°ed.).

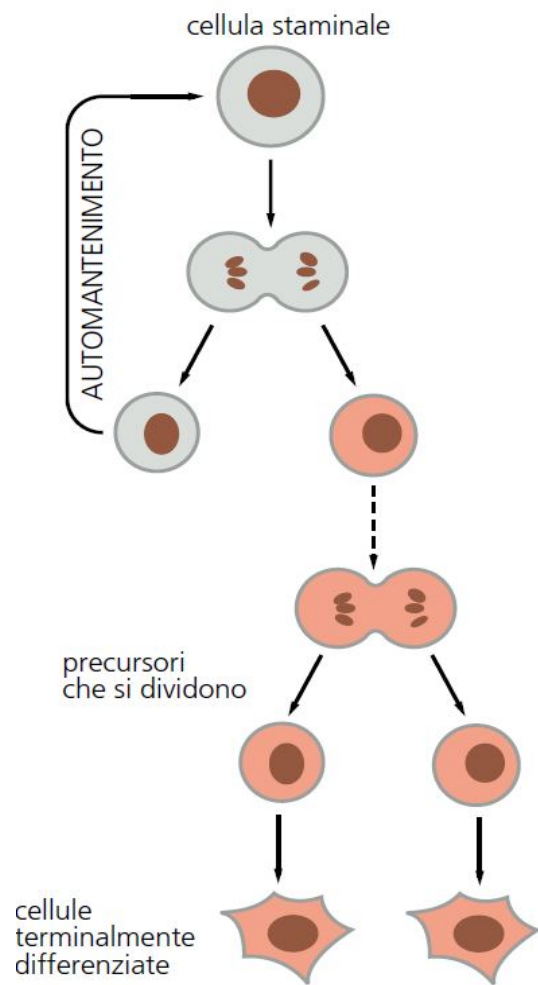


Figura 1. Divisione asimmetrica delle cellule staminali.

Le cellule staminali risiedono, insieme a fattori solubili, in diversi organi e tessuti all'interno di uno specifico microambiente perivascolare fisiologicamente limitato, in cui rimangono quiescenti mantenendo le loro caratteristiche di staminalità (Shi S., 2002).

Questo microambiente così particolare viene chiamato "nicchia staminale" (Moore K.A., 2006; Tavazoie M., 2008) ed è in grado di mantenere in presenza di specifici fattori (Alvarez C.V., 2012), il loro potenziale differenziativo. Una delle caratteristiche chiave di tutti i tipi di cellule staminali è il loro stato indifferenziato, poiché non possiedono le caratteristiche morfologiche, strutturali, molecolari o antigeniche che si ritrovano nelle cellule differenziate del tessuto di appartenenza (Alvarez-Buylla A., 2002).

Attualmente esistono due criteri di classificazione delle cellule staminali: uno in termini di "potenzialità" che descrive la loro specificità e uno in base alla loro fonte di derivazione.

In termini di potenzialità, dove per potenza si intende la capacità di dare origine ad una o più linee o tipi cellulari tramite differenziamento, specializzazione in una linea cellulare, o trans-differenziamento, le cellule staminali sono state classificate in (Can A., 2008):

Totipotenti: derivano dalla morula e sono cellule capaci a partire da una singola cellula di dividersi e dare origine a tutte le cellule e i tessuti che costituiscono un embrione e che supportano il suo sviluppo in utero (come il cordone ombelicale e la placenta).

Pluripotenti: derivano dalle cellule totipotenti e sono capaci di dividersi e differenziarsi in cellule appartenenti a tutti e tre i foglietti germinali embrionali: mesoderma, endoderma ed ectoderma.

Multipotenti: derivano dalle cellule pluripotenti e hanno il potenziale di differenziarsi in un numero limitato di lignaggi cellulari, dando origine infatti, alle cellule di uno solo dei tre foglietti germinali embrionali.

Unipotenti o precursori: cellule capaci di differenziare in un solo tipo cellulare e che, grazie alla proprietà dell'auto replicazione, si distinguono dalle cellule non staminali.

1.1.1 Sorgenti di derivazione

In base alla loro fonte di derivazione invece, le cellule staminali sono state classificate in tre grandi gruppi:

Embrionali (ESCs): sono cellule pluripotenti ricavate dalla massa cellulare interna (ICM) della blastocisti. Queste cellule, una volta estratte, possono essere messe in coltura e fatte proliferare come linee indifferenziate, oppure possono essere differenziate nella linea cellulare voluta (Thomson J.A., 1998; Fu J., 2021). L'isolamento deve necessariamente avvenire prima dell'impianto dell'embrione nella mucosa uterina. Possono essere isolate, estratte e coltivate *in vitro*, con il risultato che, a partire da poche decine di cellule, si possono ottenere centinaia di milioni di staminali intatte. L'estrazione di queste cellule richiede la soppressione dell'embrione entro 14 giorni dalla sua fecondazione con conseguenti obiezioni di tipo etico-giuridico in cui vengono messi in contrapposizione due principi morali fondamentali: da un lato il dovere di prevenire o alleviare le sofferenze in quanto la ricerca sulle cellule staminali embrionali potrebbe condurre alla scoperta di nuovi trattamenti che allevino la sofferenza di molte persone e dall'altro, il dovere di rispettare il valore della vita umana poiché come descritto, per ottenere le cellule staminali embrionali, l'embrione stesso deve essere sacrificato e ciò significa distruggere una potenziale vita umana.

Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs): sono un tipo di cellule staminali generate artificialmente a partire da una cellula somatica adulta, mediante l'introduzione di quattro geni specifici codificanti determinati fattori di trascrizione che ne inducono la conversione in cellula staminale di una specifica linea cellulare, che a sua volta potrà svilupparsi in cellula differenziata. Queste cellule sono simili alle ESCs, per morfologia, fenotipo, trascrizione, epigenetica (Baranek M., 2016).

In coltura, le iPSCs sono in grado di auto rinnovarsi e differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula da tutti e tre gli strati germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma) e, soprattutto, l'uso di iPSCs evita problemi etici associati invece, all'uso di ESCs.

Inoltre, lo sviluppo della tecnologia iPSCs consente di avere a disposizione una quantità quasi illimitata di cellule staminali pluripotenti umane sane o specifiche per una malattia (Karagiannis P., 2019).

Per le loro caratteristiche, le iPSCs sono considerate cellule molto promettenti per l'uso nella ricerca e nello sviluppo biomedico, offrendo grandi speranze nel campo della medicina

rigenerativa in quanto, la possibilità di indurre la differenziazione nella maggior parte dei tipi cellulari di un organismo (come ad esempio cellule neuronali, pancreatiche, cardiache ed epatiche), può essere sfruttata nella rigenerazione di tessuti o organi danneggiati (Karagiannis P., 2019) sfruttando lo sviluppo di sistemi multicellulari 3D più complessi come gli organoidi e le chimere uomo-roditore utilizzati come sistemi modello per lo studio di un ampio spettro di malattie umane, comprese le malattie infettive, le malattie genetiche e il cancro (Rowe R.G., 2019).

Adulte (ASCs): dette anche cellule staminali post-natali o somatiche, sono cellule indifferenziate presenti in tessuti specifici che si riproducono giornalmente per dare origine ad alcuni specifici citotipi. Sono cellule tendenzialmente multipotenti ma, con capacità non illimitate, provvedono al mantenimento dei tessuti e alla loro riparazione dopo un danno. A causa della loro natura proliferativa e della capacità di rigenerare i tessuti, le cellule staminali adulte hanno il potenziale per essere usate per trattare una varietà di malattie degenerative e l'invecchiamento cellulare (Cable J., 2020).

Esistono inoltre, cellule staminali non classificabili in questi tre gruppi perché possiedono caratteristiche comuni sia alle ESCs sia alle ASCs. Queste cellule sono quelle:

Fetali: cellule prelevate dal feto dopo aborto spontaneo. Hanno caratteristiche intermedie tra le cellule staminali embrionali e quelle adulte. Tendenzialmente sono pluripotenti, deputate all'accrescimento perinatale dei tessuti e possono essere facilmente ottenute senza problematiche etiche (Pozzobon M., 2014).

Amniotiche: si ritrovano nel liquido amniotico prelevato durante l'esame di amniocentesi che viene eseguito di solito tra la quindicesima e la diciottesima settimana di gravidanza. Queste cellule hanno caratteristiche biologiche molto simili alle cellule staminali embrionali ma, non sono soggette a problematiche di tipo etico come quelle embrionali. È stato visto che le cellule ritrovate nel liquido amniotico esprimono marcatori specifici comuni alle staminali embrionali e a quelle adulte e sono in grado di differenziare verso la linea osteogenica, miogenica, endoteliale, epatogenica, adipogenica e neurogenica (De Coppi P., 2007).

Degli Annessi embrionali: sono cellule pluripotenti che vengono prelevate dalla placenta e dal cordone ombelicale principalmente dopo il parto.

Tra queste ricordiamo anche le cellule staminali da villo coriale (PDMPCs) prelevate dai villi coriali che costituiscono il tessuto che dalla dodicesima settimana di gestazione darà origine alla placenta, l'organo che permette il nutrimento, la respirazione e lo smaltimento delle sostanze di scarto del feto. Le PDMPCs sono staminali mesenchimali, che conservano le capacità riproduttive tipiche delle staminali embrionali unite alla stabilità genomica delle cellule adulte e all'assenza di complicazioni etiche (Igura K., 2004). Inoltre, ci sono le cellule staminali da sangue del cordone ombelicale (CBSCs) ottenute dal sangue residuo della placenta e del cordone ombelicale sia in caso di parto spontaneo sia di taglio cesareo mediante un prelievo in circuito chiuso e sterile dalla vena ombelicale (Kern S., 2006). Le CBSCs sono una sorgente accessibile di cellule staminali multipotenti apparentemente non immunogeniche e non tumorigeniche che, una volta isolate, possono essere espanse e differenziare *in vitro* generando diversi citotipi funzionali utili a fini terapeutici.

1.1.2 Le cellule staminali embrionali e problemi di natura etica

Sia le ESCs sia le iPSCs mostrano un'enorme capacità differenziativa in molti, se non in tutti i tipi cellulari dell'organismo (Keller G., 2005). Ciò le rende un'ottima risorsa per la medicina rigenerativa per il trattamento di diverse patologie anche se, l'applicazione di queste cellule in terapia prevede una serie di problematiche, tra cui alcune di tipo etico-sanitario.

In particolare, tra le problematiche attualmente più significative abbiamo: la tumorigenicità, in quanto vi è il rischio che le cellule indifferenziate portino alla formazione di tumori (Leong W.K., 2013); la contaminazione del prodotto animale in quanto è previsto che tutti gli agenti terapeutici e le cellule usate per le terapie umane debbano essere prive di patogeni che possano suscitare una reazione immunitaria dopo trapianto nell'ospite; la compatibilità genetica e il tipo di cellule usate per il trapianto.

Alla luce di ciò, appare evidente come l'uso di cellule staminali embrionali o di cellule staminali/progenitrici fetali porti con sé una grande controversia bioetica.

1.1.3 Cenni bioetici e legislativi

L'utilizzo in medicina e nel campo della ricerca di base delle cellule staminali comporta in generale implicazioni di tipo etico da cui non si può prescindere. Le prime regole etiche, sancite dal Codice di Norimberga al termine della Seconda guerra mondiale, nel quale è stata tracciata una linea di divisione tra sperimentazione lecita e tortura, hanno portato nel 1971, alla fondazione del primo e più famoso istituto di ricerca etica americano e mondiale, il "*Kennedy Institute of Ethics*", con lo scopo di dettare, a tutela dell'essere umano, regole e codici comportamentali da seguire nelle sperimentazioni e nei *trial* clinici (Angeletti *et al.*, 2008, 3^oed.). L'etica collettiva, l'individualità personale, la religione, la scienza, la tradizione, la politica, sfere che indubbiamente coinvolgono in larga misura l'uomo moderno, offrono risposte diverse riguardo alla tematica dell'uso dell'embrione per l'approvvigionamento di cellule staminali. In Italia, il 28 marzo del 1990, con decreto del Presidente del Consiglio dei ministri, nasce il Comitato Nazionale per la Bioetica (CNB) cui sono state attribuite funzioni sia di consulenza presso il Governo, il Parlamento ed altre istituzioni sia di informazione nei confronti dell'opinione pubblica.

Gli anni successivi hanno visto la nascita dell'Unione Europea come entità politica a carattere sovranazionale e intergovernativo, fatto questo che ha spostato la questione bioetica da nazionale ad europea e che è culminata, il 31 marzo 2004, nell'emanazione della Direttiva 2004/23/CE sulla "definizione di norme di qualità e sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane". Nel 2006, sono state emanate altre due direttive: la 2006/17/CE e 2006/86/CE. Il Governo Italiano, con Decreto Legislativo n°16 del 25 Gennaio 2010, ha recepito le suddette direttive in attuazione della direttiva 2004/23/CE in materia di "prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umane, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane" (10G0030) (G.U. Serie Generale n. 40 del 18 febbraio 2010).

Nel marzo 2012, in attuazione del Decreto Legislativo n°16 del 25 gennaio 2010, è arrivato sul tavolo della Conferenza Stato Regioni lo schema di accordo tra Governo e Regioni sui

requisiti minimi per “la qualità e la sicurezza nella donazione, l’approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di:

a) tessuti e cellule umane;

b) prodotti fabbricati, derivati da tessuti e cellule umane, destinati ad applicazioni sull'uomo, qualora tali prodotti non siano disciplinati da altre direttive”.

Il testo indica puntigliosamente i requisiti organizzativi, strutturali e tecnologici che le strutture dovranno garantire per poter esercitare la loro attività in Italia, tenendo conto sia dell’evoluzione della normativa nazionale ed europea, sia del parere del Consiglio Superiore di Sanità. Nello specifico il decreto legislativo parla di:

a) cellule riproduttive: tutti i tessuti e le cellule destinati ad essere utilizzati ai fini della riproduzione assistita, nel rispetto delle disposizioni vigenti in materia di procreazione medicalmente assistita;

b) donazione da parte di un partner: la donazione di cellule riproduttive tra un uomo e una donna che rispettino i requisiti soggettivi di cui all'articolo 5 della legge 19 febbraio 2004, n. 40;

c) impiego diretto: qualsiasi procedura in base alla quale le cellule donate vengono utilizzate senza essere conservate;

d) sistema di qualità: la struttura organizzativa, le responsabilità, le procedure, i processi e le risorse destinati ad attuare la gestione della qualità, comprese tutte le attività che direttamente o indirettamente contribuiscono alla qualità;

e) gestione della qualità: le attività coordinate per dirigere e controllare un'organizzazione sul piano della qualità;

f) procedure operative standard (POS): istruzioni scritte che descrivono le fasi di un determinato processo nonché i materiali e i metodi da utilizzare e il prodotto finale previsto;

g) convalida o qualifica in caso di attrezzature o ambienti: la produzione di prove documentate, in grado di garantire con un elevato livello di certezza che determinati procedimenti, attrezzature o ambienti diano luogo a un prodotto conforme alle specifiche e alle caratteristiche qualitative prestabilite; un procedimento è convalidato al fine di valutare se il sistema funziona efficacemente in rapporto all'impiego previsto;

h) rintracciabilità: la possibilità di ricostruire il percorso di tessuti o cellule in ogni fase dell'approvvigionamento, della lavorazione, del controllo e dello stoccaggio fino alla distribuzione al ricevente o allo smaltimento, compresa la possibilità di risalire all'identificazione del donatore, dell'istituto dei tessuti o del centro di produzione che

ricevono o lavorano o stoccano i tessuti o le cellule, nonché, a livello delle strutture sanitarie, la possibilità di individuare i responsabili che applicano i tessuti o le cellule sui riceventi. Tale rintracciabilità riguarda anche la possibilità di reperire e identificare tutti i dati pertinenti relativi ai prodotti e ai materiali che vengono a contatto con detti tessuti o cellule;

i) critico: che ha potenzialmente effetto sulla qualità e/o la sicurezza di tessuti e cellule o è a contatto con i già menzionati;

l) organizzazione per l'approvvigionamento: una struttura sanitaria o una unità ospedaliera in cui si effettuano prelievi di tessuti e cellule umane, che può non essere autorizzata e accreditata come Istituto dei tessuti, fatto salvo quanto previsto dalla legge 12 agosto 1993, n. 301, recante norme in materia di prelievo ed innesti di cornea;

m) organizzazione responsabile dell'applicazione sull'uomo: una struttura sanitaria o una unità ospedaliera che esegue applicazioni sull'uomo di tessuti e cellule”.

Nel decreto viene altresì specificato che “il prelievo di tessuti e cellule umane deve essere effettuato esclusivamente da personale qualificato e adeguatamente formato, ai sensi della normativa vigente, a svolgere tali attività. Inoltre, materiali e attrezzature utilizzati per l'approvvigionamento vanno gestiti tenendo debitamente conto delle regolamentazioni, normative e linee guida nazionali ed internazionali, relative alla sterilizzazione di dispositivi e strumenti medici”. È interessante sottolineare che quanto previsto dal decreto legislativo si applichi solo per ciò che concerne le cellule staminali adulte. In Italia, infatti, lo studio sulle staminali è autorizzato e finanziato dallo Stato esclusivamente quando le ricerche svolte non implicano la distruzione di embrioni. Nello Stato italiano vige una normativa ambigua: infatti, se da un lato non è possibile prelevare cellule staminali embrionali poiché ciò comporterebbe l'illegale distruzione del feto, dall'altro è consentito acquistare suddette cellule fuori dai confini nazionali ed importarle nel nostro paese. La ricerca e l'utilizzo in ambito clinico delle cellule staminali è, quindi, soggetta e disciplinata da un rigido regolamento che, in molti casi, rappresenta un ulteriore ostacolo al progredire della conoscenza; le restrizioni maggiori nell'utilizzo delle cellule staminali riguardano tuttavia quelle derivanti dall'embrione. Risulta chiaro, pertanto, che per sopperire all'uso problematico di cellule staminali embrionali, si dovrà basare le ricerche sull'utilizzo delle cellule staminali adulte, in modo tale che la maggior parte dei problemi etici discussi fino ad ora verrebbero evitati con una più rapida applicazione nelle terapie cellulari umane.

1.1.4 Le Cellule staminali adulte (ASCs)

Le cellule staminali adulte (ASCs) sono distribuite in vari tessuti dell'intero organismo ed ognuna presenta comportamenti differenti a seconda del microambiente in cui si trova.

La loro funzione principale è quella di mantenere l'omeostasi cellulare e di sostituire cellule morte in seguito a lesioni o patologie. Le principali sedi di queste cellule sono il midollo osseo, il sangue periferico, il tessuto cerebrale, il midollo spinale, i vasi sanguigni, la polpa dentaria, il muscolo scheletrico, l'epidermide, gli epiteli dell'apparato digerente, la cornea, la retina, il fegato, il pancreas e il liquido amniotico (De Coppi P., 2007). Le ASCs possono essere identificate sulla base di proprietà indirette come l'espressione di uno specifico pool di marcatori di superficie e il loro utilizzo in questi ultimi anni trova l'interesse della comunità scientifica per sfruttare nel migliore dei modi le loro potenzialità per testare trattamenti terapeutici innovativi ed efficaci adatti alla cura di diverse patologie.

1.1.5 Fonti di cellule staminali adulte

A causa delle restrizioni etiche per quanto riguarda l'utilizzo delle cellule staminali embrionali in terapia cellulare, si stanno portando avanti attualmente numerosi studi in cui si predilige l'utilizzo di tessuti adulti come fonte primaria di cellule pluripotenti che si ritiene siano più sicure nell'applicazione clinica e il loro uso eticamente meno impegnativo (Prockop D.J., 2010; Lees J.S., 2012; Leong W.K., 2013; Kalladka D., 2014).

Le fonti autologhe, come il midollo osseo, le cellule prelevate dal midollo o le cellule pluripotenti residenti nei tessuti periferici sono con ogni probabilità una fonte potenzialmente utilizzabile per la riparazione tissutale in seguito a danni estesi.

Questo approccio ha l'evidente vantaggio di essere al riparo dalle possibili complicazioni derivanti dall'incompatibilità immunitaria: tali cellule possono infatti essere prelevate da qualsiasi tessuto del paziente, coltivate ed amplificate, portate ad una densità cellulare compatibile con l'estensione del danno tissutale e caratterizzate *in vitro* prima dell'uso, per valutare il loro potenziale differenziativo.

Esistono diverse fonti di cellule staminali adulte:

Midollo osseo: caratterizzato dalla presenza di tre diverse popolazioni di cellule staminali, quelle staminali ematopoietiche (HSCs), cellule staminali mesenchimali (MSCs) e progenitori endoteliali (EPCs). Le HSCs sono rare, tondeggianti, crescono in sospensione e grazie alla loro elevata capacità differenziativa possono dare origine a cellule del sistema ematopoietico e ad altri tipi cellulari quali cellule muscolari lisce e scheletriche, quando sottoposte a stimoli adeguati. Le HSCs, inoltre, sono in grado di autoriprodursi e di dare vita ad altre linee cellulari dalle quali, in seguito ad un processo maturativo e differenziativo, derivano tutte le cellule del sangue: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine; sono localizzate principalmente nel midollo osseo ma, è possibile reperirle anche nel sangue circolante, in seguito a regimi di mobilizzazione. Esse sono presenti anche nel sangue del cordone ombelicale del neonato al momento del parto.

Le MSCs sono cellule staminali multipotenti derivate dalla frazione stromale, non ematopoietica, del midollo osseo.

Le EPCs invece, costituiscono un'unica popolazione di cellule mononucleate del sangue periferico. La maggior parte di queste cellule, se sottoposte a adeguati stimoli è in grado di differenziare ed entrare nel sistema circolatorio contribuendo al processo di angiogenesi e alla riparazione del tessuto danneggiato.

Muscolo scheletrico: presenta cellule staminali muscolari. Queste cellule, dette cellule satelliti, sono normalmente quiescenti e sono localizzate al di sotto della membrana basale delle miofibre. Esse sono la principale risorsa di cellule miogeniche per la rigenerazione del muscolo scheletrico post-natale.

Tratto digestivo: presenta cellule staminali intestinali. Nell'esofago la proliferazione cellulare è confinata alla base dello strato epibasale. Nello stomaco, l'epitelio è ripiegato a formare la ghiandola gastrica e si pensa che le cellule staminali siano localizzate subito al di sopra delle fossette. Nell'intestino le cellule staminali sono localizzate in nicchie alla base delle cripte (Alison M.R., 2009).

Tessuto adiposo: è stato dimostrato essere una fonte abbondante, accessibile e ricca di cellule staminali mesenchimali adulte (ADSCs) che possiedono tutte le caratteristiche tipiche delle MSCs quali la morfologia fibroblastoide, la capacità di formare singole colonie denominate CFU-F, l'espressione del tipico set di marcatori di superficie, la multipotenza e la capacità di differenziare in cellule della linea mesodermica (Kern S., 2006), proprietà adatte per

l'ingegneria dei tessuti e applicazioni mediche rigenerative (Shingyochi Y., 2015; Sheykhhasan M., 2019).

Queste cellule vengono principalmente isolate secondo il metodo di Bunnell, dal grasso corporeo di pazienti obesi che si sottopongono a liposuzione addominale (Bunnell B.A., 2008), dalla quale si ottiene un lipoaspirato da cui le cellule vengono isolate e caratterizzate (Wilson A., 2019; Khazaei S., 2021).

Pancreas e fegato: presentano cellule staminali epatiche. Sia il pancreas che il fegato originano dall'endoderma; alcuni ricercatori sostengono che è una singola cellula progenitrice responsabile della loro generazione altri invece, sostengono che vi sono popolazioni multiple di cellule staminali in grado di produrre la molteplicità di cellule che compongono il fegato ed il pancreas (Bose B., 2012; Navarro-Tableros V., 2019).

Pelle: presenta cellule staminali epidermiche (SKPs) che sono deputate al rinnovamento dello strato più esterno dell'epidermide. Le cellule epiteliali costituiscono circa il 60% delle cellule differenziate dell'organismo e rivestono le superfici corporee interne ed esterne; pertanto, devono essere costantemente rinnovate e sostituite e ne esistono almeno tre tipi principali: epidermiche, follicolari e ghiandolari (Ghazizadeh S., 2001; Yan X., 2008).

Le SKPs sono state isolate per la prima volta nel 2001 dalla pelle di roditori ed utilizzate *in vitro* per dimostrare la loro multipotenza in quanto capaci di dare origine a una progenie neurale e mesodermica (Toma J.G., 2001). Solo in seguito, le SKPs sono state isolate ed amplificate anche da piccoli pezzi di pelle umana e si è osservato come anche queste fossero capaci di generare cellule sia neuronali sia mesodermiche, differenziando in neuroni, cellule gliali, cellule muscolari lisce e adipociti (Toma J.G., 2005).

Ghiandole mammarie: le cellule staminali possono risiedere nello strato di cellule apicali come piccole cellule non differenziate. Queste cellule sono in grado di aumentare sia le cellule apicali che le cellule mioepiteliali (Clarke R.B., 2003).

Rene: il rene ha un basso rinnovamento cellulare (turnover) in condizioni normali, ma può rigenerare un epitelio tubulare dopo una lesione. La papilla renale è stata proposta come nicchia per le cellule staminali (Alison M.R., 2009).

Polmone: è stato visto che non c'è solo una singola cellula staminale multipotente per l'intero organo ma ci sono differenti popolazioni di cellule staminali localizzate in diverse regioni del polmone (parte prossimale e parte distale) (Snyder J.C., 2009).

Sistema nervoso centrale: vi sono presenti cellule staminali neurali. Durante lo sviluppo le cellule neuroepiteliali generano neuroni e glia (astrociti e oligodendrociti) mentre, nel

cervello adulto un piccolo pool di cellule staminali neuronali sono presenti nella zona subventricolare del ventricolo laterale e del giro dentato dell'ippocampo (Doetsch F., 2003). Massa tumorale: è composta da un gran numero di cellule capaci di proliferare solo in maniera limitata e da una rara popolazione di cellule in grado di proliferare a lungo e mantenere vitale il tumore. Queste cellule sono state identificate come cellule staminali cancerose (CSCs) che mostrano la capacità di autorinnovarsi e di dare origine a cellule tissutali differenziate (Tan B.T., 2006). Pertanto, il tumore può essere visto come un "organo anomalo", nel quale una piccola popolazione di cellule staminali, che in condizioni fisiologiche risultano essere quiescenti, perdono i normali meccanismi di regolazione che garantiscono un corretto *self-renewal* cellulare. Esse danno origine a cellule staminali tumorali che contribuiscono alla crescita e alla progressione del tumore favorendo il processo di crescita, sviluppo e progressione del tumore (Bonnet D., 1997).

Tessuti periorali: (polpa dentaria, legamento parodontale, follicolo, gengiva, osso alveolare e papilla). In particolare, la polpa dentaria, è un tessuto orale non mineralizzato composto da tessuto connettivo molle, componenti linfatici, vascolari ed elementi nervosi situati nella cavità pulpare centrale di ciascun dente e contiene diversi tipi di cellule: sia di origine mesenchimale sia ectodermica ma anche, cellule della cresta neurale (Kerkis I., 2006; Kumar G.S., 2014; Nanci A., 2014). Nella polpa è possibile distinguere diversi strati: uno più esterno, costituito da odontoblasti generanti dentina; un secondo strato, chiamato "*Cell free zone*", povero in cellule ma ricco di fibre di collagene; un terzo strato, chiamato "*Cell rich zone*", costituito da cellule progenitrici e cellule indifferenziate, alcune delle quali staminali (Gronthos S., 2000). Le cellule appartenenti a quest'ultima zona possono migrare verso i vari distretti, in cui, sotto la spinta di diversi stimoli, possono dare origine a nuove cellule differenziate. La plasticità e la multipotenza di tali cellule possono essere correlate all'origine della polpa dentaria che ha luogo da tutti e tre i foglietti embrionali: ectoderma, mesoderma ed endoderma (Tirino V., 2012). La polpa dentaria dei terzi molari, nonostante i denti siano spesso considerati materiale di scarto, rappresenta un'ottima fonte di MSCs facilmente accessibile (Koyama N., 2009; Ranganathan K., 2012; Pisciotta A., 2015) e solo nel 2000 sono state identificate e isolate per la prima volta cellule staminali da polpa dentaria umana (hDPSCs), in base alle loro capacità clonogeniche e alla loro elevata velocità proliferativa (Gronthos S., 2000).

Successivamente sono stati isolati e caratterizzati più di quattro citotipi di MSCs derivanti dalla polpa dentaria tra cui: cellule staminali da denti decidui esfoliati (SHEDs), cellule

staminali del legamento periodontale (PDLSCs), cellule staminali della papilla apicale (SCAPs) e cellule precursori del follicolo dentale (DFPCs) (Lei M., 2014; Martinez Saez D., 2016; Zhai Q., 2019; Aydin S., 2019), tutti caratterizzati da multipotenza e capacità rigenerativa dei diversi tessuti dentali e periodontali sia *in vitro* sia *in vivo* (Saito M.T., 2015; Botelho J., 2017) e soprattutto capaci di promuovere la produzione di nuovi odontoblasti che, si pensa mediano la dentinogenesi riparativa (Sloan A.J., 2007; Kawashima N., 2016) al fine di creare possibili applicazioni in odontoiatria per la rigenerazione delle strutture dentali danneggiate (Tatullo M., 2015).

Le DPSC rappresentano una promettente fonte di MSCs per la riparazione dei tessuti anche al di fuori del dente. Uno dei principali vantaggi dell'uso delle DPSC è la facilità di isolamento in quanto, possono essere isolate in modo semplice durante procedure dentistiche di routine come l'eruzione di denti decidui o l'estrazione dei denti del giudizio inclusi (Egusa H., 2012; Mattei V., 2015) offrendo così una fonte promettente di cellule autologhe senza problematiche di tipo etico, in quanto il dente rimosso rappresenta un materiale di scarto e, grazie alla loro somiglianza con le BMSCs suggeriscono applicazioni in vari campi della medicina rigenerativa (Tatullo M., 2015; Mattei V., 2021).

Inoltre, è stato visto in diversi studi, come queste cellule possano sopravvivere in coltura per lunghi periodi ed essere mantenute per diversi passaggi senza dare segni di senescenza e possano essere crioconservate per lunghi periodi senza perdere la loro multipotenza, cosa molto vantaggiosa per la creazione di bio-banche cellulari (Laino G., 2005; Zhang W., 2006; Paes S.M., 2021).

1.1.6 Le Cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Tra le numerose tipologie di cellule staminali adulte, le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono sicuramente tra le più studiate. Le MSCs sono ASCs non-ematopoietiche di origine mesodermica e neuroectodermica, identificate e isolate per la prima volta nel compartimento stromale del midollo osseo (BMMSCs) (Friedenstein A.J., 1970; Charbord P., 2010), in grado di differenziare nella linea osteogenica. Solo nel 1991, Arnold Caplan introdusse per primo il termine cellule staminali mesenchimali (Caplan A.I., 1991).

Il midollo osseo, rappresenta attualmente la fonte maggiormente utilizzata di MSCs, tuttavia queste cellule sono state isolate anche da molti altri tessuti (Tabella 1) tra cui lo

stroma del midollo osseo, il periostio, le ossa trabecolari, il tessuto adiposo, il cervello, la polpa dentaria, i muscoli scheletrici, la cute, i tendini, la cartilagine articolare.

Si è visto in seguito, che dopo il trattamento con specifici stimoli e influenzate dal microambiente, esse sono capaci di differenziare in cellule di origine mesodermica come adipociti, condrociti e osteoblasti (Gronthos S., 1994; 1996; 2003; Jones E.A., 2002) ma anche, oltre ai lignaggi mesenchimali, in cellule endoteliali (Oswald J., 2004), in cellule muscolari scheletriche e cardiache (Wakitani S., 1995; Makino S., 1999; Schulze M., 2005; Rose R.A., 2008), in cellule neurali (Trzaska K.A., 2007; Tondreau T., 2008), in epatociti (Snykers S., 2009) e in cellule epiteliali (Phinney D.G., 2007) (Fig. 2).

È noto, infatti, che le MSCs possiedano un grado di plasticità maggiore (Caplan A.I., 1991) rispetto ad altre popolazioni di ASCs e che siano in grado di differenziare *in vitro* anche in linee cellulari non-mesodermiche come neuroni, motoneuroni e astrociti (Martellucci S., 2019; Gao S., 2019). La capacità trans-differenziativa permette alle MSCs di differenziare in cellule molto specifiche, passando da un cammino differenziativo ad un altro. Le MSCs oltre a rappresentare un'ideale risorsa di cellule staminali hanno altre importanti peculiarità, tra cui quella di poter essere facilmente purificate e amplificate in laboratorio in condizioni standard di coltura ed essere crioconservate senza incorrere in problematiche di natura bioetica. Queste loro potenzialità insieme all'ampia capacità proliferativa, alla multipotenza e all'elevato potenziale di differenziamento rende le MSCs candidate interessanti per la rigenerazione tissutale e il loro possibile utilizzo per la ricerca di base e per l'applicazione in terapia cellulare per la cura di molte patologie umane.

FONTE-TESSUTO	REFERENZE
Stroma del midollo osseo	Jones E.A., 2002
Periostio	Fukumoto T., 2003
Ossa trabecolari	Song L., 2005
Tessuto adiposo	Gronthos S., 2001; Tobita M., 2011
Cervello	Gage F.H., 2000
Polpa dentaria	Shi S., 2005
Muscolo scheletrico	Tamaki T., 2020
Cute	Medina R.J., 2006
Tendini	Salingcarnboriboon R., 2003
Cartilagine articolare	Alsalameh S., 2004

Tabella 1. Elenco dei tessuti da dove sono state principalmente isolate MSCs.

1.1.7 Potenziale differenziativo delle MSCs e loro applicazione in medicina rigenerativa

Sia le cellule staminali embrionali che le cellule staminali mesenchimali sono in grado di differenziare verso linee cellulari di diversi tessuti e organi e, per questo motivo, rappresentano un supporto essenziale per la rigenerazione tissutale (Shostak S., 2006).

Il processo differenziativo richiede la sincronizzazione di due eventi contrapposti tra loro quali la repressione e l'up-regolazione di geni che determinano rispettivamente il mantenimento dello stato di staminalità o il differenziamento verso una determinata linea cellulare (Zipori D., 2004).

Il destino delle cellule staminali è controllato pertanto da specifici segnali, presenti nella nicchia in cui le cellule risiedono e che determinano l'attivazione o la repressione dei diversi processi differenziativi. L'ampia capacità proliferativa, la multipotenza, l'elevato potenziale differenziativo, la capacità di riparare tessuti adulti danneggiati in risposta a stimoli locali, il trofismo e il potere antinfiammatorio rendono le MSCs cellule ideali per la rigenerazione-riparazione tissutale (Scintu F., 2006) infatti, per tale motivo, esse sono considerate delle ottime candidate in medicina rigenerativa, in terapia cellulare ed in ingegneria dei tessuti poiché si crede fermamente potranno essere usate per la ricostruzione dei tessuti e organi danneggiati (Rohban R., 2017; Han Y., 2019; Robey P.G., 2021).

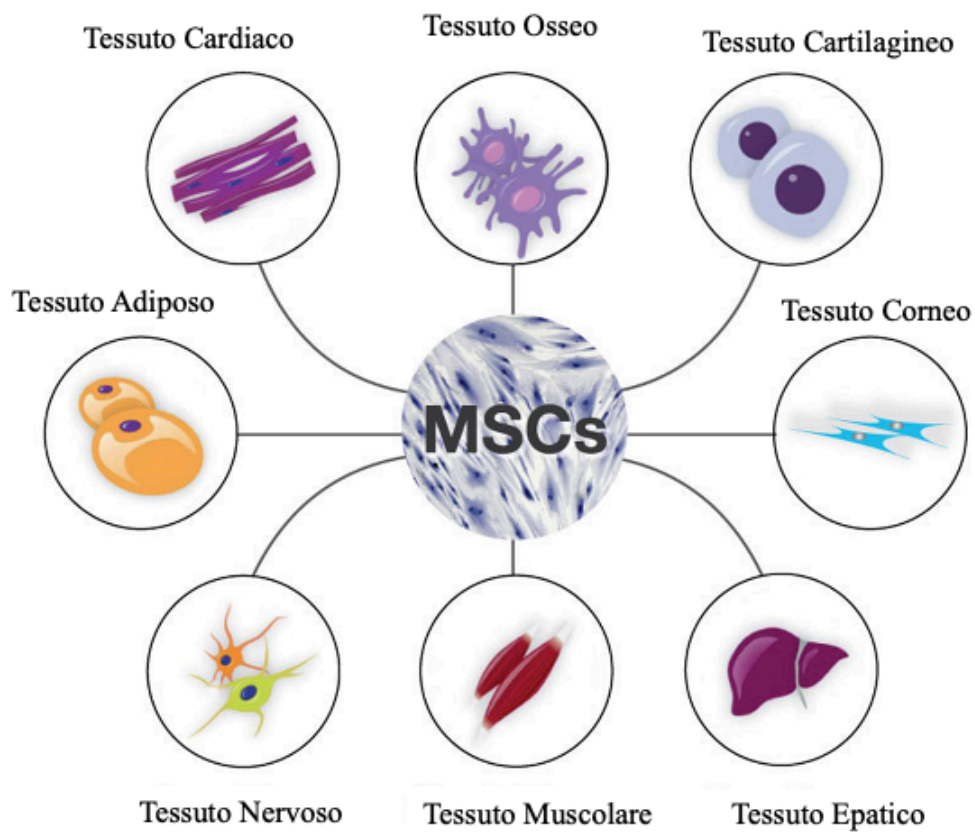


Figura 2. Potenziale differenziativo di cellule staminali mesenchimali per la riparazione di vari tessuti.

1.1.8 Cellule staminali e terapia cellulare

Tra i principali campi di applicazione delle MSCs troviamo la terapia cellulare, procedura che rientra tra le cosiddette terapie avanzate, in grado di offrire nuove opportunità di trattamento. Nello specifico, si utilizzano cellule staminali per la riparazione e la rigenerazione di diversi tessuti e organi danneggiati.

I tessuti danneggiati possono essere rigenerati *in vivo* mediante il trapianto di cellule sane in grado di auto replicarsi (Si Z., 2019). Le cellule staminali ideali per le applicazioni in medicina rigenerativa devono però soddisfare specifiche caratteristiche:

- essere presenti in elevate quantità;
- essere di facile reperibilità con tecniche poco invasive;
- essere in grado di differenziare in diverse linee cellulari in maniera riproducibile;
- poter essere trapiantate con efficacia e in modo sicuro sia in ospiti autologi che allogenici;
- e infine, devono poter essere manipolate in modo da soddisfare le linee guida di *Good Manufacturing Practices* (GMP) che sono un insieme di regole, procedure e linee guida in base alle quali vengono prodotti medicinali, dispositivi medici, prodotti per la diagnostica, cibi e sostanze farmacologicamente attive (Sensebé L., 2013).

Per la terapia cellulare possono essere utilizzate sia le ESCs sia le ASCs anche se l'utilizzo di quelle embrionali nelle applicazioni cliniche è molto problematico poiché la loro estrazione e la loro manipolazione sono soggette a regolamentazioni di tipo etico che ne limitano l'utilizzo. Per questo motivo una promettente alternativa per la terapia cellulare con le cellule staminali embrionali è rappresentata dall'utilizzo di cellule staminali adulte, più facilmente reperibili, non soggette a restrizioni etiche e capaci di essere reimpiantate in maniera autologa annullando tutte quelle reazioni immunologiche legate al rigetto. Le ASCs tendenzialmente sono tessuto specifiche, sono in grado di auto replicarsi e di differenziare in tipi cellulari del tessuto in cui risiedono. In particolare, tra quelle adulte le MSCs possiedono diverse caratteristiche che le rendono utilizzabili al meglio per la terapia cellulare, infatti, non hanno alcun potenziale tumorigenico, sono facilmente reperibili con tecniche poco invasive e inoltre sono una sorgente autologa di cellule prelevabili dallo stesso paziente annullando il rischio di rigetto.

2.1 Angiogenesi

L'*Angiogenesi* (=dal greco *angêion*: vaso, e *gênesis*, nascita) è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli già esistenti ed è coinvolto nella regolazione di processi sia fisiologici, sia patologici (Mattei V., 2021). L'angiogenesi prevede la crescita, la differenziazione e la migrazione delle cellule che rivestono la parete interna dei vasi sanguigni (cellule endoteliali). Tali cellule sono particolarmente attive durante lo sviluppo embrionale mentre, in un adulto il loro turnover è molto lento e limitato a particolari fenomeni fisiologici, quali l'ovulazione, i processi di riparazione tissutale e di cicatrizzazione (Carmeliet P., 2003). Questo processo è finemente controllato da un equilibrio tra fattori di crescita specifici, detti fattori pro-angiogenici e anti-angiogenici (Tabella 2).

Questi fattori si legano ai recettori presenti normalmente sulla superficie delle cellule endoteliali, sia in condizioni fisiologiche (guarigione delle ferite, ciclo riproduttivo femminile) sia in condizioni patologiche (crescita del tumore) (Melincovici C.S., 2018; Hanahan D., 2011). Il legame tra il fattore di crescita e il corrispondente recettore stimola la crescita cellulare favorendo la formazione e la sopravvivenza di nuovi vasi sanguigni.

Lo studio dell'angiogenesi è di fondamentale importanza quando si parla di medicina rigenerativa e la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base della rigenerazione dei vasi sanguigni è necessaria per definire strategie terapeutiche efficaci e fattibili. I meccanismi di regolazione dei processi di angiogenesi, vasculogenesi e arteriogenesi rappresentano un punto chiave per la riparazione e la rigenerazione di numerosi tessuti anche di quelli naturalmente avascolari come la cartilagine (Marsano A., 2016). Inoltre, si sa che per promuovere la formazione di vasi funzionali, è essenziale la partecipazione ma anche, l'interazione tra diversi tipi cellulari come le cellule endoteliali, le cellule progenitrici endoteliali, i macrofagi, i periciti etc.... (Hur J., 2004).

PRO-ANGIOGENICI	ANTI-ANGIOGENICI
Angiogenina	Angioarrestina
Angiopoietina- 1	Angiotensina
a-FGF	Tumstatina
b-FGF	Interferoni
Eritropoietina	Angiostatina
TNF- α (bassi livelli)	TNF- α (alti livelli)
Interleuchina-8	Interleuchina-12
VEGF	Inibitori tissutali delle metalloproteasi
PlGF	Vasculostatina
PDGF	Endostatina
Prostaglandine E1, E2	Inibitori dell'attivatore del plasminogeno
TGF- α e TGF- β	Trombospondina

Tabella 2. Alcuni fattori regolatori endogeni dell'angiogenesi.

2.1.1 Caratteristiche dell'angiogenesi

Il sistema circolatorio ha il compito di trasportare i nutrienti e l'ossigeno ai tessuti e di eliminare le scorie metaboliche, garantendone così il corretto funzionamento. Questo sistema inizia a formarsi nelle prime fasi dello sviluppo embrionale attraverso il processo di vasculogenesi, definito come la formazione *de novo* di vasi sanguigni da cellule precursori chiamate angioblasti che migrano e si differenziano in risposta a segnali locali (Risau W., 1997). Il processo di angiogenesi invece, consiste nella generazione di nuovi vasi a partire da quelli esistenti; i vasi si ramificano e si diffondono, formando strutture più complesse.

I vasi sanguigni sono costituiti da diversi tipi di cellule: cellule endoteliali a diretto contatto col sangue; periciti subendoteliali; cellule della muscolatura liscia; fibroblasti; membrana basale e matrice extracellulare.

Le cellule endoteliali che formano i vasi sanguigni sono praticamente quiescenti e hanno una lunga emivita nell'individuo adulto. Nei vasi maturi, le cellule endoteliali sono circondate da cellule della parete di supporto che li stabilizzano, la cui natura dipende dal tipo di vaso e dalla sua posizione anatomica (Jain R.K., 2003). Le cellule murali che si trovano nei capillari e nelle venule post capillari sono i periciti, cellule indifferenziate con funzione di supporto e potenzialmente utili nella rigenerazione mentre, le cellule muscolari lisce si trovano nei vasi più grandi (Fig. 3).

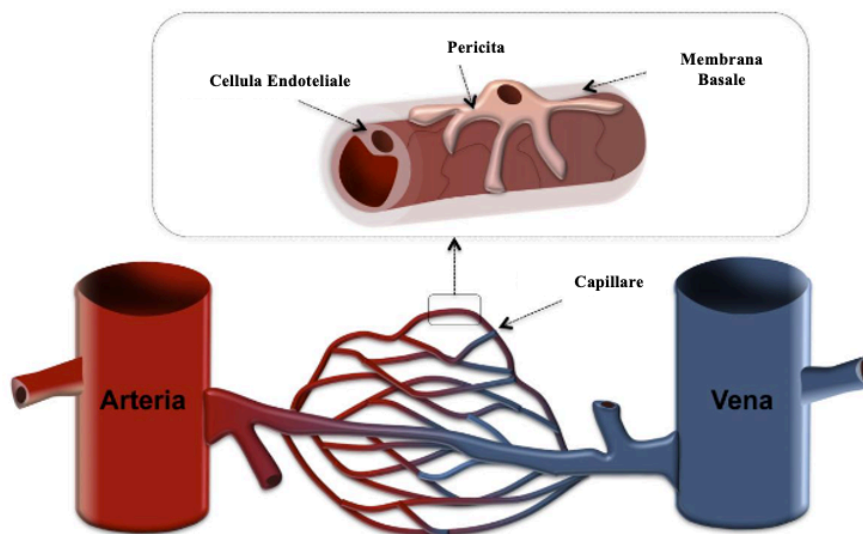


Figura 3. I periciti si trovano intorno ai capillari e alle venule all'interno della membrana basale a stretto contatto con le cellule endoteliali.

La formazione di un vaso è un meccanismo molto complesso che passa attraverso diversi stadi ben definiti (Lee J.O., 1995), caratterizzato da modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare e si articola in tappe ben precise (Fig. 4).

Nelle fasi iniziali del processo angiogenetico, in seguito alla liberazione, da parte di un tessuto, di mediatori pro-angiogenici, come i fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFs), si verifica una "destabilizzazione" dei vasi preesistenti dovuta ad un aumento della permeabilità vasale ed una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali; i periciti a loro volta, si dissociano dall'endotelio e la membrana basale viene degradata dall'azione delle metalloproteinasi della matrice extracellulare (MMP). Segue una seconda fase di migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali nel punto del tessuto dove è necessaria la formazione di nuovi vasi, durante la quale vengono liberati vari enzimi proteolitici che alterano la densità della matrice extracellulare allo scopo di facilitare l'attività migratoria delle cellule endoteliali. Il terzo stadio dell'angiogenesi corrisponde alla differenziazione delle cellule endoteliali ed è caratterizzato da arresto della proliferazione cellulare e

formazione di capillari primitivi. L'ultima tappa di maturazione funzionale è caratterizzata dal reclutamento di cellule periendotheliali di supporto quali periciti e cellule muscolari lisce, nonché alla riorganizzazione delle interazioni cellulari (Carmeliet P., 2011).

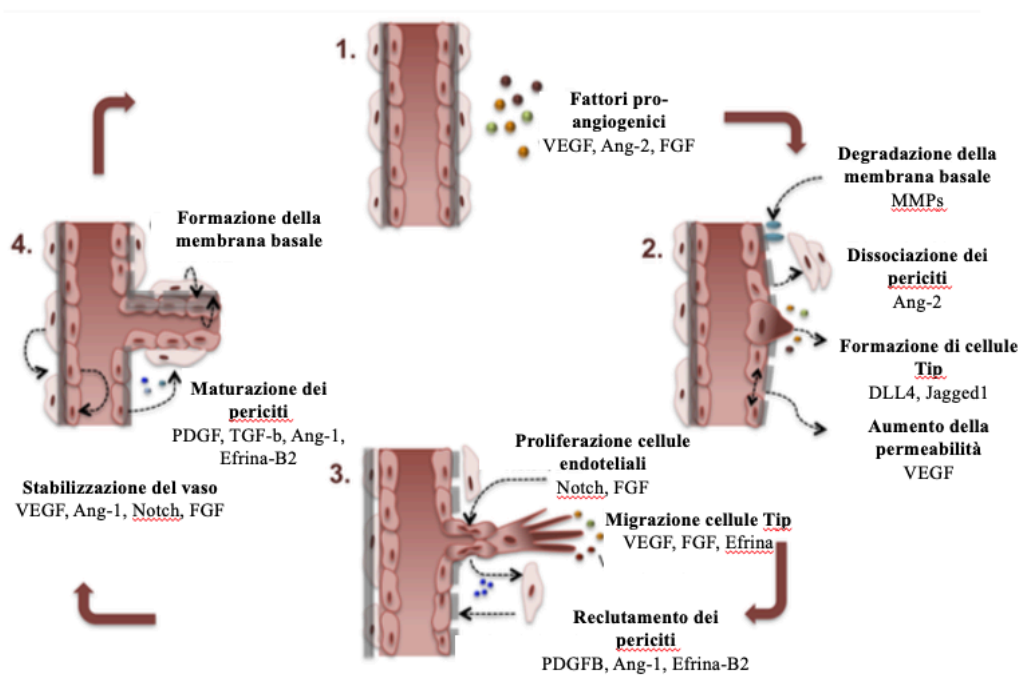


Figura 4. Fasi del processo angiogenetico: 1. Vaso sanguigno quiescente; 2. Fase di attivazione; 3. Fase di allungamento; 4. Fase di risoluzione/maturazione.

2.1.2 I Periciti: morfologia e distribuzione

I periciti furono descritti per la prima volta nel 1871 da Eberth, che li definì cellule avventizie ramificate situate intorno ai capillari sanguigni (Eberth C.J., 1871). Due anni dopo, il ricercatore francese, Charles-Marie Benjamin Rouget, descrisse per primo l'esistenza di una popolazione di cellule contrattili non pigmentate associate alla parete dei piccoli vasi sanguigni che vennero chiamate inizialmente "cellule di Rouget" (Rouget M.C., 1873; 1879). Solo in seguito, nel 1923, grazie ai primi studi di microscopia condotti da Zimmermann, venne introdotto per queste cellule il termine "periciti" (dal greco peri: intorno; cyte: cellula) per la loro posizione anatomica situata attorno ai capillari di numerose specie (Zimmermann K.W., 1923). Tuttavia, sono in uso anche altre denominazioni, sebbene meno specifiche, come quella di "cellule murali" (Bergers G., 2005; Armulik A., 2011; van Dijk C.G., 2015) e di "cellule CD146+" (Covas D.T., 2008; Esteves C.L., 2017). Zimmermann propose inoltre che, esistessero diversi sottotipi di periciti classificati in base alla loro morfologia, posizione all'interno della rete vascolare e funzione (Zimmermann K.W., 1923; Dore-Duffy P., 2008; Krueger M., 2010).

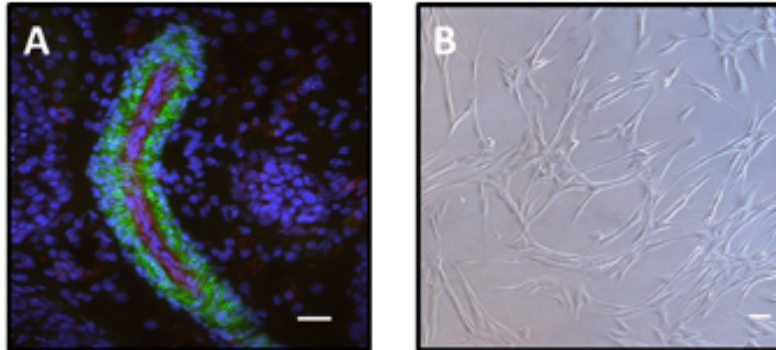
I periciti si differenziano sia per la loro origine embrionale sia tra i tessuti e anche all'interno dello stesso organo. È importante sottolineare che i periciti di tessuti distinti possono differire nella loro distribuzione, morfologia, espressione di marcatori molecolari, plasticità e funzioni; e, anche all'interno dello stesso organo in cui vi sono varie sottopopolazioni di periciti (Birbrair A., 2018). Durante le fasi di sviluppo embrionale, i periciti cerebrali e retinici hanno origine dalla cresta neurale neuroectodermica mentre, cellule simili del tronco del corpo, derivano dal mesoderma (Mills S.J., 2013).

Queste cellule presentano a livello morfologico un nucleo prominente e un piccolo volume citoplasmatico che si differenzia a seconda dei diversi organi. Possono essere grassi, allungati o stellati con molteplici processi citoplasmatici, oppure arrotondati e compatti (Armulik A., 2005). I periciti sono presenti in tutti i tessuti vascolarizzati e sono incorporati nella membrana basale dei piccoli vasi sanguigni, compresi i capillari, le arteriole precapillari e le venule post-capillari (Winkler E.A., 2011) (Fig. 5 A, B).

I periciti circondano le cellule endoteliali e comunicano con esse lungo la lunghezza dei vasi sanguigni attraverso giunzioni gap che consentono lo scambio di piccole molecole e ioni (Birbrair A., 2018). I periciti sono ancorati alle cellule endoteliali attraverso placche di adesione mentre, i contatti a piolo e alveolo consentono alle cellule di penetrare in

discontinuità nella membrana basale dei vasi in contatto tra loro (Hirschi K.K., 1997; Bergers G., 2005).

L'ampia distribuzione dei periciti in stretta associazione con la vascolarizzazione corporea (Fig. 5 C) fa sì che queste cellule possano essere utilizzate in prima linea nelle risposte di riparazione dei tessuti, in cui hanno dimostrato di essere attivamente coinvolte sia direttamente, differenziandosi in cellule mesenchimali specializzate, sia indirettamente da interazioni cellula-cellula o rilascio di mediatori paracrini inclusi quelli legati all'angiogenesi e all'immunoregolazione, due processi fondamentali per la riparazione e la rigenerazione dei tessuti (Balabanov R., 1999; Gnecci M., 2008; Dulmovits B.M., 2012).



C

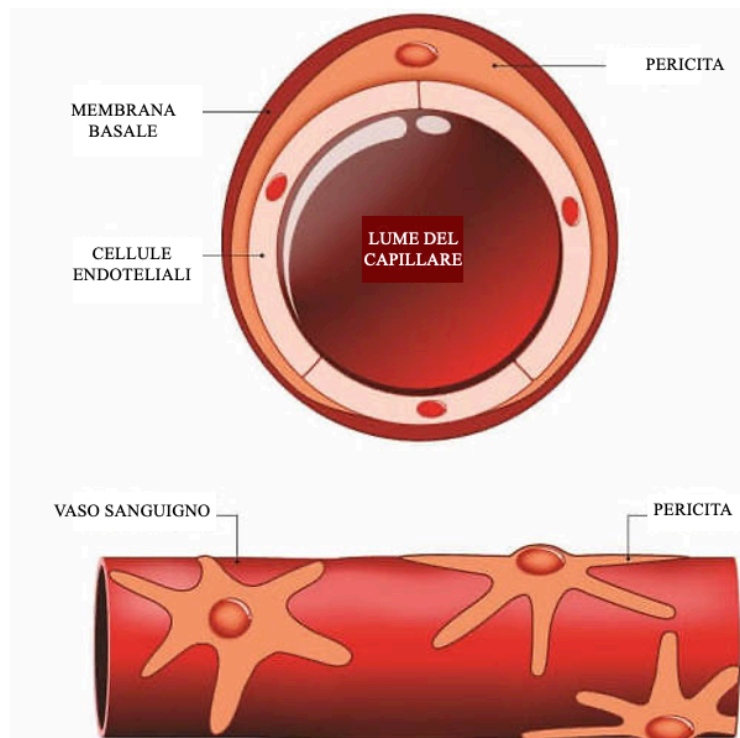


Figura 5. Anatomia del pericita e struttura del vaso. (A) Periciti equini marcati per NG2 (in verde) che circonda lo strato endoteliale visualizzato mediante colorazione con un anticorpo CD144 (in rosso) e DAPI utilizzato per colorare i nuclei delle cellule. (B) Periciti in coltura. *Scale bar* 50 μ m (Esteves C.L., 2018). (C) distribuzione.

2.1.3 Periciti: funzioni canoniche, disfunzioni e funzioni innovative

I periciti sono cellule staminali reticoloistocitarie pluripotenti, localizzate sotto la membrana basale e vanno a circondare l'endotelio. I periciti svolgono un ruolo fondamentale nell'angiogenesi e contribuiscono in particolari condizioni alla formazione, al rimodellamento e alla stabilizzazione delle pareti dei microvasi: capillari, arteriole terminali e venule post-capillari (Gerhardt H., 2003).

Le principali funzioni di queste cellule nei processi fisiologici sono:

- il mantenimento dell'integrità e della senescenza delle cellule endoteliali (Bergers G., 2005);
- la transregolazione del tono vascolare o il potenziale differenziativo in altre cellule (Różycka J., 2017);
- la regolazione dell'angiogenesi, la stabilizzazione dei vasi, l'angioarchitettura durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC) e il rimodellamento vascolare (Winkler E.A., 2010; Armulik A., 2011; Arnold T.D., 2014; Różycka J., 2017);
- la riduzione del processo apoptotico e stabilizzazione dei vasi in associazione con le cellule endoteliali (Różycka J., 2017);
- la regolazione del flusso sanguigno (Tilton R.G., 1979);
- la regolazione dell'omeostasi endoteliale/vascolare (Díaz-Flores L., 2009);
- la stabilizzazione anatomica sia della barriera emato-encefalica (BBB) sia della barriera emato-retinica (BRB) (Rucker H.K., 2000). I periciti controllano l'espressione delle proteine della giunzione stretta e aderente della BBB endoteliale, l'allineamento delle proteine della giunzione stretta e la transitosi del flusso di massa delle vescicole piene di liquido attraverso la BBB (Daneman R., 2010; Armulik A., 2010; Bell R.D., 2010).

Inoltre, è stato indagato il ruolo dei periciti anche in condizioni patologiche. Una loro disfunzione e/o degenerazione porta alla rottura della BBB causando l'accumulo cerebrale di molecole neurotossiche derivate dal sangue (Bell R.D., 2010; Winkler E.A., 2012; Winkler E.A., 2014). Danni ischemici dei periciti provocano rigore contrattile e ostruzione del flusso sanguigno capillare (Yemisci M., 2009; Hall C.N., 2014). Inoltre, è stato visto che la degenerazione dei periciti svolge probabilmente un ruolo nella disfunzione cerebrovascolare presente nelle malattie neurodegenerative complesse come il morbo di

Alzheimer (AD) (Sagare A.P., 2013; Halliday M.R., 2013; Halliday M.R., 2016), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (Winkler E.A., 2013), l'ictus ischemico, il trauma cranico, i tumori, il morbo di Parkinson (PD) (Erdener Ş.E., 2019), la microangiopatia e la retinopatia correlate al diabete mellito di tipo 2 (Gerald P., 2009; Behl Y., 2009; Alikhani M., 2010). La disfunzione dei periciti è stata associata anche ad altre patologie come: l'AIDS (Niu F., 2014), l'epilessia (Marchi N., 2013), l'arteriopatia cerebrale autosomica dominante con infarto sottocorticale e leucoencefalopatia (Ghosh M., 2015) e al cancro al cervello (Wang F., 2015; Heldin C.H., 2013). Per questo, si ipotizza fortemente che, queste cellule in futuro potranno avere un ampio potenziale applicativo in campo terapeutico e in medicina rigenerativa, in varie patologie e soprattutto nei modelli difettosi dell'angiogenesi (Wong S.P., 2015; Różycka J., 2017; Mattei V., 2021).

Come discusso in precedenza, oltre alle funzioni canoniche che vedono i periciti coinvolti nella regolazione e nel mantenimento della vascolarizzazione, è stato visto recentemente che queste cellule possono avere una funzione innovativa che è paragonabile a quella delle cellule staminali.

Studi *in vitro* hanno suggerito che i periciti in coltura, per la loro plasticità, hanno un potenziale simile alle cellule staminali multipotenti (Dore-Duffy P., 2008; Nakagomi T., 2015). Inoltre, utilizzando i periciti murini primari isolati dal cervello in seguito a ictus ischemico è stato osservato come queste cellule abbiano un'attività paragonabile a quella delle cellule staminali multipotenti andandosi a differenziare in cellule della linea neurale e vascolare (Nakagomi T., 2015) ma anche, in cellule simili a fagociti, condrociti, adipociti, miociti e osteoblasti (Paquet-Fifiield S., 2009; Farrington-Rock C., 2004), rendendole molto simili alle MSCs (Crisan M., 2008; Feng J., 2011; de Souza L.E., 2016) e per questo classificate come "MSCs del microcircolo".

2.1.4 Periciti: caratterizzazione e similarità con le MSCs

I periciti esprimono diverse proteine contrattili e citoscheletriche come, per esempio, l' α -actina del muscolo liscio (α -SMA), la vimentina, la desmina, la miosina e la nestina (Armulik A., 2011; Hamilton N.B., 2010; Attwell D., 2016) e antigeni di superficie cellulare quali proteoglicano transmembrana condroitin solfato NG2, recettore beta del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR β), aminopeptidasi A e N (CD13), regolatore del segnale 5 della proteina G (RGS5), CD146 (Bondjers C., 2006; Krueger M., 2010; Armulik A., 2011; van Dijk C.G., 2015) che, vengono utilizzati come marcatori più comuni per la caratterizzazione dei periciti (Ozerdem U., 2001; Crisan M., 2008; Rózycka J., 2017). In alcuni studi è stato riportato come esistano marcatori comuni sia ai periciti sia alle MSCs mostrando così una forte similarità (da Silva Meirelles L., 2008). Per questo, i periciti microvascolari potrebbero essere considerati una fonte di MSCs, in grado di mobilitarsi in seguito a lesioni e/o malattie, per esercitare il loro potenziale di staminalità mesenchimale gettando le basi per il loro futuro utilizzo terapeutico (Wong S.P., 2015; Caporarello N., 2019).

2.1.5 Periciti: potenziale applicazione in medicina rigenerativa

Il crescente interesse per la biologia dei periciti e il loro possibile impiego nel campo della medicina rigenerativa con lo scopo di utilizzarli per sostituire o rigenerare i tessuti danneggiati, deriva da recenti prove che dimostrano come le loro caratteristiche li rendano simili alle MSCs (Crisan M., 2008; Feng J., 2011; de Souza L.E., 2016). L'uso delle MSCs in medicina rigenerativa sta prendendo molto slancio, basta vedere il numero di studi clinici attualmente in corso in tutto il mondo (658 studi registrati solo negli Stati Uniti) e l'approvazione del loro uso già in diverse applicazioni terapeutiche in malattie come l'artrite degenerativa e l'ortopedia (Corea del Sud e USA), il morbo di Crohn (Corea del Sud), l'infarto post acuto del miocardico (Corea del Sud e India) (Trounson A., 2015; Van Pham P. 2016) e in studi clinici in corso in cui si stanno utilizzando mesoangioblasti (un sottotipo di periciti) nei pazienti affetti da distrofia (Cossu G., 2015). Sono stati condotti numerosi studi per dimostrare la sovrapposibilità delle MSCs ai periciti e, recentemente, Caplan ha ipotizzato che le MSCs/periciti derivino da cellule perivascolari in risposta a lesioni o infiammazioni dei vasi sanguigni.

Questi periciti/MSCs sono presenti in tutti i vasi del nostro corpo e, in risposta ai cambiamenti del microambiente, secernono fattori specifici che servono a regolare importanti funzioni riparative nel sito della lesione (Caplan A.I., 2008).

La scoperta che i periciti sono controparti *in vivo* delle MSCs ha posto queste cellule perivascolari sotto i riflettori della ricerca, facendo sperare in una fonte cellulare ben caratterizzata, per applicazioni cliniche, alternativa alle MSCs attualmente in uso (Esteves C.L., 2018).

Alla luce di ciò è sempre più attuale l'interesse per queste cellule in campo traslazionale al fine di perseguire l'obiettivo di sostituire o rigenerare i tessuti danneggiati attraverso l'uso di fonti alternative di MSCs indotte a differenziare in periciti.

2.1.6 Periciti e DPSC

Come già detto in precedenza, le cellule staminali più promettenti per la terapia cellulare sono le cellule staminali mesenchimali, tra cui spiccano quelle derivate dalla polpa dentaria (DPSC) per il loro potenziale rigenerativo (Fig. 6) e per la più facile modalità di reperibilità ed estrazione. Infatti, è stato dimostrato che le DPSC possiedono un'elevata capacità differenziativa dovuta alla loro origine eterogenea (Phinney D.G., 2007).

È stato dimostrato inoltre, che le DPSC sono simili ai periciti, esprimono anche esse i marcatori NG2 e α -SMA (Janebodin K., 2013) mentre, non esprimono marcatori endoteliali come CD31 o il fattore di von Willebrand (vWF).

Inoltre, sono capaci di differenziare in una linea peri-vascolare quando co-coltivate con cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) (Parthiban S.P., 2020). Pertanto, le DPSC hanno un fenotipo simile alle cellule perivascolari e sembra possano supportare il processo di vasculogenesi e angiogenesi non solo secernendo fattori pro-angiogenici come il VEGF, ma anche differenziandosi in endotelioцитi e periciti (Zou T., 2019; Delle Monache S., 2019; Sasaki J.I., 2020).

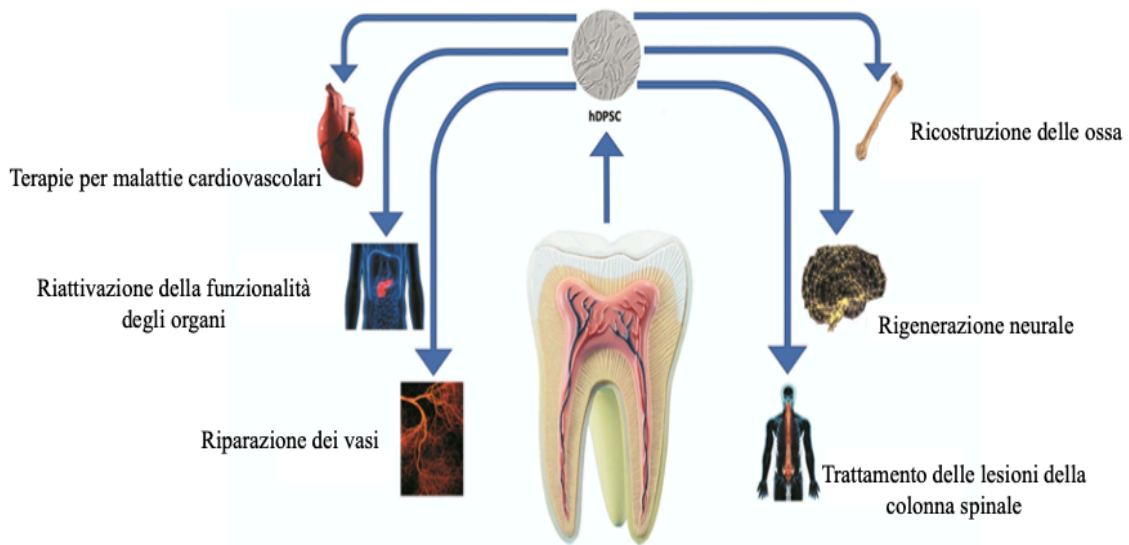


Figura 6. Capacità differenziativa e potenziale rigenerativo delle cellule staminali della polpa dentaria.

2. Scopo della ricerca

Alla luce di quanto detto fin ora l'obiettivo di questo progetto di ricerca è stato quello di andare ad esplorare le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle MSCs umane isolate dalla polpa dentaria (DPSC). Le DPSC sono cellule staminali derivate dall'ectoderma con proprietà di cellule staminali mesenchimali (Nutti N., 2016). Le DPSC sono cellule dotate di una elevata capacità differenziativa proprietà dovuta alla loro origine eterogenea, caratteristica che le rende potenzialmente capaci di differenziare in diverse citotipi e di essere utilizzate nei campi dell'ingegneria dei tessuti e della medicina rigenerativa (Rodríguez-Lozano F.J.,2011).

Attualmente non si conosce ancora bene la via che porta al differenziamento delle DPSC in periciti ed è proprio per questa ragione che ho focalizzato la mia ricerca sull'analisi dei meccanismi che regolano questo processo.

L'obiettivo di questo progetto è stato quello di andare a studiare:

- la capacità di diversi terreni di coltura di condizionare le DPSC verso un fenotipo simile ai periciti con particolare attenzione all'interazione tra periciti e cellule endoteliali che è un paradigma di stabilizzazione dei vasi.
- Valutare mediante la realizzazione di co-culture 3D utilizzando come substrato le HUVEC, la capacità delle DPSC di promuovere la formazione e stabilizzazione di strutture simil-endoteliali.
- Investigare quali fattori solubili presenti nel terreno endoteliale favoriscano il differenziamento delle DPSC in periciti.
- Isolare possibili sub-popolazioni positive per NG2 per poterle poi utilizzare in campo applicativo per la realizzazione di *scaffold* biocompatibili per la rigenerazione di tessuti endoteliali danneggiati.

3. Materiali e metodi

3.1 Etica della ricerca

Le DPSC utilizzate per questo progetto sono state ottenute dalla polpa dentaria prelevata dal terzo molare incluso di giovani pazienti selezionati, di età compresa tra i 13 ed i 19 anni, affetti da disodontiasi (difficoltà nell'eruzione di elementi dentari, in genere dovuta a mancanza di spazio utile o all'orientamento scorretto del dente), per i quali il terzo molare incluso rappresentava materiale di scarto e, quindi, di facile reperibilità ai fini della ricerca. A tutti i soggetti dopo aver spiegato l'entità e le modalità dello studio, è stato fornito un modulo di consenso informato da sottoscrivere in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e il protocollo sperimentale approvato in data 26 gennaio 2017 dal Comitato Etico dell'Azienda Policlinico Umberto I di Roma (Codice identificativo del progetto CE: 4336).

3.2 Estrazione della polpa dentaria e separazione delle cellule staminali

Il dente una volta estratto, è stato sezionato con una fresa dentale, mediante taglio coronale passante parallelo al tetto della camera pulpale (Mattei V., 2015; Martellucci S., 2019 b) e la polpa presente è stata delicatamente prelevata in condizioni sterili con un piccolo escavatore e raccolta in una provetta con terreno di coltura del tipo Dulbecco a bassa concentrazione di glucosio (L-DMEM) (Euroclone, Milano, Italia) supplementato con L-Glutammina (Euroclone, Milano, Italia), penicillina/streptomina 1% (Euroclone, Milano, Italia) e anfotericina 0,1% (Merck, Milano, Italia) e trasferita in laboratorio entro 2 ore dall'estrazione. Una volta in laboratorio, la polpa è stata lavata tre volte in tampone fosfato isotonico (PBS) (Euroclone, Milano, Italia) e centrifugata per 10 minuti a 2500xg.

Al termine il sovrantante è stato rimosso e la polpa risospesa in Hank's solution (Invitrogen, Monza, Italia) e collocata in una piastra Petri in cui è stata divisa in piccoli pezzi con bisturi sterile e successivamente incubata per 2 ore a 37 °C in CO₂ al 5%.

Successivamente, il mezzo di coltura è stato rimosso mediante centrifugazione per 10 minuti a 2500xg, il pellet risospeso con collagenasi di tipo IV (Merck, Milano, Italia) allo 0,1% in DMEM e incubato per 15 minuti a 37°C in CO₂ al 5%. Al termine del tempo, il campione è

stato centrifugato per 10 minuti a 2500xg, il sovrnatante rimosso e il pellet risospeso e messo in fiasche di coltura da 25 cm³ (Sarstedt, Milano, Italia) con terreno di coltura L-DMEM completo supplementato con siero fetale bovino (FBS) (Euroclone, Milano, Italia) al 10% (Fig. 7).

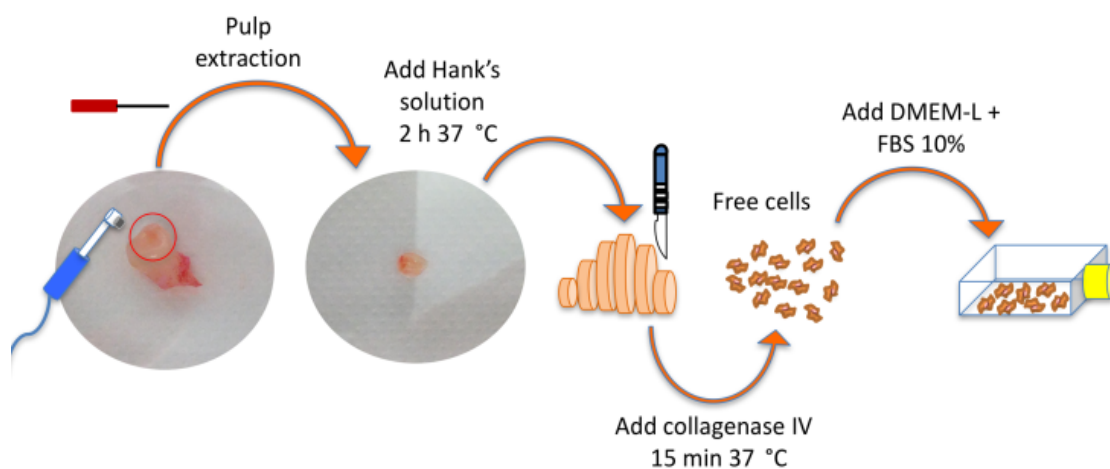


Figura 7. Estrazione della polpa dentaria e separazione delle cellule staminali: dalla fresatura del terzo molare incluso alla messa in coltura.

Una volta che le cellule sono state messe in coltura abbiamo osservato al microscopio ottico, già a 1 giorno di crescita, la formazione di diversi cloni di cellule aderenti organizzati nella tipica struttura a Rosetta (Fig. 8 A) dalla quale le cellule, dalla morfologia fibroblastoide, hanno iniziato a staccarsi e ad accrescersi fino a raggiungere la massima confluenza già dopo circa 7 giorni (Fig. 8 B, C). Una volta raggiunta la massima confluenza, le cellule sono state staccate dalla fiasca con tripsina-EDTA 0,01M (Euroclone, Milano, Italia) e centrifugate per 6 minuti a 259xg. Il sovrnatante è stato completamente rimosso e le cellule risospese in terreno di coltura completo e messe in nuove fiasche, da 25 cm³, a 37°C in CO₂ al 5%. Dopo circa una settimana di coltura, le cellule in adesione hanno mostrato una significativa attività proliferativa: ogni tre giorni, infatti, le cellule raggiungevano la confluenza e per questo sono state propagate e utilizzate per i diversi esperimenti.

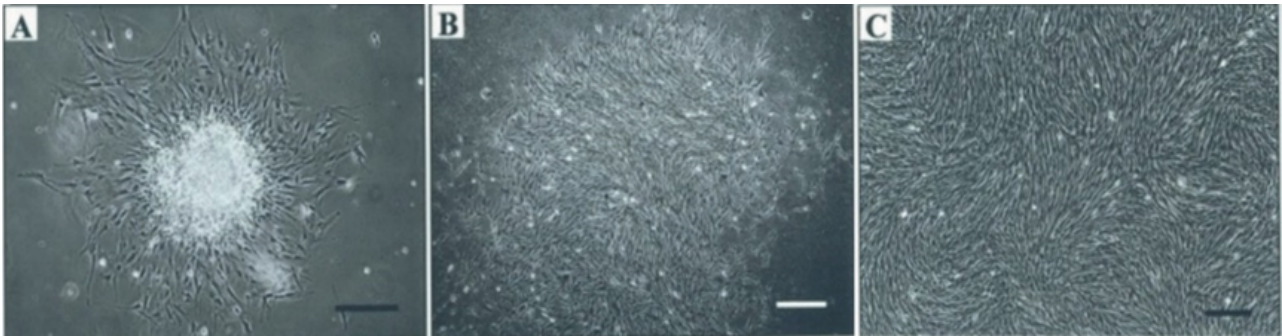


Figura 8. Analisi al microscopio ottico della coltura primaria DPSC coltivata a 1 gg (A), 5 gg (B) e 7 gg (C) dalla separazione dalla polpa. *Scale bar* 100 μ M.

3.3 Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali da polpa dentaria

Le cellule ottenute dalla polpa, dopo la messa in coltura, tra il 14-21 giorno, sono state caratterizzate fenotipicamente mediante citofluorimetria per i tipici marker di staminalità mesenchimale. Le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% a 4°C per 10 minuti e dopo un lavaggio, incubate per 1 ora a 4°C con anticorpi (Abs) per la caratterizzazione proteica quali: anti-mouse CD90, anti-mouse CD44 (Millipore, Milano, Italia), anti-mouse CD73 (Cell Signaling Technology, Danvers) e anti-mouse CD105 (BD Biosciences, Milano, Italia) e, in seguito marcate con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG H&L coniugato con ficoeritrina (PE) (Abcam, Cambridge, USA) per 45 minuti al buio a temperatura ambiente (RT). Tutti i marcatori di staminalità tipici (CD44, CD73, CD90, CD105) (Ullah I., 2015) sono risultati positivi al 75-80%, rispetto agli antigeni ematopoietici usati come controlli negativi: CD34 (Miltenyi Biotec, Bologna, Italia), CD19 e CD14 (Merck Millipore, Milano, Italia) (Gan L., 2020) (Fig. Supplementare 1).

3.4 Linee cellulari e condizioni di crescita

Le DPSC estratte dalla polpa dentaria sono state utilizzate per gli esperimenti dal 6 al 12 passaggio e coltivate in terreno L-DMEM completo con FBS al 10% a 37°C in CO₂ al 5%. Le cellule sono state poi piastrate e incubate in diverse condizioni di coltura per due settimane in modo tale da avere diversi campioni trattati:

1. DPSC sono state incubate con terreno endoteliale completo (BulletKit™ EGM-2) (cellule staminali della polpa dentaria condizionate con EGM-2 (E-DPSC), preparato utilizzando il terreno basale endoteliale (EBM)-2 con l'integrazione di idrocortisone, FGF umano, VEGF, fattore di crescita simile all'insulina (IGF)-1, acido ascorbico, fattore di crescita epidermico (EGF), gentamicina/amfotericina (GA)-1000 ed eparina secondo il datasheet del terreno (Lonza, Walkersville, USA), FBS al 10% (Euroclone, Milan, Italy) a 37°C in CO₂ al 5%;
2. DPSC sono state coltivate in DMEM completo integrato con FBS al 10% (DMEM DPSC condizionato (D-DPSC).
3. Altre DPSC invece, sono state incubate solo con il terreno endoteliale basale EBM-2 a cui sono stati aggiunti regolarmente IGF-1, acido ascorbico, GA-1000 ed eparina ed addizionati singolarmente al terreno rispettivamente EGF, FGF e VEGF.

Abbiamo inoltre, utilizzato Cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) (Lonza, Walkersville, USA) coltivate di routine in terreno di crescita endoteliale EGM-2 (Lonza, Walkersville, USA) e usate per gli esperimenti dal 3 al 12 passaggio.

3.5 Separazione immunomagnetica della sottopopolazione NG2+ da DPSC

Le DPSC coltivate rispettivamente in EGM-2, EBM-2 supplementato con FGF e DMEM sono state separate immunomagneticamente mediante MACS Cell Separation Kit (Miltenyi Biotec, Bologna, Italia). Le DPSC (5×10^7 cellule/ml) nelle diverse condizioni di coltura, dopo essere state raccolte, sono state passate attraverso un filtro di nylon da 40 μ M per rimuovere i grumi cellulari, contate e lavate con 300 μ l di Separation Buffer preparato con PBS pH 7.2 supplementato con 0,5% di BSA e 2 mM di EDTA, per 10 minuti a 300xg e successivamente

incubate con MicroBeads coniugate con anticorpo monoclonale anti-NG2 umano per 30 minuti a 4°C in rotazione lenta e continua. Al termine, le cellule sono state lavate per 10 minuti a 300xg, il sovrinatante è stato rimosso e le cellule risospese in 500 µl di buffer. Successivamente, per la separazione è stata utilizzata una Colonna LS MACS, precedentemente attivata, posta nel separatore MidiMACS (Miltenyi Biotec, Bologna, Italia) e la sospensione cellulare è stata fatta passare attraverso la colonna per separare le due sottopopolazioni: DPSC NG2- e DPSC NG2+ (Fig. 9).

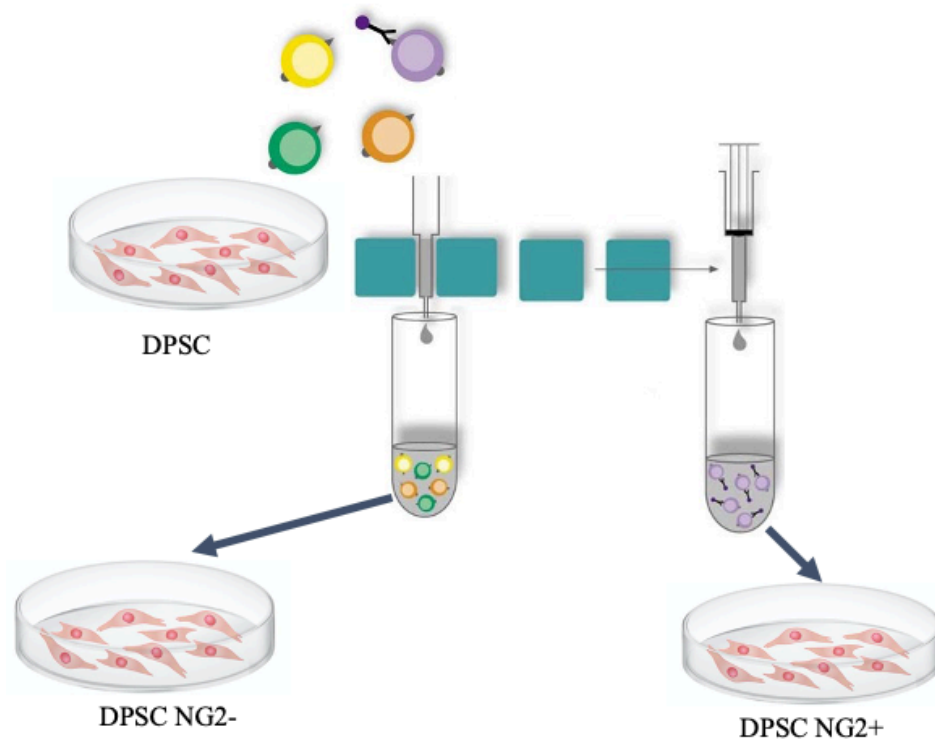


Figura 9. Separazione immunomagnetica dei cloni NG2+ e NG2- da DPSC.

3.6 Valutazione quantitativa di strutture simili a isole su matrice extracellulare

Le DPSC giovani (6-7 passaggio), le D-DPSC e le E-DPSC sono state seminate su piastre *multiwell* contenenti una matrice extracellulare (EC) (Merck Millipore, Milano, Italia) dopo polimerizzazione in presenza di terreni specifici con bassa concentrazione sierica. Dopo 18 ore, le cellule hanno formato delle strutture simili a isole e sono state coltivate rispettivamente per 24 ore, 48 ore e 7 giorni e poi fissate in paraformaldeide al 4%.

Le strutture formate sono state analizzate per valutare la capacità di *sprouting*, mediante l'uso di un *software* dell'angiogenesi all'interno del programma *ImageJ* (Eglinger J., 2017).

3.7 Analisi Citofluorimetrica

Per gli esperimenti di caratterizzazione fenotipica sono stati utilizzati campioni di DPSC, trattate e non trattate. I pellet sono stati fissati con paraformaldeide al 4% a 4°C per 10 minuti, lavati con PBS e incubati rispettivamente con un Ab monoclonale anti-mouse CD34 coniugato con allofocianina (APC) (Miltenyi Biotec, Bologna, Italia), con Ab monoclonale anti-mouse CD90 (Merck Millipore, Milano, Italia), con un Ab monoclonale anti-mouse NG2 (Santa Cruz Biotechnology, Germany), con un Ab monoclonale anti-calponina (Abcam, Cambridge) e con Ab monoclonale anti-mouse CD73 (Cell Signaling Technology), per 1 ora a 4°C e, in seguito, incubati con anti-mouse IgG H&L coniugato con ficoeritrina (PE) (Abcam, Cambridge) per ulteriori 45 minuti al buio a RT.

Inoltre, è stata eseguita una doppia marcatura in cui le DPSC, trattate e non trattate, sono state incubate con Ab monoclonale anti-mouse CD73 (Cell Signaling Technology) e Ab anti-mouse NG2 (Santa Cruz Biotechnology, Germany) per 1 ora a 4°C e in seguito marcate con anti-mouse IgG H&L coniugato con PE per 45 minuti al buio a RT.

Anche i pellet dei cloni DPSC NG2+ e DPSC NG2- ottenuti con la separazione, sono stati fissati con paraformaldeide al 4% e, dopo lavaggio, incubati con un Ab primario anti-mouse NG2 (Santa Cruz Biotechnology, Germany) per 1 ora a 4°C e successivamente con Ab secondario anti-mouse IgG H&L coniugato con PE (Abcam, Cambridge) per 45 minuti al buio a RT. Tutti i campioni sono stati analizzati con un citofluorimetro BD Accuri C6 (BD

Accuri, Milano, Italia) dotato di un laser blu (488 nm) e di un laser rosso (640 nm). Per le varie analisi sono stati acquisiti almeno 2×10^4 eventi.

3.8 Western Blot

I lisati cellulari, ottenuti da tutti i gruppi sperimentali delle popolazioni HUVEC e DPSC, sono stati utilizzati per l'analisi Western Blot. Le cellule sono state sospese in un tampone di lisi contenente 1% di Triton, 0,1% di sodio dodecil solfato (SDS), 2 mM CaCl_2 e 100 mg/mL di PMSF. Il contenuto proteico è stato determinato utilizzando il Protein Assay Kit 2 (Bio-Rad Lab, Hercules, CA). Ogni lisato proteico è stato normalizzato per peso ed è stato caricato un quantitativo di 30 μg per campione. I campioni in esame sono stati separati elettroforeticamente su gel di poliacrilammide all'8% (SDS-PAGE). Una volta terminata la corsa elettroforetica i campioni sono stati trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Whatmann, Dassel, Germania) che è stata poi bloccata con una soluzione di PBS/Tween milk 5% per 1 ora a RT. La membrana è stata incubata con Ab monoclonale anti-mouse NG2 (Santa Cruz Biotechnology, Germany) over night a 4°C in oscillazione e, il giorno dopo utilizzato l'anticorpo secondario anti-mouse IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP) (Cell Signaling). L'immunoreattività è stata valutata utilizzando il sistema di rilevamento chemiluminescente (Euroclone, Milano, Italia) e come controllo del carico proteico è stato utilizzato l'anticorpo anti-gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH).

3.9 Saggio di formazione dei tubuli di co-culture di DPSC e HUVEC

Per il test di angiogenesi *in vitro* (o formazione dei tubuli), sono state seminate le HUVEC (1×10^4 cellule/pozzetto) da sole e in co-cultura rispettivamente con E-DPSC e D-DPSC (3×10^3 cellule/pozzetto) su microslide da 15 pozzetti della Ibidi (Monaco, Germania) polimerizzati con EC Matrix (Merck Millipore, Milano) (10 μl /pozzetto) secondo le indicazioni del produttore, nei media EGM-2 (Lonza). Le cellule sono state incubate a 37°C in CO_2 al 5% e abbiamo monitorato nel tempo (0, 24, 48 ore e 7 giorni) la formazione della rete vascolare, fotografando mediante un microscopio dotato di fotocamera (Nikon) ed

eseguendo un'analisi quantitativa con un software di analisi dell'angiogenesi *ImageJ*. Per gli esperimenti, per valutare il diverso comportamento delle HUVEC, da sole e in co-coltura, abbiamo realizzato un *timelaps* in cui le E-DPSC sono state lavate con PBS, centrifugate e premarcate con calceina (2 mg/mL) colorante fluorescente verde, per 10 minuti. Dopo l'incubazione, le cellule sono state centrifugate, lavate con PBS e seminate in co-coltura con HUVEC e successivamente osservate a microscopio (Life Technology Floyd), per valutare la loro capacità di formare e/o stabilizzare reti vascolari confrontando le immagini scattate a più tempi, la lunghezza totale del tubulo, il *Mesh index* (=lunghezza totale dei segmenti master/numero di segmenti master) e la percentuale di ritenzione della lunghezza totale del tubulo delle HUVEC sia da sole sia in co-coltura con D-DPSC e E-DPSC.

Gli stessi esperimenti sono stati realizzati utilizzando HUVEC da sole e in co-coltura utilizzando rispettivamente DPSC di controllo e i singoli cloni: DPSC NG2+ e DPSC NG2-. Abbiamo anche in questo caso, realizzato un *timelaps* in cui le DPSC, le DPSC NG2+ e le DPSC NG2- sono state lavate con PBS, centrifugate e premarcate con calceina (2 mg/mL) per 10 minuti. Dopo l'incubazione, le cellule sono state centrifugate, lavate con PBS e seminate in co-coltura con le HUVEC e successivamente osservate a microscopio (Life Technology Floyd), per valutare la loro capacità di supportare la formazione e/o stabilizzare reti vascolari formate *ex novo* nel tempo, confrontando le immagini scattate a più tempi (0, 24, 48 ore e 7 giorni) e la percentuale di ritenzione della lunghezza totale del tubulo delle HUVEC sia da sole sia in co-coltura con DPSC e con i cloni DPSC NG2+ e DPSC NG2-.

3.10 Immunofluorescenza

Campioni ottenuti dalle co-culture di HUVEC e E-DPSC sono stati seminati su EC Matrix e dopo 18 ore, sono stati fissati con paraformaldeide al 4% a 4°C per 10 minuti, lavati con PBS e permeabilizzati con una soluzione di 0,1% Triton-X-100 (Merck, Milano, Italia) per 10 minuti a RT. Dopo il lavaggio, le cellule sono state incubate per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario anti-mouse NG2 (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:500 in una soluzione di PBS/BSA al 3%. Il giorno dopo, il vetrino con le cellule è stato lavato con PBS e incubato con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG marcato con fluoresceina (1:100 in PBS/BSA al 3%) per 30 minuti a RT. Alla fine del tempo sono stati effettuati 3 lavaggi da 10 minuti l'uno in PBS e il vetrino è stato montato con il mezzo di montaggio VECTASHIELD

contenente DAPI ed analizzato con microscopio a fluorescenza Axio Vert. A1 (Zeiss, Milano, Italia) per verificare l'avvenuto differenziamento in periciti.

3.11 Saggio di migrazione

La sottopopolazione DPSC NG2+ è stata mantenuta in coltura rispettivamente in EGM-2, EBM-2+FGF e DMEM per due settimane. I tre campioni DPSC NG2+ nei diversi terreni di coltura sono stati utilizzati sia in condizione di controllo sia dopo trattamento per 24 ore con l'inibitore del recettore del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR), AZD4547, ed è stata determinata la capacità di migrazione utilizzando il test della camera *transwell* (piastra da 24 pozzetti, dimensione dei pori di 8 mm). Entrambi i pellet dei cloni DPSC NG2+ e DPSC NG2- (1×10^5 cellule/mL) sono stati risospesi in terreno privo di siero. 150 μ L di sospensione cellulare è stata aggiunta alla camera superiore dell'inserito trans pozzetto posto in una piastra complementare. Abbiamo diluito l'inibitore FGFR a 1 e/o 2 mM in terreno privo di siero e abbiamo aggiunto 150 μ L di questa soluzione alle cellule nella camera superiore dell'inserito in un volume finale di 300 μ L. Il terreno privo di siero è stato aggiunto agli inserti non trattati. Nella camera inferiore di ciascun inserto, abbiamo aggiunto 800 μ L di DMEM contenente FBS al 5% come chemiotattico. Le cellule sono state lasciate migrare attraverso filtri rivestiti per 16-18 ore. Le cellule attaccate alle superfici della membrana inferiore sono state fissate con metanolo e colorate con *Crystal Violet* allo 0,1% p/v in borato 0,1 M, pH 9,0 ed etanolo al 2% v/v per 20 minuti a RT. Le cellule sono state contate con microscopio ottico standard (400x) registrando il numero di cellule ottenuto dalla media di cinque campi casuali. Sono stati usati filtri tripli e gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato.

3.12 Analisi statistica

Per l'analisi quantitativa sono stati determinati i valori medi e la deviazione standard per i conteggi del numero di vasi formati, per il *mesh index* e per la lunghezza del tubulo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i dati sono stati analizzati con il test del *t-student*.

4. RISULTATI

4.1 Differenti condizioni di coltura modificano il fenotipo delle DPSC

Le cellule utilizzate per gli esperimenti (DPSC) mostrano tutte un fenotipo simile a quello delle MSCs risultando CD44+, CD105+, CD73+, CD90+ e CD14-, CD19-, CD34- (Huang G.T., 2009). Abbiamo coltivato queste cellule per due settimane in DMEM (D-DPSC) e EGM-2 (E-DPSC) e osservate al microscopio per vedere l'effetto delle diverse condizioni di coltura sul loro possibile differenziamento in periciti. Confrontando la morfologia delle cellule è stato visto che le cellule coltivate in EGM-2, presentano una struttura più allungata, simil-tubulare che si mantiene abbastanza stabile nel tempo, cosa invece non osservata in quelle coltivate in terreno basale (Fig. 10). Inoltre, per investigare la capacità funzionale di queste cellule di formare strutture vascolari abbiamo eseguito un saggio di *sprouting* a diversi tempi sia in condizioni basali sia dopo incubazione in terreno endoteliale (Fig. 11 A). Abbiamo visto che le E-DPSC hanno una maggiore capacità di *sprouting* rispetto alle D-DPSC risultante nella formazione di un maggiore numero di prolungamenti, già a 24 ore (Fig. 11 B). Abbiamo visto inoltre, che dopo pochi giorni, anche le E-DPSC hanno iniziato a formare strutture a forma di tubulo, con diverse isole collegate con ponti cellulari e queste strutture sono rimaste visibili fino a 7 giorni di coltura, cosa non presente nelle D-DPSC e confermata anche dall'analisi quantitativa (Fig. 11 B) dove sono riportati a diversi tempi per le tre linee cellulari il numero di prolungamenti formato dalle DPSC.

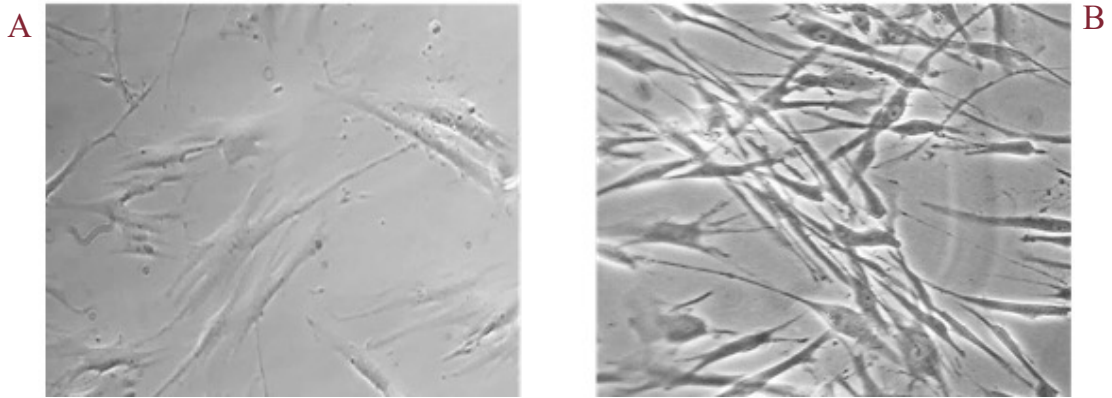
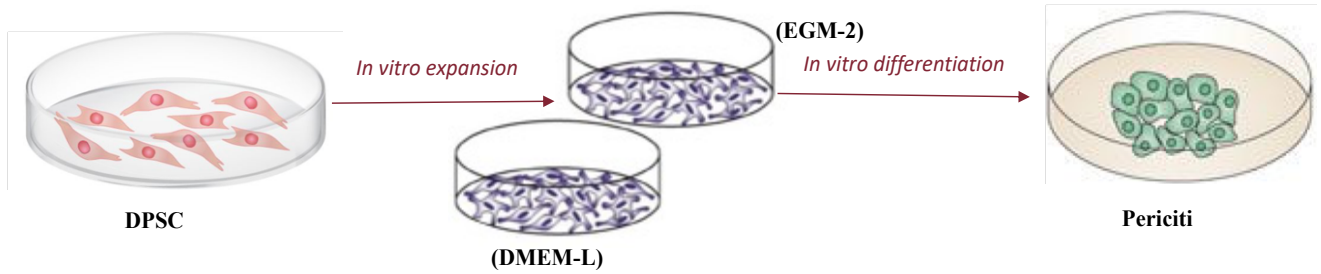


Figura 10. Analisi morfologica delle DPSC dopo trattamento con diversi terreni di coltura. (A) DPSC coltivate in DMEM basale (D-DPSC); (B) DPSC coltivate in EGM-2 (E-DPSC). *Scale bar* 100 μ M.

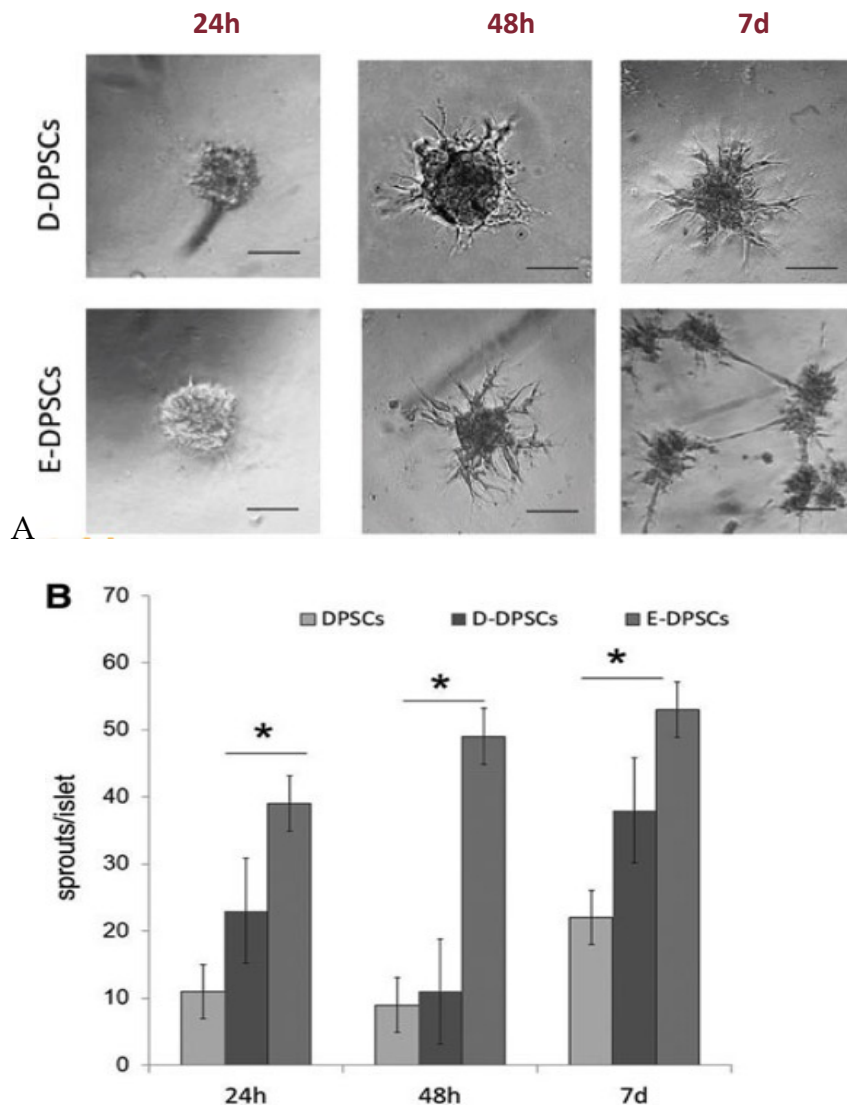


Figura 11. "Sprouting ability" delle DPSC. (A) Le DPSC coltivate in condizioni diverse sono state seminate in EC Matrix e la loro crescita è stata seguita da 24 ore a 7 giorni. Vengono mostrate immagini rappresentative di colture cellulari (aggregati cellulari) a 24, 48 ore e 7 giorni per ogni diverso tipo di cellula. (B) Per l'esperimento mostrato in (A), è stato misurato il numero medio di prolungamenti per ciascun tipo di cellula in tempi diversi. Scale bar 100 μ M.

Per verificare le caratteristiche fenotipiche che distinguono le E-DPSC dalle D-DPSC abbiamo proceduto con le analisi citofluorimetriche e western blot per marcatori selezionati. Come si può osservare in Fig. 12 A, abbiamo osservato che sia le D-DPSC che le E-DPSC esprimono bassi livelli di CD34 (marker pre-endoteliale) mentre, le E-DPSC sono risultate significativamente diverse dalle D-DPSC mostrando da un lato una diminuzione del marcatore di staminalità CD90 (17% *vs* 58%) e dall'altro, un aumento del marcatore pericitico NG2 (71% *vs* 45%). Inoltre, la calponina, marker delle cellule muscolari lisce, era assente in entrambe le popolazioni cellulari. Nella Fig. 12 B invece, è mostrato il risultato di una doppia marcatura per CD73 e NG2. Abbiamo visto che sebbene nella popolazione E-DPSC l'espressione di CD73 sia leggermente diminuita rispetto alle D-DPSC (80% *vs* 94%), il numero di cellule NG2+ CD73+ è aumentato (75% *vs* 52%) (Fig. 12 B) a conferma del fatto che c'è un pool di cellule che, pur mantenendo le caratteristiche di staminalità, mostrano un indirizzamento verso il fenotipo simil pericitico. I dati sono stati confermati anche dall'analisi Western Blot in cui si è osservata una maggiore espressione di NG2 nelle E-DPSC rispetto alle DPSC giovani e alle D-DPSC (Fig. 12 C), a riprova del fatto che differenti condizioni di coltura (uso di EGM-2) sono in grado di stimolare l'arricchimento della popolazione di DPSC iniziale con cellule simili ai periciti.

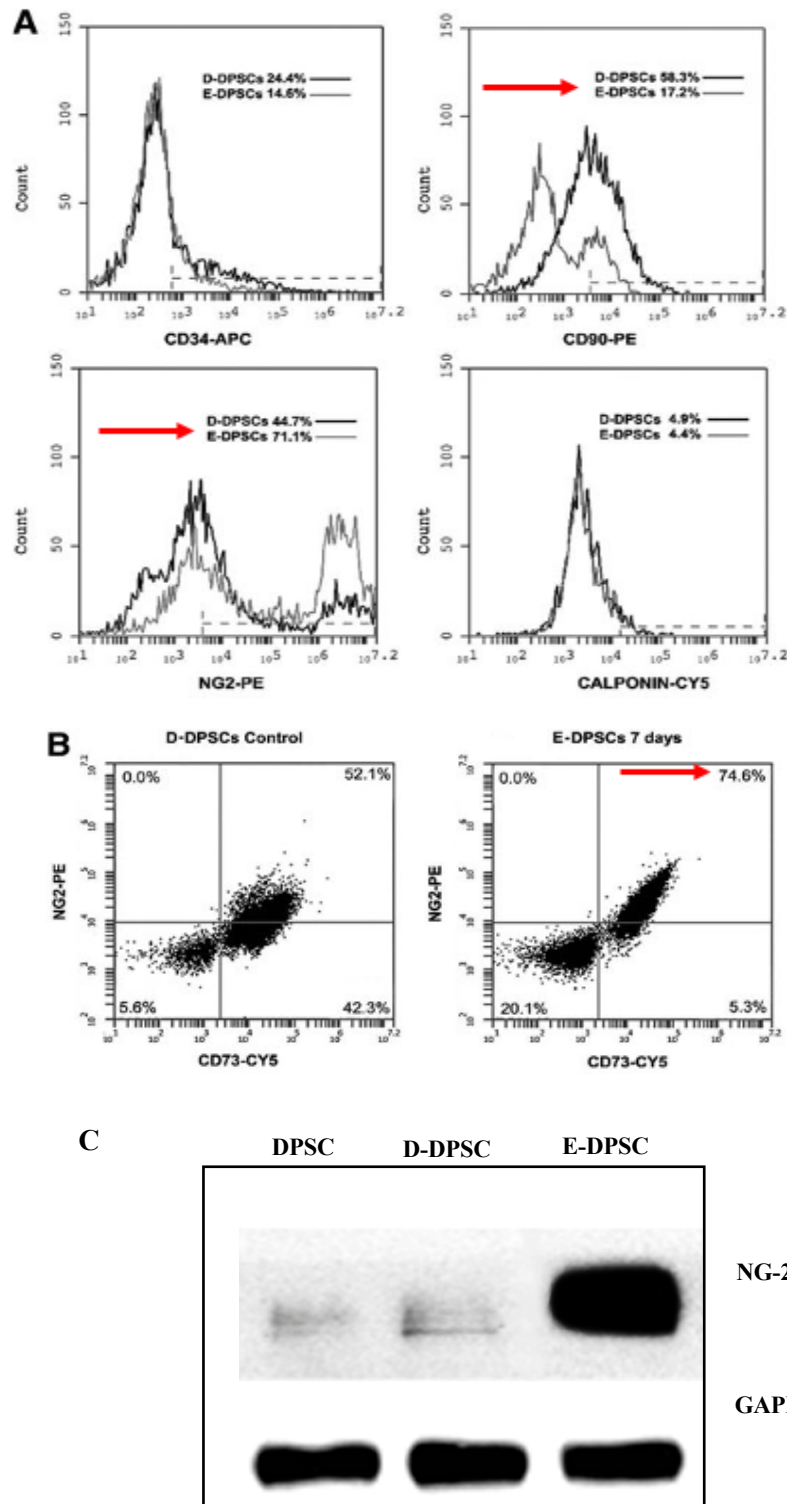


Figura 12. Caratterizzazione delle DPSC coltivate in diversi terreni. (A) Analisi citofluorimetrica di D-DPSC e E-DPSC per CD34, CD90, NG2 e calponina. (B) Analisi citofluorimetrica di D-DPSC ed E-DPSC dopo doppia marcatura con NG2 e CD73. (C) Analisi Western Blot per NG2 nei lisati cellulari totali da DPSC precoci, D-DPSC e E-DPSC.

4.2 Le E-DPSC supportano la formazione del tubulo endoteliale

Per verificare l'ipotesi che le E-DPSC possano supportare le cellule endoteliali nella formazione e stabilizzazione di strutture vascolari, abbiamo valutato l'azione delle DPSC durante la formazione dei tubuli da parte delle HUVEC. Sono state realizzate delle co-culture 3D su matrigel con HUVEC che normalmente conferiscono stabilità e maturazione del network endoteliale e rispettivamente aggiunte E-DPSC e D-DPSC a confronto. Come si può notare dalla figura 13 A e B, le HUVEC da sole coltivate in EC Matrix, formano una rete allineata di cellule già a 24 ore che però si degrada dopo 48 ore. Quando invece, insieme alle HUVEC vengono aggiunte le DPSC, si formano delle strutture che si mantengono stabili nel tempo. In particolare, abbiamo osservato come le E-DPSC in co-cultura aggiunte 30 minuti dopo le HUVEC, contribuiscano a stabilizzare alcuni tubuli che si mantengono intatti anche dopo 7 giorni, cosa che invece non succede con le D-DPSC. (Fig. 13 C, D). I nuovi tubuli appaiono più spessi e formati da cellule giustapposte (Fig. 13 G). Al contrario, quando sono state aggiunte le D-DPSC alle HUVEC, sono rimasti intatti pochissimi tubuli dopo 24 ore e 7 giorni e inoltre, questi tubuli erano formati prevalentemente da cellule unifilamentate (Fig. 13 E-H). L'analisi quantitativa della formazione del tubulo è stata eseguita considerando il *mesh index* e la percentuale di ritenzione della lunghezza totale del tubulo delle HUVEC da sole e in co-cultura con D-DPSC e E-DPSC (Fig. 13 I).

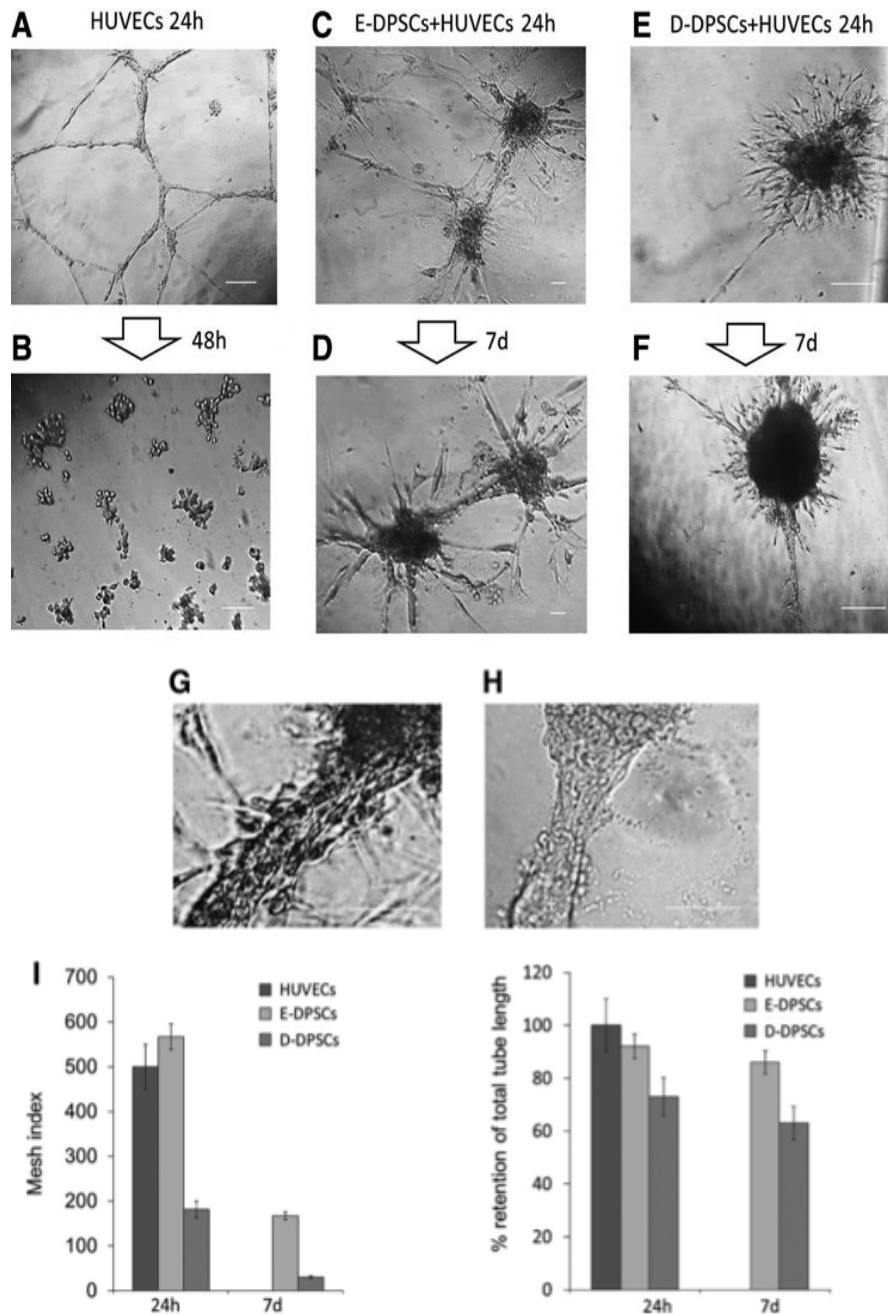


Figura 13. Potenziale di stabilizzazione del tubulo vascolare da parte delle DPSC. Le HUVEC coltivate da sole su matrice EC (A, B) o con E-DPSC (C, D) e D-DPSC (E, F). (G, H) Ingrandimento di strutture tubulari stabilizzate al 7° giorno di co-cultura. Le cellule sono state fotografate a diversi tempi dopo la semina cellulare utilizzando un microscopio a contrasto di fase. Scale bar 100 μ M. (I) Per gli esperimenti mostrati in (A-F) sono state eseguite analisi quantitative del *mesh index* e della percentuale di ritenzione della lunghezza totale del tubulo in formazione per ogni condizione sperimentale a 24 ore e 7 giorni.

Per confermare la necessità dell'interazione tra DPSC e HUVEC nella formazione e stabilizzazione di nuovi tubuli, abbiamo marcato le E-DPSC con un colorante fluorescente verde, la calceina ed eseguito il test di co-coltura con HUVEC in EC Matrix (Fig. 14). L'analisi delle immagini ottenute dalla fusione delle foto digitali a contrasto di fase e a fluorescenza in momenti diversi (*timelaps*) ha rivelato che le E-DPSC marcate aderiscono preferenzialmente alle HUVEC e, in particolare, si attaccano a livello dei nodi della rete e successivamente migrano lungo i tubuli in formazione delle HUVEC (Fig. 14).

Inoltre, è stato mostrato che dopo 24 ore le E-DPSC si legano preferenzialmente alle HUVEC e tendono ad allinearsi lungo i tubuli interagendo strettamente e localizzandosi sia nei nodi della rete che nei tubuli stessi (Fig. 15 A).

Per verificare l'avvenuto differenziamento delle E-DPSC in periciti lungo i tubuli in formazione, abbiamo eseguito un esperimento di immunofluorescenza per NG2, marcatore solitamente non espresso dalle HUVEC (Fig. 15 B). Le cellule NG2 positive sono state trovate sui tubuli, principalmente nelle zone cellulari più dense e anche nei nodi, vicino al punto di origine dei tubuli (Fig. 15 B).

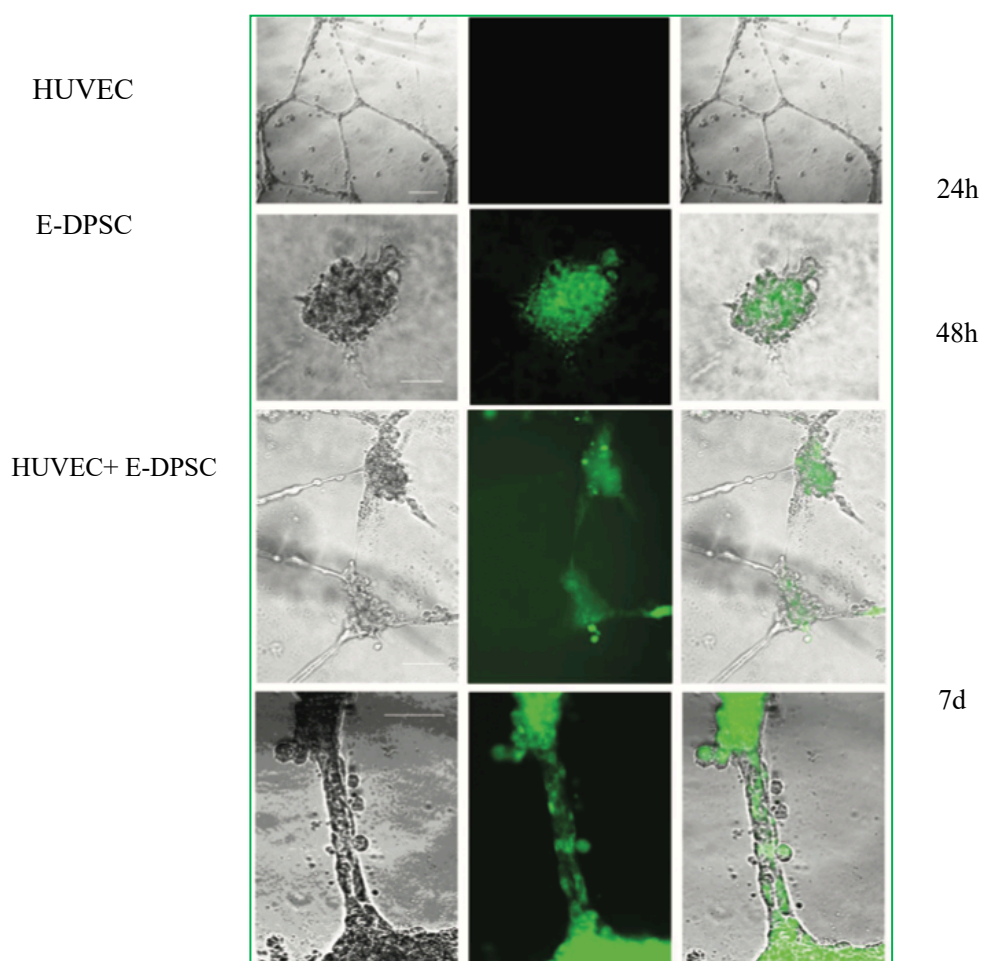
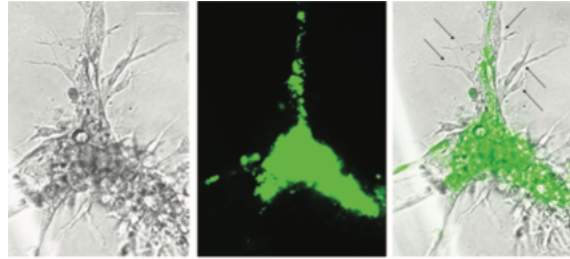
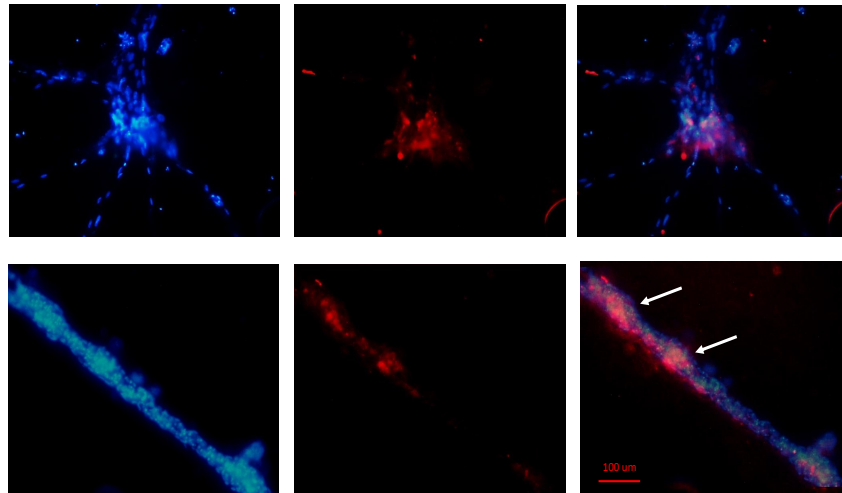


Figura 14. Potenziale di stabilizzazione del tubulo vascolare delle E-DPSC. Le HUVEC (prima riga) e le E-DPSC (seconda riga) sono state coltivate da sole e in co-cultura su matrice EC (terza e quarta riga). Le E-DPSC sono state precedentemente marcate con il colorante fluorescente verde, la calceina. Lo stesso campo ottico è stato fotografato sia in luce a contrasto di fase che in fluorescenza e le immagini risultanti sono state unite digitalmente (ultima colonna) a diversi tempi (24, 48 ore e 7 giorni). *Scale bar* 100 μ M.



A



B

Figura 15. (A) Potenziale di stabilizzazione del tubulo vascolare delle E-DPSC. Le HUVEC sono state marcate con calceina e seminate su Matrigel per formare una rete di tubuli. Le E-DPSC non fluorescenti sono state aggiunte alla rete HUVEC e lo stesso campo ottico è stato fotografato sia in contrasto di fase che in fluorescenza dopo 24 ore. Le immagini risultanti sono state unite digitalmente (immagine a destra). Le frecce nere indicano DPSC aderite al tubulo delle HUVEC. *Scale bar* 100 μ M. (B) Espressione di NG2 in HUVEC in co-coltura con E-DPSC. Lo stesso campo ottico è stato fotografato sia per la fluorescenza blu a sinistra (nuclei colorati con DAPI) che per la fluorescenza rossa al centro (anticorpo secondario coniugato con Alexa 594) e le immagini risultanti sono state unite digitalmente (colonna a destra). Nella seconda riga è mostrato un primo piano del tubulo vascolare stabilizzato. Le frecce bianche indicano le zone con maggiore densità cellulare ed espressione di NG2. *Scale bar* 100 μ M.

4.3 Ruolo del FGF nella stabilizzazione del tubulo da parte delle DPSC

A questo punto, abbiamo deciso di valutare l'impatto che i diversi fattori di crescita contenuti all'interno del terreno endoteliale EGM-2, già descritti precedentemente, avessero sulla regolazione del differenziamento delle DPSC in cellule simil-pericitiche.

Le DPSC sono state coltivate rispettivamente in EGM-2, in EBM-2 (terreno senza supplementi) e in EBM-2 integrato con i singoli fattori: FGF, VEGF ed EGF.

I risultati ottenuti in Western Blot mostrano come le differenti condizioni di coltura modifichino il fenotipo delle DPSC influenzandone il differenziamento. I nostri risultati hanno mostrato come i singoli fattori di crescita abbiano un effetto sull'espressione di NG2 e come *in primis* l'FGF induca la massima espressione di NG2 allo stesso modo dell'EGM-2. L'analisi citofluorimetrica per CD73 e NG2 ha confermato che il trattamento con FGF induce l'aumento dell'espressione dell'NG2 nelle DPSC CD73+ generando un fenotipo simile a quello osservato nelle DPSC coltivate in terreno EGM-2 (91,2 vs 87,2 %) (Fig. 16 B).

Siamo andati a verificare successivamente l'attività funzionale delle DPSC trattate con FGF, attraverso un test della capacità di supporto del tubulo con le HUVEC ed eseguito l'analisi quantitativa della lunghezza totale del tubulo e della percentuale di ritenzione della lunghezza totale del tubulo a diversi tempi e abbiamo visto che le DPSC cresciute con FGF sono capaci di supportare la stabilizzazione dei tubuli in formazione delle HUVEC per un tempo maggiore rispetto a tutte le altre condizioni sperimentali e in modo simile alle E-DPSC (Fig. 16 C, D).

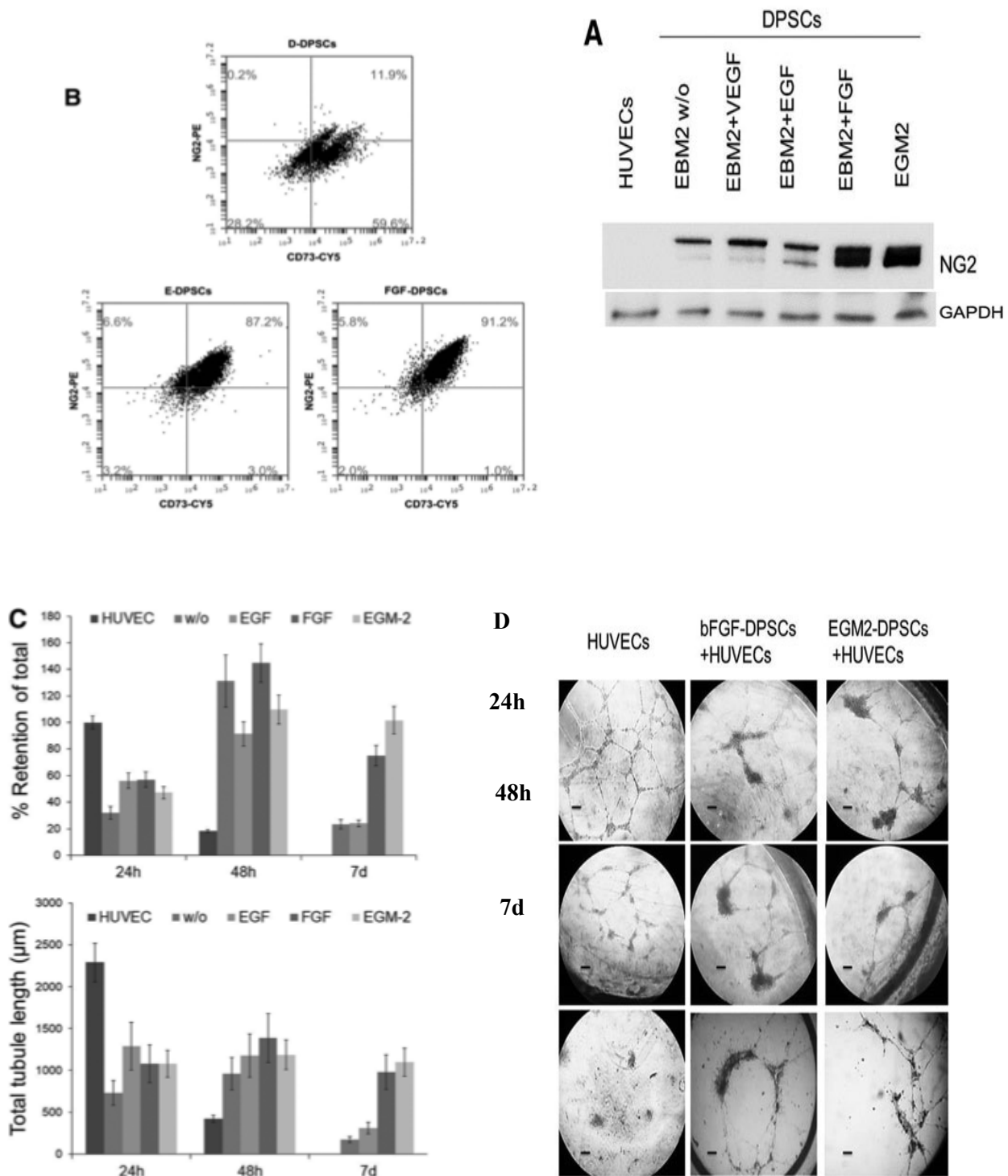


Figura 16. Caratterizzazione delle DPSC coltivate con diversi fattori di crescita. (A) Analisi Western Blot per NG2 in lisati cellulari totali da HUVEC, DPSC coltivate senza fattori di crescita (EBM-2 senza), D-DPSC trattate con VEGF, EGF, FGF (rispettivamente, EBM2+VEGF, EBM2+EGF, EBM2+FGF) e DPSC coltivate in EGM-2 (EGM-2). L'analisi dell'espressione di GAPDH è stata utilizzata come controllo di caricamento. (B) Analisi citofluorimetrica di D-DPSC, E-DPSC, DPSC condizionate da FGF (FGF-DPSC) dopo doppia marcatura con NG2 e CD73. (C) Analisi quantitativa della lunghezza totale del tubulo e della percentuale di ritenzione della lunghezza totale del tubulo di HUVEC da sole e in co-cultura con DPSC condizionate da vari fattori. (D) Immagini rappresentative del potenziale di stabilizzazione del tubulo vascolare di DPSC ed E-DPSC condizionate da FGF fino a 7 giorni. Le cellule sono state fotografate a 24 ore (prima fila), 48 ore (seconda fila) e 7 giorni (terza fila) dopo la semina cellulare utilizzando un microscopio a contrasto di fase. Scale bar 100 µm.

4.4 Isolamento dalle DPSC di specifici cloni cellulari e ruolo del FGF nella stabilizzazione del tubulo in formazione

Successivamente, abbiamo cercato di valutare il potenziale ruolo del FGF nel supportare il fenotipo cellulare NG2+ nelle DPSC. Mediante separazione immunomagnetica abbiamo isolato dalle nostre DPSC delle sottopopolazioni DPSC NG2+ e DPSC NG2- altamente purificate e poi caratterizzate fenotipicamente per il marcatore pericitico NG2 (Cx 38,7% vs NG2+ 96% vs NG2- 5,3%) (Fig. 17). In seguito, è stato valutato l'immunofenotipo di queste sottopopolazioni dopo averle coltivate in differenti condizioni: DMEM, EGM-2 e EBM-2+FGF per vedere in che modo il terreno modulasse l'arricchimento della popolazione NG2+ (Tabella 3). I risultati ottenuti mostrano che il trattamento con FGF ed EGM-2 nelle cellule NG2- è in grado di indurre un aumento significativo della percentuale di cellule NG2+ (dal 3,2% al 19,5% e al 10,5%, rispettivamente). Allo stesso tempo, l'FGF (o EGM-2) non ha modificato significativamente il tasso di proliferazione dei cloni NG2+ determinato mediante colorazione con *Crystal Violet* rispetto al terreno di coltura basale.

Il ruolo dell'FGF nel differenziamento è stato dimostrato utilizzando le sottopopolazioni ottenute dalla separazione immunomagnetica dopo averle coltivate per 48 ore nei diversi media, (DMEM, EBM-2+FGF o EGM-2) sia senza sia in presenza dell'inibitore della via di trasduzione del segnale dell'FGF, l'AZD4547 per poi valutare la loro capacità proliferativa e migratoria. Abbiamo ottenuto come risultato che i cloni DPSC NG2+ sono particolarmente sensibili al trattamento con FGF nella modulazione della loro capacità migratoria. Infatti, le DPSC condizionate da FGF hanno un'aumentata capacità migratoria rispetto alle DPSC coltivate in condizioni di coltura basale. L'uso dell'inibitore FGFR ha contrastato il fenotipo migratorio indotto da FGF. Pertanto, i nostri risultati confermano che l'FGF è il fattore chiave, responsabile della differenziazione delle DPSC verso il fenotipo pericitico (NG2+) regolandone la proliferazione e la migrazione (Fig. 18).

CLONI	DIFFERENTI TERRENI DI COLTURA	NG2
NG2-	DMEM	3.2%
	EBM-2+FGF	19.5%
	EGM-2	10.5%
NG2+	DMEM	94%
	EBM-2+FGF	94.6%
	EGM-2	93.6%

Tabella 3. Immunofenotipo di DPSC NG2 negative e positive condizionate in coltura per 2 settimane con diversi mezzi: DMEM, EBM-2 più FGF e EGM-2. Le cellule sono state caratterizzate per l'espressione di NG2, calcolando la percentuale di cellule positive rispetto al totale.

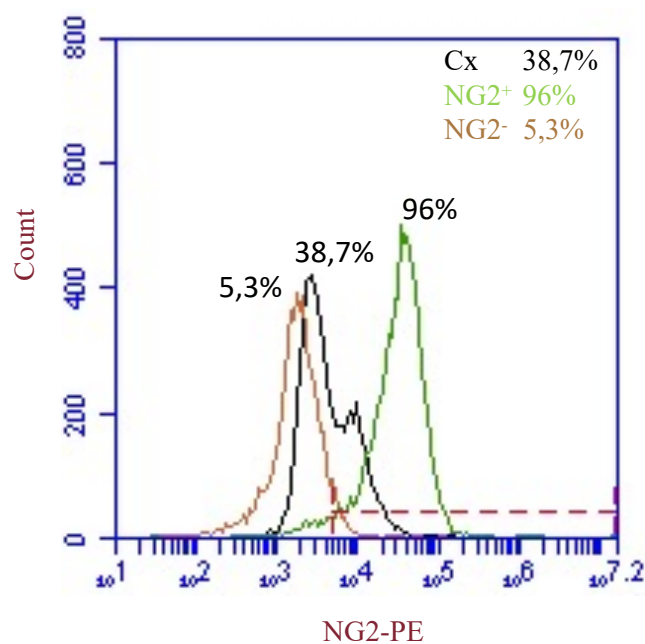


Figura 17. Caratterizzazione fenotipica per il marcatore pericitico NG2.

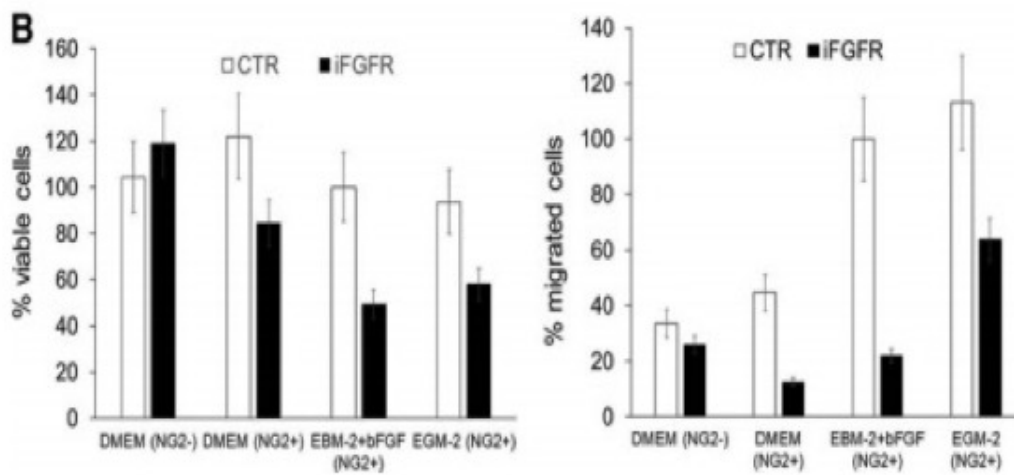


Figura 18. Caratterizzazione fenotipica e funzionale di sottopopolazioni DPSC isolate mediante magnetic immunodetection per NG2. Le sottopopolazioni di DPSC sono state coltivate per 48 ore con diversi terreni, DMEM, EBM-2 più FGF o EGM-2 e quindi valutate le loro capacità proliferativa (a sinistra) e migratoria (a destra). In entrambi gli istogrammi i risultati sono espressi in percentuale considerando al 100% il valore ottenuto con cellule coltivate in EBM-2+FGF. Gli stessi punti sperimentali sono stati valutati anche in presenza dell'inibitore FGFR AZD4547 (barra nera).

4.5 Ruolo dei cloni DPSC NG2+ e DPSC NG2- nella formazione e stabilizzazione di nuovi tubuli

Una volta separati i cloni (DPSC NG2+ e DPSC NG2-) abbiamo anche valutato, confrontandoli con le DPSC di controllo, la loro capacità di supportare e mantenere stabili nel tempo i tubuli in formazione. Per confermare la necessità dell'interazione tra DPSC e HUVEC nella formazione e stabilizzazione di nuovi tubuli, abbiamo marcato le DPSC e le sub popolazioni DPSC NG2+ e DPSC NG2- con la calceina ed eseguito il test di co-coltura con HUVEC in EC Matrix. Le immagini rappresentative delle foto effettuate in fluorescenza e a contrasto di fase in tempi diversi (*timelaps*) hanno rivelato che le HUVEC da sole sono capaci di formare un network endoteliale di cellule già a 24 ore che però si degrada dopo 48 ore fino ad azzerarsi dopo 7 giorni (Fig. 19 Prima riga). Quando invece, alle HUVEC sono state aggiunte DPSC, DPSC NG2+ e DPSC NG2- rispettivamente, abbiamo notato come tutte e tre le popolazioni sono capaci di promuovere e supportare la formazione dei tubuli endoteliali nel tempo fino a 7 giorni (Fig. 19 Seconda, terza, quarta riga) ma, dato molto interessante è il fatto che i cloni DPSC NG2+ mostrano una capacità di "*retention*" dei tubuli maggiore rispetto alle DPSC di controllo e soprattutto ai cloni DPSC NG2- (Fig. 19 Terza riga).

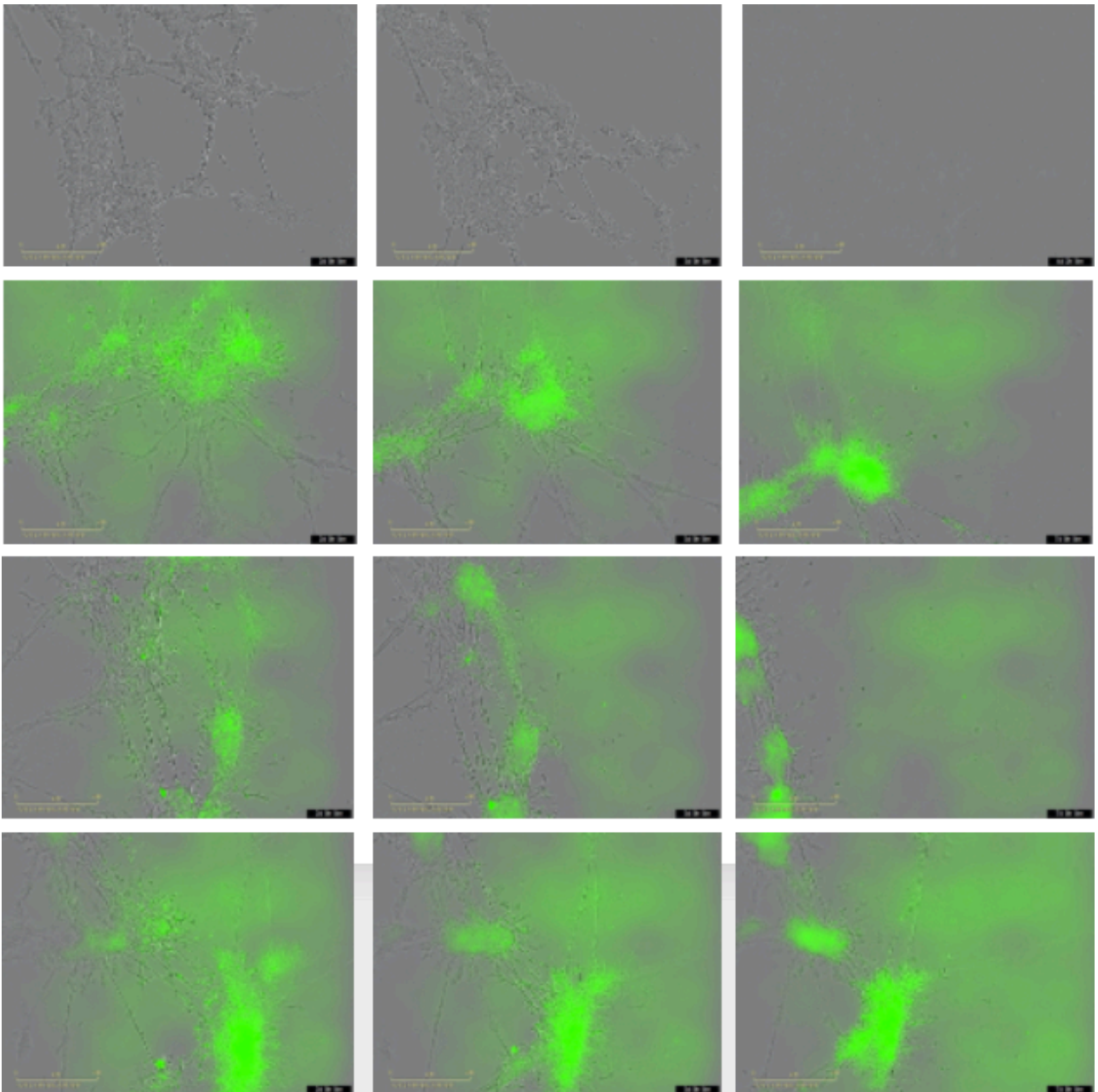


Figura 19. Potenziale di stabilizzazione del tubulo vascolare delle DPSC e di cloni NG2+ e NG2-. (Prima riga) HUVEC da sole. (Seconda riga) Co-coltura su matrice EC di HUVEC e DPSC. (Terza riga) Co-coltura su matrice EC di HUVEC e DPSC NG2+. (Quarta riga) Co-coltura su matrice EC di HUVEC e DPSC NG2-. Tutte le popolazioni DPSC sono state marcate con calceina e fotografate a 24 ore, a 48 ore e a 7 giorni. *Scale bar* 100 μ M.

5. DISCUSSIONE

La polpa dentaria svolge un ruolo chiave nell'omeostasi e nella riparazione del dente, in primo luogo per il mantenimento del tessuto mineralizzato ricordando per molti aspetti il midollo osseo. In entrambi i tessuti il determinante comune è la presenza di MSCs una popolazione cellulare multipotente in grado di dare origine a molti tipi cellulari differenti. Tuttavia, secondo l'ontogenesi, le DPSC appaiono più enigmatiche rispetto alle MSCs del midollo osseo, perché includono cellule staminali con doppia origine, glia-neurale ed ectomesenchimale, suggerendo che vi è una fase in cui coesistono diverse popolazioni cellulari identificate da specifiche combinazioni di proteine di superficie cellulare. La potenziale eterogeneità nelle cellule staminali del dente è esemplificata dalla descrizione di diverse popolazioni staminali in base al loro tessuto di origine (p. es., dal legamento parodontale, dalla papilla apicale, dal follicolo dentale e dal tessuto gengivale). I dati attuali non consentono di escludere che popolazioni di cellule dentali di diversa origine siano in grado di differenziarsi, *in vitro* e *in vivo*, in MSCs, a seconda delle necessità fisiologiche o delle condizioni di coltura. Nel protocollo sperimentale di estrazione che abbiamo messo appunto (Mattei V., 2015; Martellucci S., 2019 b), abbiamo isolato esclusivamente le cellule della polpa dentaria da giovani donatori, utilizzando la metodica della digestione chimica del tessuto ottenuto. La popolazione cellulare estratta, veniva coltivata inizialmente a formare delle rosette isolate che proliferavano rapidamente generando DPSC che esprimevano elevati livelli dei tipici marcatori di staminalità mesenchimale, inclusi CD44, CD90, CD105 e CD73 (Mattei V., 2015; Couto de Carvalho L.A., 2020). Le cellule dopo essere state isolate sono state coltivate in L-DMEM supplementato con FBS al 10%, condizioni ideali a garantire un alto tasso di proliferazione; abbiamo anche notato che le DPSC isolate e mantenute in condizioni di coltura appropriate sono in grado di differenziarsi in diversi citotipi: cellule osteogeniche, adipogeniche, condrogeniche e anche neurali (Martellucci S., 2018).

Le cellule staminali multipotenti che esprimono il fenotipo delle MSCs sono state isolate da più organi umani, suggerendo un interessante ruolo di tali cellule nei processi di rigenerazione e riparazione. Per questo motivo, è plausibile che le MSCs possano orchestrare e/o contribuire direttamente alla formazione del tessuto di granulazione (Delle

Monache S., 2016). È ben noto che i vasi sanguigni sono formati da cellule non vascolari derivate da cellule progenitrici, comprese le cellule ematopoietiche (Oberlin E., 2002) e le cellule miogeniche (Zheng B., 2007). Tra queste, le cellule associate all'endotelio, note come *periciti*, rappresentano una popolazione cellulare chiave, che circonda le cellule endoteliali nei capillari e nei microvasi (Hashitani H., 2019). I periciti svolgono ruoli cruciali in molti processi: nella funzione della barriera emato-encefalica, nella funzione/stabilità dei vasi sanguigni, nell'angiogenesi, nella proliferazione/differenziazione delle cellule endoteliali, nella guarigione delle ferite e nel mantenimento delle cellule staminali ematopoietiche. Possono essere isolati da tessuti fetali e adulti e hanno capacità differenziativa "multilineage" come le MSCs. Tutte queste proprietà rendono i periciti le cellule preferite nel campo dell'ingegneria dei tessuti (Çelebi-Saltik B., 2018). Infatti, il contributo terapeutico delle MSCs alla riparazione vascolare include la differenziazione diretta in cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e periciti. È stato scoperto inoltre, che le MSCs indifferenziate combinate con HUVEC, seminate su un innesto, sono in grado di crescere *in vivo* e di funzionare come periciti che si avvolgono attorno ai tubuli endoteliali (Au P., 2008). Le MSCs possono comportarsi in modo funzionale come i periciti nei modelli di co-cultura stabilizzando l'endotelio e le sue caratteristiche fisiche (Tian X., 2017).

Negli ultimi dieci anni ha preso sempre più piede l'idea di un'apparente similarità tra MSCs e periciti sia *in vitro* che *in vivo*. I periciti possono originare da MSCs (Au P., 2008) e sono essi stessi una fonte di MSCs, condividendo la capacità di differenziarsi in diverse linee cellulari (Dore-Duffy P., 2006). Tuttavia, alcuni dati *in vivo* sembrano indicare che i periciti si comportano come MSCs nella loro funzione rigenerativa (Guimarães-Camboa N., 2017), suggerendo che i periciti sono un tipo cellulare altamente plastico che mostra profili funzionali ed espressivi comuni a MSCs e fibroblasti.

I nostri risultati indicano che le DPSC, se coltivate in condizioni standard (L-DMEM + 10% FBS) e analizzate già a 3 settimane dall'isolamento, contengono una popolazione NG2+ significativamente variabile (dal 30% a 60% di cellule positive), avvalorando così l'ipotesi che le MSCs possano essere indirizzate verso un modello cellulare di tipo endoteliale. Inoltre, abbiamo dimostrato che le differenti condizioni di coltura (DMEM e EGM-2), possano indirizzare le DPSC verso il differenziamento in periciti. Abbiamo visto che le D-DPSC coltivate in DMEM si comportano diversamente rispetto alle E-DPSC coltivate in EGM-2, con una minore *sprouting ability* e una minore capacità di stabilizzare i tubuli in formazione delle HUVEC. Ad oggi, i periciti sono ancora definiti in base alla loro capacità

di allungarsi e avvolgersi lungo le cellule endoteliali. Infatti, i risultati ottenuti negli ultimi anni mostrano che i periciti sono una popolazione altamente eterogenea in termini di ontogenesi, fenotipo molecolare e, probabilmente, funzioni; dimostrando anche l'esistenza di diverse sottopopolazioni di periciti (Stapor P.C., 2014; Kumar A., 2017), identificate mediante l'espressione di diversi marcatori pericitici comuni, ma non specifici quali α -SMA, PDGFR- β e NG2, con ruoli diversi nell'angiogenesi (Murfee W.L., 2005).

Abbiamo osservato inoltre, che la coltura di DPSC mantenuta in EGM-2 ha mostrato un aumento significativo dell'espressione di NG2 ma anche una diminuzione dei marcatori staminali come CD90 e, tutte le cellule NG2+ sono risultate anche CD73+, supportando così il fatto che questo marcatore ha un ruolo chiave nella caratterizzazione fenotipica dei periciti. Inoltre, abbiamo dimostrato che sia l'EGM-2 sia il fattore di crescita FGF sono responsabili dell'induzione del differenziamento delle DPSC in periciti e che le E-DPSC dopo differenziamento, si comportano come i periciti, andandosi a posizionare dapprima a livello del nodo e poi sulla superficie del tubulo in formazione.

Inoltre, abbiamo realizzato un modello funzionale di coltura 3D in cui abbiamo aggiunto le nostre DPSC alle HUVEC, per vedere la capacità di queste cellule staminali di promuovere la stabilizzazione dei nuovi tubuli. Abbiamo osservato che le E-DPSC aderiscono alle HUVEC e dopo differenziamento in periciti, si comportano come gli stessi andandosi a posizionare dapprima a livello del nodo e poi sulla superficie del tubulo in formazione, formando strutture complesse che rimangono stabili per diversi giorni. Inoltre, abbiamo dimostrato come la selezione e l'utilizzo di sottopopolazioni arricchite per NG2 rappresenti una fonte più promettente e responsiva al differenziamento e alla capacità di supportare e mantenere stabile la formazione di strutture endoteliali rendendo queste cellule (DPSC NG2+) potenzialmente più idonee alla realizzazione di *scaffold* biocompatibili per la rigenerazione di tessuto endoteliale dei vasi danneggiati. Questo aspetto potrebbe essere rilevante in un modello *in vivo* in cui trapiantare le DPSC NG2+ nel tessuto ospite, per la loro predilezione a aderire più fermamente ai vasi e a stabilizzarli.

Mentre, si sa molto dell'associazione diretta dei periciti con le cellule endoteliali invece, poco conosciuto è il loro ruolo funzionali nell'angiogenesi. Si sa che durante la formazione dei capillari, i periciti vascolari sono attivamente reclutati dalle cellule endoteliali e la loro presenza è fondamentale per l'angiogenesi fisiologica. I periciti *in vivo*, possono servire come fonte di cellule staminali associate al sistema vascolare, in grado di orchestrare la rigenerazione in diversi tessuti. Infatti, i periciti svolgono un ruolo di primo piano sia nella

sopravvivenza e migrazione delle cellule endoteliali sia nell'evitare la regressione dei vasi come dimostrato dai risultati ottenuti in uno studio condotto sui muscoli distrofici di topo, in cui i periciti trapiantati negli animali hanno mostrato un potenziale rigenerativo superiore a quello dei mioblasti e alle stesse cellule endoteliali (Crisan M., 2008).

Il ruolo dei periciti post trapianto potrebbe essere quello orientato alla riparazione delle reti vascolari dell'ospite, facilitando le successive fasi di guarigione. È stato dimostrato anche che i periciti dal sangue cordonale umano inducono il completo ripristino della funzione renale meglio delle MSCs derivate dal midollo osseo dopo insufficienza renale acuta indotta da chemioterapia (Morigi M., 2010). Inoltre, sempre nell'ottica della medicina rigenerativa, è stato dimostrato in modelli murini, che i periciti sono in grado di migliorare i danni da ischemia dopo trapianto, modulando diverse fasi di recupero (Yang S., 2017).

Questi dati indicano un duplice ruolo dei periciti nel tessuto danneggiato: da un lato, infatti, potrebbero promuovere la formazione del tubulo nelle sue fasi iniziali, durante la germinazione dell'endotelio; dall'altro partecipare alla stabilizzazione di vasi formati in un microambiente instabile.

6. CONCLUSIONI

I nostri dati confermano che la polpa dentaria è da considerare un'ottima fonte di MSCs, con un'elevata capacità proliferativa in condizioni di coltura standard. Quando queste cellule vengono coltivate in condizioni di coltura specifiche come nel nostro caso, si può vedere come le stesse si differenzino nel citotipo studiato e possano essere caratterizzate dall'espressione di marcatori pericitici, dimostrando *in vitro* l'avvenuto differenziamento e la capacità di stabilizzare i tubuli endoteliali nascenti. Ciò le rende una risorsa promettente per la medicina rigenerativa e la terapia cellulare, in quanto, un'ulteriore caratterizzazione molecolare delle DPSC per il loro trapianto *in vivo*, consentirebbe di verificare il loro potenziale rigenerativo e il loro ruolo nella rivascolarizzazione in modelli difettosi di angiogenesi (Mattei V., 2021).

Inoltre, per le loro caratteristiche, stiamo valutando ancora l'uso di queste cellule dopo differenziamento in periciti per la rigenerazione di tessuto endoteliale dei vasi danneggiati. In particolare, stiamo provando a realizzare degli *scaffold* biocompatibili di origine vegetale, a partire dalle foglie di *Euphorbia pulcherrima* (Stella di Natale) scelta per la sua somiglianza nella struttura vascolare con i tessuti animali, in quanto le sue nervature, ricordano bene il network endoteliale (Fig. Supplementare 2). Rifacendoci a lavori precedenti (Gershlak J.R., 2017; Rana D., 2017), abbiamo sperimentato la fattibilità dell'utilizzo di foglie decellularizzate per realizzare *scaffold* biocompatibili, di origine vegetale, per future applicazioni di ingegneria tissutale. Le foglie sono state decellularizzate secondo diversi protocolli (Ott H.C., 2008; Gershlak J.R., 2013; Guyette J.P., 2016) (Fig. Supplementare 2) e attualmente sono in corso esperimenti di ricellularizzazione con HUVEC e DPSC differenziate in periciti per vedere la capacità di queste cellule di rigenerare tessuto endoteliale danneggiato e trovare così una possibile via di applicazione in medicina rigenerativa.

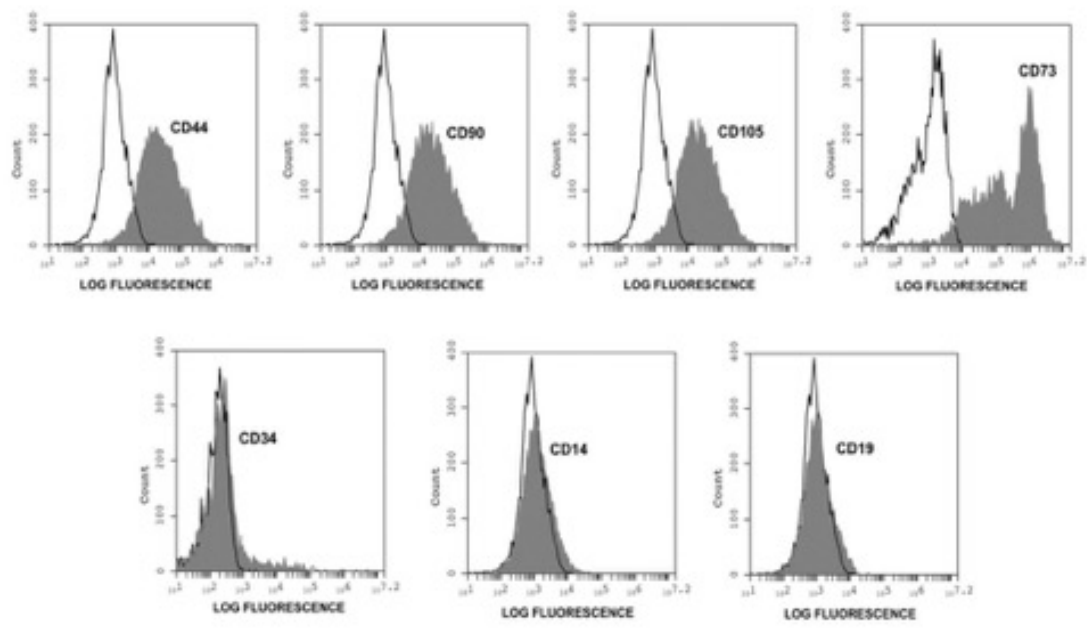


Figura S1. Caratterizzazione delle DPSC per i tipici marker di stamialità mesenchimale.

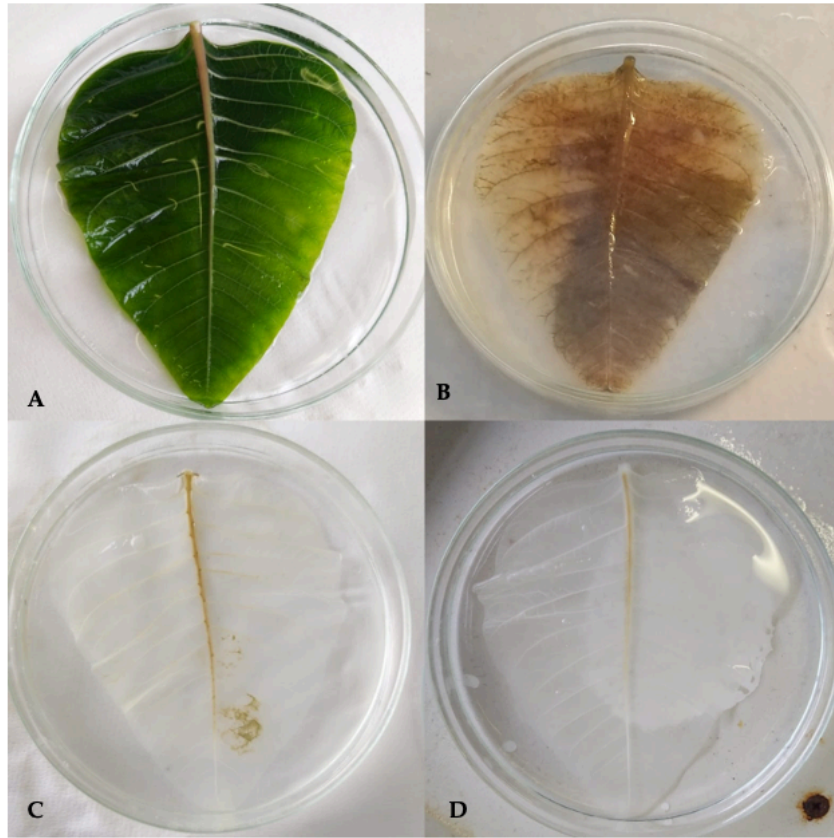


Figura S2. Fasi della decellularizzazione della foglia: (A) giorno 0; (B) giorno 1, la foglia perde parte della sua colorazione scura e comincia ad apparire traslucida; (C) giorno 4 trattamento in SDS; (D) giorno 7, dopo essere stata trattata e sterilizzata con clorito di sodio, la foglia ha perso tutta la clorofilla e la sua colorazione ed è stata completamente decellularizzata.

7. BIBLIOGRAFIA

Alikhani M, Roy S, Graves DT. (2010). FOXO1 plays an essential role in apoptosis of retinal pericytes. *Mol Vis*; 16:408-415.

Alison MR, Islam S. (2009). Attributes of adult stem cells. *J Pathol*; 217(2):144-160.

Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*; 50(5):1522-1532.

Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, Vila TV, Rodrigues JS, Lear PV, Bravo SB. (2012). Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*; 49(2): R89-111.

Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull*; 57(6):751-758.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*; 97(6):512-523.

Armulik A, Genové G, Betsholtz C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*; 21(2):193-215.

Arnold TD, Niaudet C, Pang MF, Siegenthaler J, Gaengel K, Jung B, Ferrero GM, Mukoyama YS, Fuxe J, Akhurst R, Betsholtz C, Sheppard D, Reichardt LF. (2014). Excessive vascular sprouting underlies cerebral hemorrhage in mice lacking $\alpha V\beta 8$ -TGF β signaling in the brain. *Development*; 141(23):4489-4499.

Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. (2016). What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab*; 36(2):451-455.

- Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. (2008). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood*; 111(9):4551-4558.
- Aydin S, Şahin F. (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol*; 1144:123-132.
- Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P. (1999). Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res*; 55(5):578-587.
- Baranek M., Markiewicz WT, Barciszewski J. (2016). Selected small molecules as inducers of pluripotency. *Acta Biochim Pol*; 63(4):709-716.
- Behl Y, Krothapalli P, Desta T, Roy S, Graves DT. (2009). FOXO1 plays an important role in enhanced microvascular cell apoptosis and microvascular cell loss in type 1 and type 2 diabetic rats. *Diabetes*; 58(4):917-925.
- Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, Zlokovic BV. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*; 68(3):409-427.
- Bergers G, Song S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*; 7(4):452-464.
- Bhartiya D. (2018). The need to revisit the definition of mesenchymal and adult stem cells based on their functional attributes. *Stem Cell Res Ther*; 9(1):78.
- Birbrair A. (2018). Pericyte Biology: Development, Homeostasis, and Disease. *Adv Exp Med Biol*; 1109:1-3.
- Bondjers C, He L, Takemoto M, Norlin J, Asker N, Hellström M, Lindahl P, Betsholtz C. (2006). Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and PDGF-R beta mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *FASEB J*; 20(10):1703-1705.

Bonnet D, Dick JE. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*; 3(7):730-737.

Bose B, Shenoy SP, Konda S, Wangikar P. (2012). Human embryonic stem cell differentiation into insulin secreting β -cells for diabetes. *Cell Biol Int*; 36(11):1013-1020.

Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. (2017). Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Med*; 49(8):644-651.

Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*; 45(2):115-120.

Cable J, Fuchs E, Weissman I, Jasper H, Glass D, Rando TA, Blau H, Debnath S, Oliva A, Park S, Passegué E, Kim C, Krasnow MA. (2020). Adult stem cells and regenerative medicine a symposium report. *Ann N Y Acad Sci*;1462(1):27-36.

Can A. (2008). A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turk J Haematol*; 25(2):57-59.

Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*; 9(5):641-650.

Caplan AI. (2008). All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*; 3(3):229-230.

Caporarello N, D'Angeli F, Cambria MT, Candido S, Giallongo C, Salmeri M, Lombardo C, Longo A, Giurdanella G, Anfuso CD, Lupo G. (2019). Pericytes in Microvessels: From "Mural" Function to Brain and Retina Regeneration. *Int J Mol Sci*; 20(24):6351.

Carmeliet P, Jain RK. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*; 473(7347):298-307.

Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*; 9(6):653-660.

Çelebi-Saltik B. (2018). Pericytes in Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol*; 1109:125-137.

Charbord P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*; 21(9):1045-1056.

Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS. (2003). Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif*; 36(suppl 1): 45-58.

Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, Nicastro F, Noviello M, Roostalu U, Natali Sora MG, Scarlato M, De Pellegrin M, Godi C, Giuliani S, Ciotti F, Tonlorenzi R, Lorenzetti I, Rivellini C, Benedetti S, Gatti R, Markt S, Mazzi B, Tettamanti A, Ragazzi M, Imro MA, Marano G, Ambrosi A, Fiori R, Sormani MP, Bonini C, Venturini M, Politi LS, Torrente Y, Ciceri F. (2015). Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med*; 7(12):1513-1528.

Couto de Carvalho LA, Tosta Dos Santos SL, Sacramento LV, de Almeida VR Júnior, de Aquino Xavier FC, Dos Santos JN, Gomes Henriques Leitão AC. (2020). Mesenchymal stem cell markers in periodontal tissues and periapical lesions. *Acta Histochem*; 122(8):151636.

Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*; 36(5):642-654.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*; 3(3):301-313.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. (2008). In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*; 26(9):2287-2299.

Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*; 468(7323):562-566.

De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*; 25(1):100-106.

Delle Monache S, Calgani A, Sanità P, Zazzeroni F, Gentile Warschauer E, Giuliani A, Amicucci G, Angelucci A. (2016). Adipose-derived stem cells sustain prolonged angiogenesis through leptin secretion. *Growth Factors*; 34(3-4):87-96.

Delle Monache S, Martellucci S, Clementi L, Pulcini F, Santilli F, Mei C, Piccoli L, Angelucci A, Mattei V. (2019). *In vitro* Conditioning Determines the Capacity of Dental Pulp Stem Cells to Function as Pericyte-Like Cells. *Stem Cells Dev*; 28(10):695-706.

de Souza LE, Malta TM, Kashima Haddad S, Covas DT. (2016). Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related? *Stem Cells Dev*; 25(24):1843-1852.

Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martín-Vasallo P, Díaz-Flores L Jr. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol*; 24(7):909-969.

Doetsch F. (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*; 6:1127-1134.

Dore-Duffy P, Katychev A, Wang X, Van Buren E. (2006). CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab*; 26(5):613-624.

Dore-Duffy P. (2008). Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des*; 14(16):1581-1593.

Dulmovits BM, Herman IM. (2012). Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. *Int J Biochem Cell Biol*; 44(11):1800-1812.

Eberth CJ. (1871). Handbuch der Lehre von den Geweben des Menschen und der Thiere (W. Engelmann, Leipzig).

Eglinger J, Karsjens H, Lammert E. (2017). Quantitative assessment of angiogenesis and pericyte coverage in human cell-derived vascular sprouts. *Inflamm Regen*; 37:2.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. (2012). Stem cells in dentistry-part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*; 56(3):151-165.

Erdener ŞE, Dalkara T. (2019). Small Vessels are a big problem in neurodegeneration and neuroprotection. *Front Neurol*; 10:889.

Esteves CL, Sheldrake TA, Mesquita SP, Pesántez JJ, Menghini T, Dawson L, Péault B, Donadeu FX. (2017). Isolation and characterization of equine native MSC populations. *Stem Cell Res Ther*; 8(1):80.

Esteves CL, Donadeu FX. (2018). Pericytes and their potential in regenerative medicine across species. *Cytometry A*; 93(1):50-59.

Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. (2004). Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*;110(15):2226-2232.

Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. (2011). Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108(16):6503-6508.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*; 3(4):393-403.

Fu J, Warmflash A, Lutolf MP. (2021). Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation. *Nat Mater*; 20(2):132-144.

Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW. (2003). Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis *in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage*; 11(1):55-64.

Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*; 287(5457):1433-1438.

Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circ Res*; 92(6):598-608.

Gan L, Liu Y, Cui D, Pan Y, Zheng L, Wan M. (2020). Dental Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Therapeutic Application. *Stem Cells Int*; 2020:8864572.

Gao S, Guo X, Zhao S, Jin Y, Zhou F, Yuan P, Cao L, Wang J, Qiu Y, Sun C, Kang Z, Gao F, Xu W, Hu X, Yang D, Qin Y, Ning K, Shaw PJ, Zhong G, Cheng L, Zhu H, Gao Z, Chen X, Xu J. (2019). Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron/motoneuron-like cells for cell replacement therapy of spinal cord injury. *Cell Death Dis*; 10(8):597.

Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, Aiello LP, Kern TS, King GL. (2009). Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med*; 15(11):1298-1306.

Gerhardt H, Betsholtz C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*; 314(1):15-23.

Gershlak JR, Resnikoff JI, Sullivan KE, Williams C, Wang RM, Black LD 3rd. (2013). Mesenchymal stem cells ability to generate traction stress in response to substrate stiffness is modulated by the changing extracellular matrix composition of the heart during development. *Biochem Biophys Res Commun*; 439(2):161-166.

Gershlak JR, Hernandez S, Fontana G, Perreault LR, Hansen KJ, Larson SA, Binder BY, Dolivo DM, Yang T, Dominko T, Rolle MW, Weathers PJ, Medina-Bolivar F, Cramer CL, Murphy WL, Gaudette GR. (2017). Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*; 125:13-22.

Ghazizadeh S, Taichman LB. (2001). Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*; 20(6):1215-1222.

Ghosh M, Balbi M, Hellal F, Dichgans M, Lindauer U, Plesnila N. (2015). Pericytes are involved in the pathogenesis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Ann Neurol*; 78(6):887-900.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*; 103(11):1204-1219.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*; 189(1):54-63.

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*; 84(12):4164-4173.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(25):13625-13630.

Gronthos S, Simmons PJ. (1996). The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother*; 5(1):15-23.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*; 116(Pt 9):1827-1835.

Guimarães-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y, Moore-Morris T, Gu Y, Dalton ND, Rockenstein E, Masliah E, Peterson KL, Stallcup WB, Chen J, Evans SM. (2017). Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells in vivo. *Cell Stem Cell*; 20(3):345-359.

Guyette JP, Charest JM, Mills RW, Jank BJ, Moser PT, Gilpin SE, Gershlak JR, Okamoto T, Gonzalez G, Milan DJ, Gaudette GR, Ott HC. (2016). Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res*; 118(1):56-72.

Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*; 508(7494):55-60.

Halliday MR, Pomara N, Sagare AP, Mack WJ, Frangione B, Zlokovic BV. (2013). Relationship between cyclophilin a levels and matrix metalloproteinase 9 activity in cerebrospinal fluid of cognitively normal apolipoprotein e4 carriers and blood-brain barrier breakdown. *JAMA Neurol*; 70(9):1198-1200.

Halliday MR, Rege SV, Ma Q, Zhao Z, Miller CA, Winkler EA, Zlokovic BV. (2016). Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*; 36(1):216-227.

Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics*; 2:5.

Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*; 8(8):886.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144(5):646-674.

Hashitani H, Mitsui R. (2019). Role of Pericytes in the Initiation and Propagation of Spontaneous Activity in the Microvasculature. *Adv Exp Med Biol*; 1124:329-356.

- Heldin CH. (2013). Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*; 11:97.
- Hirschi KK, D'Amore PA. (1997). Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS*; 79:419-428.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*; 88(9):792-806.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24(2):288-293.
- Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*; 6(6):543-553.
- Jain RK. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*; 9(6):685-693.
- Janebodin K, Zeng Y, Buranaphatthana W, Ieronimakis N, Reyes M. (2013). VEGFR2-dependent angiogenic capacity of pericyte-like dental pulp stem cells. *J Dent Res*; 92(6):524-531.
- Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. (2020). Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*; 46(12):3349-3360.
- Kalladka D, Muir KW. (2014). Brain repair: cell therapy in stroke. *Stem Cells Cloning*; 7:31-44.

Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, Inoue H, Yamashita JK, Todani M, Nakagawa M, Osawa M, Yashiro Y, Yamanaka S, Osafune K. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev*; 99(1):79-114.

Kawashima N, Okiji T. (2016). Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto)*; 56(4):144-153.

Keller G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*; 19(10):1129-1155.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. (2006). Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*; 184(3-4):105-116.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*; 24(5):1294-1301.

Khazaei S, Keshavarz G, Bozorgi A, Nazari H, Khazaei M. (2021). Adipose tissue-derived stem cells: a comparative review on isolation, culture, and differentiation methods. *Cell Tissue Bank*. doi: 10.1007/s10561-021-09905-z

Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. (2009). Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*; 67(3):501-506.

Krueger M, Bechmann I. (2010). CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia*; 58(1):1-10.

Kumar G.S. (2014). *Orban's oral histology & embryology*. Elsevier Health Sciences APAC.

Kumar A, D'Souza SS, Moskvina OV, Toh H, Wang B, Zhang J, Swanson S, Guo LW, Thomson JA, Slukvin II. (2017). Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymoangioblasts. *Cell Rep*; 19(9):1902-1916.

- Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*; 20(8):1394-1402.
- Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*; 3(12):1333-1340.
- Lees JS, Sena ES, Egan KJ, Antonic A, Koblar SA, Howells DW, Macleod MR. (2012). Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke*; 7(7):582-588.
- Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. (2014). Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after *in vivo* transplantation. *Biomaterials*; 35(24):6332-6343.
- Leong WK, Lewis MD, Koblar SA. (2013). Concise review: Preclinical studies on human cell-based therapy in rodent ischemic stroke models: where are we now after a decade? *Stem Cells*; 31(6):1040-3.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest*; 103(5):697-705.
- Marchi N, Lerner-Natoli M. (2013). Cerebrovascular remodeling and epilepsy. *Neuroscientist*; 19(3):304-312.
- Marsano A, Medeiros da Cunha CM, Ghanaati S, Gueven S, Centola M, Tsaryk R, Barbeck M, Stuedle C, Barbero A, Helmrich U, Schaeren S, Kirkpatrick JC, Banfi A, Martin I. (2016). Spontaneous *in vivo* Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells by Blocking Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. *Stem Cells Transl Med*; 5(12):1730-1738.
- Martellucci S, Manganelli V, Santacroce C, Santilli F, Piccoli L, Sorice M, Mattei V. (2018). Role of Prion protein-EGFR multimolecular complex during neuronal differentiation of human dental pulp-derived stem cells. *Prion*; 12(2):117-126.

- Martellucci S, Santacroce C, Santilli F, Piccoli L, Delle Monache S, Angelucci A, Misasi R, Sorice M, Mattei V. (2019). Cellular and Molecular Mechanisms Mediated by recPrP^C Involved in the Neuronal Differentiation Process of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*; 20(2):345.
- Martellucci S, Santacroce C, Manganelli V, Santilli F, Piccoli L, Cassetta M, Misasi R, Sorice M, Mattei V. (2019 b). Isolation, propagation and Prion Protein expression during neuronal differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments*; (145) doi: 10.3791/59282.
- Martinez Saez D, Sasaki RT, Neves AD, da Silva MC. (2016). Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Growing Literature. *Cells Tissues Organs*; 202(5-6):269-280.
- Mattei V, Martellucci S, Pulcini F, Santilli F, Sorice M, Delle Monache S. (2021). Regenerative Potential of DPSCs and Revascularization: Direct, Paracrine or Autocrine Effect? *Stem Cell Rev Rep*; doi: 10.1007/s12015-021-10162-6.
- Mattei V, Santacroce C, Tasciotti V, Martellucci S, Santilli F, Manganelli V, Piccoli L, Misasi R, Sorice M, Garofalo T. (2015). Role of lipid rafts in neuronal differentiation of dental pulp-derived stem cells. *Exp Cell Res*; 339(2):231-240.
- Medina RJ, Kataoka K, Takaishi M, Miyazaki M, Huh NH. (2006). Isolation of epithelial stem cells from dermis by a three-dimensional culture system. *J Cell Biochem*; 98(1):174-184.
- Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF)- key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*; 59(2):455-467.
- Mills SJ, Cowin AJ, Kaur P. (2013). Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. *Cells*; 2(3):621-634.
- Moore K.A., Lemischka I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science*; 311(5769):1880-1885.
- Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, Lo Cicero V, Imberti B, Abbate M, Zoja C, Cassis P, Longaretti L, Rebulli P, Introna M, Capelli C, Benigni A, Remuzzi G, Lazzari L.

(2010). Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells*; 28(3):513-522.

Murfee WL, Skalak TC, Peirce SM. (2005). Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation*; 12(2):151-160.

Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, Sakuma R, Lu S, Narita A, Kawahara M, Taguchi A, Matsuyama T. (2015). Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells*; 33(6):1962-1974.

Nanci A. (2014). Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. Elsevier Health Sciences.

Navarro-Tableros V, Gai C, Gomez Y, Giunti S, Pasquino C, Deregibus MC, Tapparo M, Pitino A, Tetta C, Brizzi MF, Ricordi C, Camussi G. (2019). Islet-Like Structures Generated In Vitro from Adult Human Liver Stem Cells Revert Hyperglycemia in Diabetic SCID Mice. *Stem Cell Rev Rep*;15(1):93-111.

Niu F, Yao H, Zhang W, Sutliff RL, Buch S. (2014). Tat 101-mediated enhancement of brain pericyte migration involves platelet-derived growth factor subunit B homodimer: implications for human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders. *J Neurosci*; 34(35):11812-11825.

Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. (2016). Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: A Literature Review. *Stem Cell Rev Rep*; 12(5):511-523.

Oberlin E, Tavian M, Blazsek I, Péault B. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development*; 129(17):4147-4157.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells*; 22(3):377-384.

Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*; 14(2):213-221.

- Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn*; 222(2):218-227.
- Paes SM, Pupo YM, Cavenago BC, Fonseca-Silva T, Santos CCO. (2021). Cryopreservation of mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a systematic review. *Restor Dent Endod*; 46(2):e26.
- Paquet-Fifield S, Schlüter H, Li A, Aitken T, Gangatirkar P, Blashki D, Koelmeyer R, Pouliot N, Palatsides M, Ellis S, Brouard N, Zannettino A, Saunders N, Thompson N, Li J, Kaur P. (2009). A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J Clin Invest*;119(9):2795-2806.
- Parthiban SP, He W, Monteiro N, Athirasala A, França CM, Bertassoni LE. (2020). Engineering pericyte-supported microvascular capillaries in cell-laden hydrogels using stem cells from the bone marrow, dental pulp and dental apical papilla. *Sci Rep*;10(1):21579.
- Phinney DG, Prockop DJ. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*; 25(11):2896-2902.
- Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A. (2015). Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Dev Biol*; 15:14.
- Pozzobon M, Franzin C, Piccoli M, De Coppi P. (2014). Fetal stem cells and skeletal muscle regeneration: a therapeutic approach. *Front Aging Neurosci*; 6:222.
- Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, Simmons PJ, Sensebe L, Keating A. (2010). Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*; 12(5):576-578.
- Rana D, Zreiqat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. (2017). Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*; 11(4):942-965.

- Ranganathan K, Lakshminarayanan V. (2012). Stem cells of the dental pulp. *Indian J Dent Res*; 23(4):558.
- Risau W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*; 386(6626):671-674.
- Robey PG, Kuznetsov SA, Bianco P, Riminucci M. (2021). Bone Marrow Stromal Cell Assays: *In Vitro* and *In Vivo*. *Methods Mol Biol*; 2230:379-396.
- Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*; 44(9):800-806.
- Rohban R, Pieber TR. (2017). Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int*; 2017:5173732.
- Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. (2008). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes *in vitro*. *Stem Cells*; 26(11):2884-2892.
- Rouget MC. (1873). Memoire sur le développement de la structures et les propriétés physiologiques des capillaires sanguines et lymphatiques. *Arch Physiol*; 5:603-663.
- Rouget MC. (1879) Sur la contractilite des capillaires sanguins. *CR Acad Sci*; 88:916-918.
- Różycka J, Brzóška E, Skirecki T. Aspects of pericytes and their potential therapeutic use. (2017). *Postepy Hig Med Dosw (Online)*; 71(0):186-197.
- Rowe RG, Daley GQ. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet*; 20(7):377-388.
- Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull*; 51(5):363-369.
- Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, Ma Q, Winkler EA, Ramanathan A, Zlokovic BV. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun*; 4:2932.
- Saito MT, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. (2015). Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World J Stem Cells*; 7(2):399-407.

- Salincarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. (2003). Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res*; 287(2):289-300.
- Sasaki JI, Zhang Z, Oh M, Pobocik AM, Imazato S, Shi S, Nör JE. (2020). VE-Cadherin and Anastomosis of Blood Vessels Formed by Dental Stem Cells. *J Dent Res*; 99(4):437-445.
- Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. (2013). Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther*; 4(3):66.
- Schulze M, Belema-Bedada F, Technau A, Braun T. (2005). Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion. *Genes Dev*; 19(15):1787-1798.
- Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argiolu F, Ristaldi MS, Sogos V. (2006). Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci*; 7:14.
- Serakinci N, Keith WN. (2006). Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer*; 42(9):1243-1246.
- Sheykhhasan M, Wong JKL, Seifalian AM. (2019). Human Adipose-Derived Stem Cells with Great Therapeutic Potential. *Curr Stem Cell Res Ther*; 14(7):532-548.
- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*; 8(3):191-199.
- Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, Wang CY. (2002). Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol*; 20(6):587-591.

Shingyochi Y, Orbay H, Mizuno H. (2015). Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. *Expert Opin Biol Ther*; 15(9):1285-1292.

Shostak S. (2006). (Re)defining stem cells. *Bioessays*; 28(3):301-308.

Sloan AJ, Smith AJ. (2007). Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*; 13(2):151-157.

Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, Hui Y. (2019). Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother*; 114:108765.

Snyder JC, Teisanu RM, Stripp BR. (2009). Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol*; 217:254-264.

Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T. (2009). *In vitro* differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*; 27(3):577-605.

Song L, Young NJ, Webb NE, Tuan RS. (2005). Origin and characterization of multipotential mesenchymal stem cells derived from adult human trabecular bone. *Stem Cells Dev*; 14(6):712-721.

Stapor PC, Sweat RS, Dashti DC, Betancourt AM, Murfee WL. (2014). Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *J Vasc Res*; 51(3):163-174.

Tamaki T. (2020). Biomedical applications of muscle-derived stem cells: from bench to bedside. *Expert Opin Biol Ther*; 20(11):1361-1371.

Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. (2006). The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest*; 86(12):1203-1207.

Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*; 9(11):1205-1216.

Tavazoie, M.; van der Veken, L.; Silva-Vargas, V.; Louissaint, M.; Colonna, L.; Zaidi, B.; Garcia-Verdugo, J.M.; Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*; 3, 279-288.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; 282(5391):1145-1147.

Tian X, Brookes O, Battaglia G. (2017). Pericytes from Mesenchymal Stem Cells as a model for the blood-brain barrier. *Sci Rep*; 7:39676.

Tilton RG, Kilo C, Williamson JR. (1979). Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvasc Res*; 18(3):325-335.

Tirino V, Paino F, De Rosa A, Papaccio G. (2012). Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol*; 879:443-463.

Tobita M, Orbay H, Mizuno H. (2011). Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med*; 11(57):160-170.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*; 3(9):778-784.

Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*; 23(6):727-737.

Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatopoulos B, Delforge A, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. (2008). Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC Genomics*; 9:166.

Trounson A, McDonald C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*; 17(1):11-22.

Trzaska KA, Kuzhikandathil EV, Rameshwar P. (2007). Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*; 25(11):2797-2808.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*; 35(2):e00191.

van Dijk CG, Nieuweboer FE, Pei JY, Xu YJ, Burgisser P, van Mulligen E, el Azzouzi H, Duncker DJ, Verhaar MC, Cheng C. (2015). The complex mural cell: pericyte function in health and disease. *Int J Cardiol*; 190:75-89.

Van Pham P. (2016). Mesenchymal stem cells in clinical applications. *Stem Cells Processing*; 2:37.

Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. (2002). Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 369-391.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle nerve*; 18(12):1417-1426.

Wang F, Remke M, Bhat K, Wong ET, Zhou S, Ramaswamy V, Dubuc A, Fonkem E, Salem S, Zhang H, Hsieh TC, O'Rourke ST, Wu L, Li DW, Hawkins C, Kohane IS, Wu JM, Wu M, Taylor MD, Wu E. (2015). A microRNA-1280/JAG2 network comprises a novel biological target in high-risk medulloblastoma. *Oncotarget*; 6(5):2709-2724.

Wilson A, Chee M, Butler P, Boyd AS. (2019). Isolation and Characterisation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Methods Mol Biol*; 1899:3-13.

Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*; 14(11):1398-1405.

Winkler EA, Sengillo JD, Bell RD, Wang J, Zlokovic BV. (2012). Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*; 32(10):1841-1852.

Winkler EA, Sengillo JD, Sagare AP, Zhao Z, Ma Q, Zuniga E, Wang Y, Zhong Z, Sullivan JS, Griffin JH, Cleveland DW, Zlokovic BV. (2014). Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 111(11):E1035-42.

Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV. (2013). Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*; 125(1):111-120.

Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. (2015). Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther*; 151:107-120.

Yan X, Owens DM. (2008). The skin: a home to multiple classes of epithelial progenitor cells. *Stem Cell Rev*; 4(2):113-118.

Yang S, Jin H, Zhu Y, Wan Y, Opoku EN, Zhu L, Hu B. (2017). Diverse Functions and Mechanisms of Pericytes in Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol*; 15(6):892-905.

Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, Can A, Topalkara K, Dalkara T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*; 15(9):1031-1037.

Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. (2019). Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med*;13(2):152-159.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*; 12(10):2813-2823.

Zheng B, Cao B, Crisan M, Sun B, Li G, Logar A, Yap S, Pollett JB, Drowley L, Cassino T, Gharaibeh B, Deasy BM, Huard J, Péault B. (2007). Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol*; 25(9):1025-1034.

Zimmermann K.W. (1923). Der feinere Bau der Blutcapillaren. *Z. Anat. Entwickl*; 68:29-109.

Zipori D. (2004). Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis*; 33(3):211-215.

Zou T, Jiang S, Dissanayaka WL, Heng BC, Xu J, Gong T, Huang X, Zhang C. (2019). *Sema4D/PlexinB1* promotes endothelial differentiation of dental pulp stem cells via activation of AKT and ERK1/2 signaling. *J Cell Biochem*; 120(8):13614-13624.

Libri di testo

Angeletti L.R., Gazzaniga V. *Storia, filosofia ed etica della medicina*. Elsevier Masson 2008, 3°ed.

Pavlović M., Radotić K. *Essential Characteristics of Stem Cells: Self-renewal, and Plasticity*. In: *Animal and plant Stem Cells*. Springer, Cham, 2017, 1°ed.

Pollard T.D., William C.E., Lippincott-Schwartz J. *Cell Biology*. Saunders/Elsevier 2008, 3°ed.

Normative

I. Direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 Marzo 2004 sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule;

II. Direttive 2006/17/CE della Commissione dell'8 Febbraio che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umane;

III. Direttiva 2006/86/CE della Commissione del 24 Ottobre 2006, che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in

tema di rintracciabilità, la notifica di reazione ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane;

IV. D. Lgs. n° 16 del 25 Gennaio 2010, “Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani”;

V. G.U. Serie Generale n°40 del 18 Febbraio 2010.



Copyright: © 2021 by the author.

Submitted for possible open access

publication under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).