

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE
CURRICULUM IN SCIENZE ODONTOSTOMATOLOGICHE

XXXII Ciclo
(Anni 2017-2020)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

TITOLO

**“Il PRP limita gli effetti negativi dell’alta concentrazione di glucosio
sulle cellule staminali mesenchimali della bolla di Bichat”**

RELATORE

Chiar.mo
Prof. Gilberto Sammartino

CANDIDATO

Dr. Michele Masucci

INDICE:

INTRODUZIONE.....pag .6

CAPITOLO 1

GLI EMOCONCENTRATI PIASTRINICI E IL PRP

- 1.1 Che cosa sono gli emoconcentrati piastrinici per uso
chirurgico?.....pag.10
- 1.2 Le origini.....pag.12
- 1.3 Il PRP e i fattori di crescita.....pag.14

CAPITOLO 2

IL DIABETE MELLITO

- 2.1 Le diverse forme di diabete.....pag.17
- 2.2 Il diabete mellito di tipo 2.....pag.19

CAPITOLO 3

BOLLA DI BICHAT: ANATOMIA, FUNZIONE, EMBRIOLOGIA E CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

3.1 Anatomia della Bolla di Bichat.....	pag.23
3.2 Funzione della Bolla di Bichat.....	pag.28
3.3 Embriologia della Bolla di Bichat.....	pag.29
3.4 Cellule staminali mesenchimali di derivazione adipocitaria.....	pag.30

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 Prelievo del campione di bolla di Bichat e preparazione del Platelet-Rich-Plasma (PRP).....	pag.33
4.2 Isolamento e crescita cellulare.....	pag.34
4.3 Differenziazione cellulare.....	pag.35
4.4 Analisi citometrica a flusso.....	pag.37
4.5 Analisi Real Time-PCR.....	pag.37
4.6 Analisi statistica.....	pag.38

CAPITOLO 5

RISULTATI

5.1 Isolamento e caratterizzazione delle BFP- MSC.....	pag.39
5.2 Effetto del glucosio sulla proliferazione e differenziazione osteogenica delle BFP-MSC.....	pag.43
5.3 Effetto del PRP sulla proliferazione e differenziazione delle BFP- MSC.....	pag.46

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag.51
---------------------------------	--------

BIBLIOGRAFIA	pag.55
---------------------------	--------

RINGRAZIAMENTI	pag.71
-----------------------------	--------

INTRODUZIONE

I difetti maxillo-facciali dovuti a traumi, malattia parodontale o resezione in seguito a patologia neoplastica portano alla riduzione del volume osseo e spesso richiedono la ricostruzione ossea prima della riabilitazione funzionale. Sia la dimensione che la posizione del danno possono influire sulla riparazione ossea e la presenza di comorbilità metaboliche e/o vascolari aggrava ulteriormente la riabilitazione. Ad esempio, è risaputo che i pazienti con diabete mellito hanno un rischio aumentato di soffrire di parodontite e fallimenti implantari rispetto ai soggetti non diabetici.¹ Il diabete è anche associato ad un rischio significativamente più alto di fallimento degli innesti ossei intraorali a blocco nelle procedure di rigenerazione ossea² e sembra anche influenzare il processo di osteogenesi nella fase iniziale della rigenerazione ossea guidata³. D'altra parte, la terapia parodontale e un attento controllo della placca sono stati associati a un miglior controllo glicemico nel diabete mellito di tipo 2.⁴ Pertanto, la compromissione metabolica del diabete, compresi i livelli cronici elevati di glucosio nel sangue e di altri metaboliti, può contribuire a ridurre la guarigione ossea. Tuttavia, un numero limitato di studi ha valutato in maniera

diretta l'effetto del glucosio sulla rigenerazione ossea⁵. Oltre ai biomateriali chimicamente ottenuti, sono stati considerati diversi approcci biologici per favorire la ricostruzione ossea. Questi includono l'uso di cellule staminali mesenchimali (MSC) e gli emoconcentrati piastrinici. Le MSC sono ampiamente utilizzate per il trattamento di tessuti danneggiati, in seguito a traumi o altre cause patologiche.⁶ Queste cellule vengono isolate da midollo osseo, tessuto adiposo, tendini, membrane sinoviali, sistema nervoso, pelle, periostio e muscoli.⁷ Anche se il midollo osseo rappresenta la fonte maggiormente utilizzata di MSC in campo clinico, il tessuto adiposo può rappresentare un'alternativa valida. Infatti questo è facilmente accessibile in grandi quantità con una procedura di prelievo minimamente invasiva e che consente di ottenere un numero elevato di cellule.⁸ All'interno del tessuto adiposo, le MSC si trovano in nicchie specifiche degli strati più profondi. Possono essere isolate come parte della frazione acquosa, generalmente nota come frazione vascolare stromale (SVF), derivata dalla digestione enzimatica di biopsie o liposuzioni del tessuto adiposo. La SVF contiene una combinazione di MSC, cellule precursori endoteliali, cellule endoteliali, macrofagi, cellule muscolari lisce, linfociti, periciti e pre-adipociti. I depositi di tessuto adiposo sono disseminati in diverse

regioni anatomiche, sia sottocutanee che viscerali. I siti da cui sono abitualmente raccolti i campioni di tessuto adiposo per scopi di medicina rigenerativa sono l'addome, il seno, il ginocchio e la coscia. Tuttavia, per la scelta appropriata, si dovrebbe considerare la disponibilità del tessuto e la facilità di accesso. Ad esempio, per le applicazioni maxillo-facciali, sta emergendo la possibilità di utilizzare bolla di Bichat (BFP – Bichat's fat pad) come fonte di MSC. La BFP è un cuscinetto adiposo situato su entrambi i lati del viso tra i buccinatori e diversi muscoli superficiali, tra cui il massetere, il maggiore zigomatico e i muscoli zigomatici minori.⁹ A causa della sua semplice accessibilità chirurgica, la BFP può essere un'alternativa affidabile come sito donatore per i pazienti che richiedono la ricostruzione ossea.¹⁰ I derivati piastrinici sono ampiamente utilizzati in tutti i campi medici che richiedono la rigenerazione tissutale grazie agli effetti positivi nell'accelerazione e nella promozione della guarigione delle ferite, della riduzione del sanguinamento e della rigenerazione dei tessuti molli e duri.¹¹ Durante la normale riparazione tissutale, le piastrine rilasciano alte concentrazioni di proteine biologicamente attive, come fattori di crescita (GF) e altre sostanze. Queste includono il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) e il fattore di crescita

endoteliale vascolare (VEGF) che sono principalmente coinvolti nella proliferazione cellulare, nella chemiotassi e nella produzione e nell'angiogenesi della matrice extracellulare e giocano ruoli critici nelle fasi di emostasi, proliferazione e rimodellamento della guarigione delle ferite. La degranolazione piastrinica porta anche al rilascio di citochine e chemochine, come RANTES (CCL5), interleuchina (IL) -1 β , IL-8 e proteina infiammatoria dei macrofagi (MIP) -1 α , che contribuiscono al processo di guarigione. Precedenti studi hanno riportato un effetto stimolante del plasma ricco di piastrine (PRP) nell'aumentare la crescita e la motilità delle MSC derivate da tessuto adiposo.¹² Tuttavia, l'effetto del PRP sulle MSC isolate dalla BFP non è stato determinato. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato di isolare le MSC dalla BFP e di valutare l'impatto del glucosio e del PRP sulla loro proliferazione e differenziazione osteogenica.

CAPITOLO 1 – GLI EMOCONTRATI PIASTRINICI E IL PRP

1.1 CHE COSA SONO GLI EMOCONCENTRATI PIASTRINICI PER USO CHIRURGICO?

I concentrati piastrinici per uso chirurgico sono prodotti autologhi preparati attraverso la centrifugazione di un campione di sangue del paziente.¹³ Il concetto di queste tecnologie è raccogliere e riunire le componenti più attive del campione di sangue - piastrine (ricche di fattori di crescita), fibrina e talvolta leucociti - e prepararli in una forma clinicamente utilizzabile.^{14,15} Queste preparazioni possono essere soluzioni o gel e possono essere iniettate o collocate in un sito chirurgico, su una ferita o in una zona lesa, per rigenerare i tessuti danneggiati. Nella maggior parte di queste tecniche, il sangue viene raccolto in provette contenenti anticoagulante e quindi elaborato dopo centrifugazione 2-step.¹⁶ Il primo step di centrifugazione viene utilizzato per separare il sangue in 3 strati che seguono un gradiente in base al loro peso: sul fondo della provetta troviamo globuli rossi, plasma acellulare (chiamato plasma povero di piastrine, PPP) nella parte superiore della provetta ed uno strato biancastro, tra gli altri due strati, (a volte chiamato buffy coat, come nella medicina

trasfusionale) ricco di piastrine e cellule. I globuli rossi vengono quindi scartati e la seconda fase di centrifugazione viene utilizzata per raccogliere solo il buffy coat e parte del plasma acellulare. La sospensione liquida finale di piastrine viene chiamata Platelet-Rich Plasma (PRP) in medicina trasfusionale, ed il termine è stato utilizzato per raggruppare le molte famiglie di concentrati piastrinici per uso chirurgico.¹³ Questa sospensione di piastrine può essere iniettata in un sito danneggiato (per esempio in tendini o articolazioni in medicina dello sport)^{17,18} o attivata con trombina bovina (o cloruro di calcio, o con attivatore equivalente piastrinico).^{19,20} L'attivazione della sospensione provoca il rilascio di fattori di crescita piastrinici e la polimerizzazione del fibrinogeno in fibrina, per formare un gel piastrinico, simile ad una colla di fibrina, che può essere utilizzato su un sito chirurgico od una ferita.²¹ Questa è la descrizione generale della produzione di concentrati piastrinici, ma esistono diverse varianti nella produzione. In particolare per la sottofamiglia chiamata Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), il sangue viene prelevato in provette senza anticoagulante, trattato con una centrifugazione a singolo step e non occorre un attivatore piastrinico.²² La filosofia di questi trattamenti è, infatti, concentrare e utilizzare gli effetti positivi degli attori del processo di coagulazione. Piastrine, fibrina e leucociti

agiscono naturalmente in sinergia per promuovere la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti e il concetto di concentrati piastrinici per uso chirurgico è di moltiplicare questo effetto di coagulazione/rigenerazione su di un sito chirurgico od una ferita. Nella storia di queste tecniche, i ricercatori si sono concentrati, alternativamente, sulla matrice di fibrina, le piastrine, i fattori di crescita e più recentemente sui leucociti e le cellule staminali circolanti¹⁵, e la terminologia di questi materiali si è evoluta seguendo queste tendenze.²³

1.2 LE ORIGINI

La storia di queste tecnologie inizia con le colle di fibrina sviluppate più di 40 anni fa.²⁴ La necessità di adiuvanti chirurgici, allo scopo di migliorare la guarigione ed il controllo del sanguinamento diffuso, promosse lo sviluppo di tali metodiche. Come prima matrice di coagulazione, la fibrina è, infatti, un elemento chiave del processo di guarigione, e queste colle sono tutt'oggi utilizzate.²⁵ In un secondo tempo, alcuni ricercatori hanno cercato di migliorare i loro adesivi di fibrina, preparandoli attraverso la combinazione con gli altri attori chiave della coagulazione. Questi preparati autologhi sono stati

definiti «miscele piastrine - fibrinogeno - trombina» e sono stati utilizzati con successo in oftalmologia^{26,27}, chirurgia generale²⁸ e neurochirurgia²⁹. Altri Autori li hanno definiti «gelatina di piastrine».³⁰ In queste applicazioni, queste nuove preparazioni sono state utilizzate come adesivi tissutali di fibrina ed è stato sostenuto che il ruolo delle piastrine servisse solo a rafforzare l'architettura della matrice fibrinica. La presenza di fattori di crescita delle piastrine e le potenziali proprietà curative dirette non sono state sostenute o addirittura considerate. Ci sono voluti molti anni prima che il concetto si evolvesse e che queste preparazioni fossero considerate avere proprietà curative dirette. Nel 1986, Knighton et al.³¹ hanno sviluppato un'applicazione clinica efficace per il trattamento delle ulcere cutanee croniche non-guarenti, usando una preparazione che utilizzava una procedura di centrifugazione 2-step e denominata "fattori di guarigione della ferita derivati dalle piastrine"(PDWHF). In altri articoli del 1988 e del 1990^{32,33}, la stessa tecnica è stata nominata "formula di guarigione della ferita derivata dalle piastrine (PDWHF)". In quel momento, il termine "Plasma ricco di piastrine" è stato utilizzato solo come un termine tecnico e non era il nome del prodotto finale utilizzato. Pochi anni dopo, Whitman et al.³⁴ hanno pubblicato i

loro risultati clinici in chirurgia orale e maxillo-facciale, utilizzando un concentrato piastrinico definito "gel piastrinico".

1.3 IL PRP E I FATTORI DI CRESCITA

Il PRP è ottenuto mediante prelievo di sangue venoso del paziente e raccolto in provette di vetro contenenti un anticoagulante, citrato trisodico al 10%. Le provette vengono posizionate in una centrifuga a 1200 rpm per 15 minuti. In questo modo si ottiene la separazione di 3 frazioni: platelet-poor plasma, plasma povero di piastrine, (PPP) superiormente, PRP nel mezzo, e globuli rossi nella porzione inferiore. Due ml dello strato superiore, corrispondente al plasma povero di piastrine, viene aspirato, da ogni provetta, con una pipetta di Pasteur, e scartato. Il PRP viene prelevato da ogni provetta, insieme ad 1-2 mm della frazione di globuli rossi per garantire che siano raccolte le piastrine più grandi e nuove. Si effettua, quindi, una seconda centrifugazione ed il PRP può poi essere attivato, mediante l'utilizzo di trombina bovina, con conseguente polimerizzazione del fibrinogeno in fibrina e rilascio di fattori di crescita piastrinici, ottenendo un gel piastrinico. L'uso del termine "Platelet-Rich Plasma" (PRP) è iniziato con l'articolo di Marx et al. nel 1998¹⁹, in uno studio sugli effetti di

una preparazione ricca di piastrine durante la ricostruzione delle ossa maxillo-facciali. L'uso del termine PRP da parte di questi Autori era, in quel momento, del tutto corretto. La preparazione, infatti, era stata prodotta utilizzando un separatore cellulare in un laboratorio di ematologia (quindi era simile ad un PRP utilizzato per la trasfusione). La sospensione di piastrine è stata poi attivata in un gel mediante trombina bovina. Il termine "plasma ricco di piastrine" (PRP) è stato inizialmente sviluppato nel 1954 da Kingsley per indicare un concentrato piastrinico, usato per il trattamento di pazienti affetti da grave trombocitopenia.³⁵ 15 Dopo questo articolo, il termine di PRP - associato al concetto di fattori di crescita - si è diffuso e ben presto è stato utilizzato per nominare tutti i tipi di preparati e tecniche.^{36,37} Un enorme numero di nuove tecniche sperimentali o commerciali sono state proposte durante gli ultimi 15 anni.³⁸⁻⁴³ È in questo momento che è iniziata una confusione significativa in letteratura, come nella maggior parte degli articoli sui concentrati piastrinici. Molti protocolli diversi (disponibili in commercio o "home-made") sono stati testati con il nome "PRP", ma in molti casi senza un'adeguata caratterizzazione del contenuto e dell'architettura dei concentrati testati.⁴⁴ Inoltre, così come il concetto di "rigenerazione attraverso i fattori di crescita" ha sedotto molti Autori⁴⁵⁻⁴⁷, il ruolo chiave della

fibrina è stato quasi completamente trascurato per molti anni, come se 30 anni di Ricerca in adiuvanti chirurgici basati sulla fibrina non fossero quasi esistiti. Come risultato, anche se tali PRP sono stati ampiamente studiati in vitro e in vivo in molte applicazioni, la letteratura è molto contraddittoria e controversa, e i dati sono difficili da ordinare e interpretare.

CAPITOLO 2 – IL DIABETE MELLITO

2.1 LE DIVERSE FORME DI DIABETE

Il diabete mellito non è una singola entità, ma piuttosto un gruppo di disordini metabolici accomunati dal dato clinico dell'iperglicemia. L'iperglicemia nel diabete è causata dal difetto di secrezione o di attività dell'insulina, o più frequentemente, di entrambi. L'iperglicemia cronica e la conseguente disregolazione metabolica possono essere associate ad alterazioni secondarie di svariati organi, soprattutto reni, occhi, nervi e vasi.⁴⁸ Gli individui affetti dalla malattia nel mondo sono ormai vicini ai 400 milioni e la stima è che raggiungano i 600 milioni entro il 2035.⁴⁹ I valori di glucosio ematico sono normalmente mantenuti in un range molto contenuto, di solito tra i 70 e i 120mg/dl. La diagnosi di diabete viene fatta quando si osserva uno dei seguenti criteri:

1. Una glicemia casuale superiore a 200 mg/dl
2. Una glicemia a digiuno superiore a 126mg/dl
3. Un anomalo test di tolleranza orale al glucosio (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT), nel quale il glucosio è superiore a 200 mg/dl 2 ore dopo un carico standard di carboidrati.

Individui con una glicemia a digiuno inferiore a 110 mg/dl, inferiore a 140 mg/dl dopo OGTT, sono considerati euglicemici. Gli individui con valori di glicemia a digiuno maggiori di 110 mg/dl ma inferiori di 126 mg/dl, o valori OGTT superiori a 140 mg/dl ma inferiori a 200 mg/dl, hanno una ridotta tolleranza al glucosio (“prediabete”). I soggetti prediabetici hanno un rischio significativo di progressione nel tempo verso il diabete conclamato e un 5-10% per anno sfocia in un diabete mellito.⁴⁸ Sebbene tutte le forme di diabete mellito abbiamo in comune l’iperglicemia, i processi patogenetici implicati nello sviluppo dell’iperglicemia variano ampiamente ed è su questi che verte la classificazione delle forme di diabete.

La maggioranza dei casi di diabete rientra in una delle due seguenti grandi classi:

1. Diabete mellito di tipo 1: è una patologia autoimmune caratterizzata da un deficit assoluto di insulina causato dalla distruzione delle cellule β del pancreas. Rappresenta circa il 5-10 % dei casi e rappresenta il sottotipo più rappresentato nei soggetti al di sotto dei 20 anni.
2. Diabete mellito di tipo 2: è causato tra l’associazione tra una resistenza periferica all’azione dell’insulina e un’inadeguata risposta secretoria da parte delle cellule β del pancreas. Circa il

90-95% dei pazienti diabetici soffre di diabete di tipo 2. Nonostante sia ritenuta una malattia dell'adulto, la prevalenza di diabete di tipo 2 nei bambini e negli adolescenti sta crescendo in maniera allarmante.⁵⁰

Le altre forme di diabete riconoscono cause secondarie e/o monogenetiche: anomalie genetiche della funzione cellulare β , anomalie genetiche dell'azione dell'insulina, deficit del pancreas endocrino, endocrinopatie, infezioni, farmaci e altre sostanze e sindromi genetiche associate a diabete.⁴⁸

2.2 IL DIABETE MELLITO DI TIPO 2

Il diabete di tipo 2 è una complessa malattia multifattoriale. I fattori ambientali, come la vita sedentaria e le abitudini alimentari, svolgono un ruolo molto importante. Anche i fattori genetici svolgono un ruolo molto importante nella patogenesi, come sottolineato dalla concordanza della malattia compresa tra il 35% e il 60% in gemelli monozigoti rispetto quasi alla metà nei gemelli dizigoti. Il rischio d'insorgenza è di oltre il doppio se entrambi i genitori ne soffrono. L'ulteriore evidenza di una base genetica è emersa recentemente da

alcuni studi di associazione estesi a tutto il genoma che hanno identificato oltre una dozzina di loci di suscettibilità.^{51,52}

I due difetti metabolici che caratterizzano il diabete di tipo due sono:

1. Una minore capacità dei tessuti periferici di rispondere all'insulina (insulino-resistenza)
2. La disfunzione delle cellule β che si manifesta con una inadeguata secrezione di insulina in risposta all'insulino-resistenza e l'iperglicemia.

Si definisce insulino-resistenza l'incapacità dei tessuti bersaglio di rispondere normalmente all'insulina. L'insulino-resistenza comporta un minore assorbimento del glucosio nel muscolo, una ridotta glicolisi e ossidazione degli acidi grassi nel fegato e l'incapacità dell'ormone a sopprimere la gluconeogenesi epatica. Sono stati riferiti numerosi difetti funzionali nella via di regolazione dell'insulina negli stati di insulino-resistenza che attenuano la trasduzione del segnale.⁵³ L'associazione epidemiologica tra obesità e diabete di tipo 2 è stata descritta per decenni. L'obesità ha profondi effetti sulla sensibilità dei tessuti all'insulina e, di conseguenza, sull'omeostasi del glucosio sistematico. L'insulino-resistenza è presente anche nell'obesità semplice senza iperglicemia, a dimostrazione del ruolo fondamentale dell'alterazione della regolazione dell'insulina nella condizione di

eccesso di adipe. L'insulino-resistenza associata all'obesità è indotta da adipochine, acidi grassi liberi e infiammazione cronica del tessuto adiposo. Le cellule β pancreatiche compensano l'insulino-resistenza con un'ipersecrezione di insulina. Tuttavia, ad un certo punto la compensazione delle cellule β è seguita da una carenza delle stesse, e insorge il diabete.⁵⁴ Lo stato di iperinsulinemia è una compensazione alla resistenza periferica e spesso mantiene il livello di glicemia normale per anni. L'osservazione secondo la quale non tutti gli individui obesi sviluppano diabete conclamato suggerisce che deve esistere anche una predisposizione intrinseca all'insufficienza delle cellule β . Studi recenti hanno mostrato che le varianti alleliche associate al rischio più elevato di diabete di tipo 2 nel gene diabetogeno TCF7L2 sono associate a una riduzione della secrezione di insulina dalle isole, a indicare una propensione preesistente verso l'insufficienza delle cellule β .⁵⁵ La morbilità associata con il diabete di lunga durata di qualunque tipo deriva da numerosi complicanze gravi che interessano principalmente le arterie muscolari di medio e grande calibro (macroangiopatia), così come i capillari degli organi bersaglio (microangiopatia). La macroangiopatia provoca nei diabetici una aterosclerosi accelerata, determinando maggior rischio di infarto del miocardio, ictus e di gangrena degli arti inferiori. Gli effetti della

microangiopatia sono più gravi nella retina, nei reni e nei nervi periferici causando rispettivamente retinopatia, nefropatia e neuropatia diabetiche. La patogenesi delle complicanze a lungo termine del diabete è multifattoriale, sebbene l'iperglicemia persistente (glucotossicità) sembri essere un mediatore chiave. E' importante sottolineare che l'iperglicemia non è l'unico fattore responsabile delle complicanze a lungo termine del diabete e che altre anomalie sottostanti e comorbilità, quali l'obesità, rivestono un ruolo importante.⁴⁸

CAPITOLO 3 - BOLLA DI BICHAT: ANATOMIA, FUNZIONE, EMBRIOLOGIA E CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

3.1 ANATOMIA DELLA BOLLA DI BICHAT

La bolla di Bichat è una struttura anatomica costituita da una massa capsulata di tessuto adiposo, localizzata all'interno di entrambi gli spazi masticatori. Essa consiste in una struttura arrotondata e biconvessa, di circa 10 g di peso, 6 mm di spessore massimo e 10 ml di volume, senza differenze significative tra il lato destro ed il lato sinistro.⁵⁶ Dallo studio di Zhang e collaboratori⁵⁷ possiamo ricavare numerose informazioni circa la sua anatomia. Essa viene distinta in 3 lobi, ciascuno incapsulato da una membrana indipendente, fissato da legamenti e irrorato da differenti fonti arteriose:

1. Lobo anteriore: di forma triangolare, è composto da più setti connettivali che separano il tessuto grasso in piccole masse. Prende rapporto con il dotto parotideo circondandolo, con la vena facciale anteriore, che passa attraverso il margine antero-inferiore, con i vasi e nervi infraorbitari, con il muscolo canino e riempie gli spazi attorno il muscolo quadrato del labbro superiore. La parte superiore è irrorata dall'arteria alveolare postero-superiore e la

parte inferiore dall'arteria buccinatoria. Il lobo anteriore è localizzato sotto lo zigomo e si estende alla parte anteriore del buccinatore, al mascellare ed allo spazio del muscolo quadrato del labbro superiore e dello zigomatico maggiore. Il lobo anteriore si unisce con l'intermedio ed il posteriore per mezzo di tessuto connettivo lasso e con la membrana del muscolo buccinatore per mezzo di tessuto connettivo denso attorno l'apertura del dotto parotideo.

2. Lobo intermedio: si trova nello spazio attorno al lobo posteriore, alla parte laterale del mascellare ed al lobo anteriore. Esso è composto da una struttura similmembranosa con un sottile strato di tessuto grasso nell'adulto ed una grossa massa di tessuto grasso nel bambino.
3. Lobo posteriore: si trova nello spazio masticatorio e negli spazi limitrofi. Esso decorre in alto verso la fessura infraorbitale e lo spazio circostante il muscolo temporale, in basso verso il bordo superiore del corpo mandibolare ed indietro verso il bordo anteriore del tendine del temporale e del ramo mandibolare.

La bolla di Bichat può essere altresì suddivisa in una porzione principale, rivestita da una capsula connettivale ed in 4 estensioni o

processi. La porzione principale chiamata “corpo” è situata in prossimità del bordo anteriore del muscolo massetere. Si estende profondamente fino ad arrivare alla mascella posteriore e prosegue lungo il vestibolo buccale. Il dotto parotideo ed i rami zigomatico e buccale del nervo facciale, incrociano ed aggirano la superficie anteriore e laterale della bolla. Le quattro estensioni precedentemente citate, possono essere così elencate:

1. Buccale: è la parte più bassa del lobo posteriore al di sotto del dotto parotideo di Stenone. Essa rappresenta la porzione più superficiale della bolla ed è responsabile del contorno della guancia. Nel bambino questo processo spesso si estende all'indietro e giace sulla superficie del massetere.
2. Pterigoidea: è un'estensione posteriore che generalmente si trova nello spazio pterigomandibolare ed avvolge i vasi e nervi vicini, come il fascio vascolo-nervoso mandibolare ed il nervo linguale. Essa rappresenta l'estensione più piccola. Si estende in una direzione verso il basso e all'indietro verso la porzione laterale delle lamine pterigoidee e spesso nel bambino si estende all'indietro lungo gli spazi profondi verso la fossa della ghiandola sottomandibolare.

3. Pterigopalatina: è costituita da tessuto grasso che si estende verso la fossa pterigopalatina, dove provvede ad incapsulare i vasi pterigopalatini. Questa estensione, inoltre, decorre in alto attraverso la fessura infraorbitale insieme ai vasi infraorbitali, agendo come una guaina vascolare che si fonde al tessuto proveniente dal lobo anteriore.
4. Temporale: si divide in una porzione superficiale ed una profonda. La parte superficiale dell'estensione temporale si trova tra la fascia temporale profonda, muscolo temporale e tendine. L'estremità anteriore gira verso l'interno lungo il bordo anteriore del muscolo temporale e continua con la parte profonda. La parte profonda si trova presso la parete laterale dell'orbita, il processo frontale dello zigomatico e si proietta all'indietro nello spazio infratemporale.

Il corpo della bolla insieme all'estensione buccale costituisce il 50% dell'intera struttura, rappresentando quindi la porzione più rilevante clinicamente. La bolla di Bichat è fissata per mezzo di 5 legamenti all'osso mascellare, alla parte posteriore dell'osso zigomatico, al bordo interno ed esterno della fessura infraorbitale, al tendine del muscolo temporale ed alla membrana del buccinatore:

1. Legamento mascellare: è un ispessimento della faccia interna della

capsula del lobo anteriore ed aderisce al di sopra dell'estremità inferiore dell'adesione dello zigomatico e della mascella.

2. Legamento zigomatico posteriore: connette il lobo intermedio con l'osso zigomatico. Si forma dalla capsula laterale del lobo intermedio, dal lobo posteriore e dalla porzione superficiale del processo temporale.
3. Legamenti infraorbitali mediale e laterale: connettono rispettivamente la porzione mediale e laterale del lobo intermedio alla fessura infraorbitale. Consistono in un ispessimento del tessuto mediale della capsula del lobo posteriore.
4. Legamento del tendine temporale: si forma dal tessuto posteriore della capsula del lobo posteriore, connettendo il lobo posteriore con il tendine del muscolo temporale fornendogli protezione a livello del processo coronoideo.
5. Legamento buccinatore: è un ispessimento costituito da un'amalgamazione dei tessuti inferiori della capsula dei lobi anteriori e posteriori che ha la funzione di connettere il lobo anteriore con la membrana del muscolo buccinatore.

La bolla di Bichat è una struttura riccamente vascolarizzata. Stuzin² ne descrive l'irrorazione sanguigna distinguendo i vasi che ne sono responsabili :

- L'arteria buccinatoria e l'arteria temporale profonda, rami della mascellare interna;
- L'arteria trasversa della faccia, ramo collaterale dell'arteria temporale superficiale;
- Piccoli rami provenienti dall'arteria facciale.

3.2 FUNZIONE DELLA BOLLA DI BICHAT

Formata principalmente da cellule adipose e connettivali, la bolla di Bichat svolge compiti molto importanti nell'individuo adulto, come il riempimento degli spazi masticatori che consente una corretta masticazione ed una corretta suzione.⁵⁸ Oltre alle funzioni annoverate precedentemente, i lobi della bolla di Bichat riempiono altri spazi facciali profondi oltre gli spazi masticatori, come ad esempio lo spazio infratemporale, la fossa pterigo-palatina, lo spazio anteriormente alla parotide, la fossa della ghiandola sottomandibolare e soprattutto gli spazi tra i muscoli mimici.⁵⁸ Quando i muscoli masticatori od i

muscoli mimici si contraggono, questi lobi funzionano da cuscinetto di scivolamento. Un' ulteriore funzione della bolla di Bichat è la protezione dei fasci neurovascolari profondi dai danni causati dall'estrusione della contrazione muscolare o dall'impulso di forze esterne. Parte del lobo anteriore e le estensioni del lobo posteriore avvolgono le succitate strutture funzionando come un ammortizzatore.⁵⁸

3.3 EMBRIOLOGIA DEL TESSUTO ADIPOSO DELLA BOLLA DI BICHAT

La maggior parte della conoscenza che riguarda la morfogenesi prenatale del tessuto adiposo umano deriva dagli studi condotti negli anni 80' da Poissonnet e collaboratori⁵⁹ che studiarono la crescita e lo sviluppo del tessuto adiposo durante la gestazione, usando proprio la bolla di Bichat come modello del sistema. Gli Autori notarono che il tessuto adiposo si differenzia durante il secondo trimestre, tra la 14° e la 16° settimana di vita intrauterina. Inoltre, dopo la 23° settimana di gestazione, mentre il numero di lobuli adiposi rimane pressoché costante, la dimensione di questi aumenta sino alla 29° settimana, suggerendo che il periodo dalla 14° alla 23° settimana è un periodo

sensibile nello sviluppo del tessuto adiposo. Dopo 14 settimane, la guancia è la prima struttura della faccia, dove il tessuto adiposo si sviluppa dalle zone profonde a quelle superficiali. Il grasso si sviluppa attorno la vescicola ottica dopo la 18^o settimana tra la sclera e la parete dell'orbita. Inoltre, la bolla di Bichat gioca un ruolo chiave nella prominenza della guancia nel neonato e nell'infante. Essa è ben sviluppata nei feti prematuri ed è uno dei siti dove si ha la deposizione di tessuto adiposo precocemente. Facendo un'analisi dei lipidi contenutevi attraverso delle tecniche di cromatografia, Bagdade e Hirsch⁶⁰ misurarono e catalogarono la composizione degli acidi grassi. Gli Autori notarono che durante il terzo mese di gravidanza ci sono cambiamenti marcati degli acidi grassi della bolla di Bichat rispetto a quelli materni. Queste differenze consistono principalmente in un'attività di lipogenesi risultante da una dieta ad alto contenuto di carboidrati.

3.4 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI DERIVAZIONE ADIPOCITARIA

Le cellule staminali mesenchimali rappresentano un'importante risorsa per la medicina rigenerativa. Esse possono essere isolate da

vari tessuti come midollo osseo, legamento parodontale, tendini, osso trabecolare, membrane sinoviali, muscoli e tessuto adiposo. Anche se il midollo osseo rappresenta la fonte più utilizzata di cellule staminali mesenchimali, il tessuto adiposo è una valida alternativa ad esso, considerata la facile accessibilità nel prelievo di notevoli quantità di tessuto e l'alto numero di cellule staminali mesenchimali di derivazione adipocitaria, potendo inoltre adoperare procedure di prelievo che sono meno invasive e che procurano una minore morbilità al paziente.⁶¹ Le prime cellule staminali di derivazione adipocitaria sono state isolate dal tessuto adiposo sottocutaneo, il quale è di solito asportato nelle procedure di chirurgia estetica, ad opera di Zuk e collaboratori⁶² i quali notarono l'espressione di alcuni marcatori cellulari come CD13, CD29, CD 44, CD71, CD90, CD105/SH2, SH3 e STRO1. Infatti, le cellule staminali di derivazione adipocitaria hanno l'abilità di differenziare in una moltitudine di tipi cellulari mesenchimali come osteoblasti, condrociti, adipociti, miociti, cardiomiociti e cellule endoteliali. Inoltre evidenze crescenti suggeriscono che esse sono in grado di dare origine ad altri tipi cellulari, come quelle di origine ectodermica ed endodermica.^{63,64} Per la sua localizzazione e per la possibilità di un facile accesso chirurgico necessitando soltanto di un' anestesia locale, la bolla di Bichat si

configura come un' ottimale fonte di cellule staminali di derivazione adipocitaria in alternativa al tessuto adiposo sottocutaneo.⁶⁵ Gli studi in vitro di Niada⁶⁵ e Broccaioli¹⁰ hanno riportato come le cellule staminali di derivazione adipocitaria abbiano caratteristiche di staminalità e capacità differenziativa in senso osteoblastico ed adipocitario simile, se non migliore, rispetto a quelle prelevate dal tessuto adiposo sottocutaneo, avendo valutato la comparsa di specifici markers tissutali come l'attività di fostatasi alcalina, la deposizione di collagene e di matrice calcificata, l' espressione di osteonectina ed la formazione di vescicole lipidiche.

CAPITOLO 4 – MATERIALI E METODI

4.1 PRELIEVO DEL CAMPIONE DI BOLLA DI BICHAT E PREPARAZIONE DEL PLATELET-RICH-PLASMA (PRP)

Campioni di bolla adiposa di Bichat (BFP) sono stati prelevati da 9 pazienti (M/F: 4/5, età media $37,5 \pm 3,5$ anni) sottoposti a interventi di ricostruzione ossea mascellare utilizzando BFP come membrana vascolarizzata biologica. I pazienti non presentavano malattie metaboliche e immunologiche e non hanno ricevuto diagnosi di alcun tipo di cancro. I campioni di grasso sono stati ottenuti alla fine della ricostruzione dell'osso mascellare dagli stessi chirurghi usando pinzette e forbici sterili. I campioni sono stati immediatamente inviati al laboratorio per l'isolamento cellulare. Per i prelievi di plasma, 4 donatori di sangue sani (M/F: 4/0 età media $31,5 \pm 6,24$ anni) sono stati coinvolti nello studio. Tutti erano non fumatori, non obesi (BMI misurava 23.68 ± 3.42) e con una conta piastrinica $> 200.000/\mu\text{l}$. Il sangue è stato prelevato da ciascun soggetto ed è stato raccolto in una provetta di Vacutainer (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ) contenente una soluzione di anticoagulante trisodico citrato al 10% per la preparazione del plasma ricco di piastrine (PRP). Il sangue intero venoso è stato inizialmente centrifugato a 350 giri per 15

minuti. Il supernatante è stato trasferito in un'altra provetta e una seconda fase di centrifugazione è stata eseguita per 10 minuti a 980 giri. Dopo la centrifugazione, la frazione superiore contenente Platelet Poor Plasma (PPP) è stata scartata e la frazione inferiore contenente PRP è stata utilizzata per le procedure sperimentali (come descritto da Passaretti et al., 2014).⁶⁶ La densità piastrinica risulta aumentata nel PRP rispetto a quella del sangue intero venoso originale. Per le preparazioni del gel piastrinico, il campione è stato incubato per 1 ora a 37 ° C con calcio gluconato (Galenica Senese - 10 mg/ml di concentrazione finale) per consentire la formazione del coagulo.⁶⁷ Il consenso informato è stato ottenuto da ogni soggetto prima delle procedure. Entrambe le procedure sono state approvate dal comitato etico dell'Università di Napoli Federico II.

4.2 ISOLAMENTO E CRESCITA CELLULARE

I campioni di BFP sono stati tagliati in piccoli pezzi e sono stati digeriti enzimaticamente mediante soluzione di collagenasi (1 mg/ml-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 1 ora a 37 ° C. La frazione vascolare stromale (SVF) contenente cellule staminali mesenchimali (MSC) è stata ottenuta mediante centrifugazione a 1200 g per 5 minuti

e tenuta in DMEM regolare (Dulbecco's modified Eagle's medium) - F12 (1: 1) integrato con 10% di siero bovino fetale (FBS), 2 mM di glutammina, 100 unità/ml di penicillina e 100 unità/ml di streptomicina (Lonza, Group Ltd, Basel, Switzerlandz).⁶⁸ Per la valutazione della crescita, 1×10^4 BFP-MSCs sono state seminate in piastre di coltura da 12 pozzetti. Il giorno seguente, le cellule sono state posizionate in terreno privo di siero integrato con BSA allo 0,25% per 9 ore e incubate con stimoli specifici per 48 ore e 72 ore. Il conteggio delle cellule è stato eseguito dalla camera di Neubauer e con il contatore di cellule TC10TMAutomated (Bio-Rad, Hercules, CA) secondo il protocollo del produttore.

4.3 DIFFERENZIAZIONE CELLULARE

Le cellule sono state messe in coltura a una densità di 5×10^4 cellule in piastre da 24 pozzetti e quando le colture hanno raggiunto una confluenza dell'100%, è stata aggiunta una miscela di differenziazione appropriata. La differenziazione adipogenica è stata eseguita come descritto da Isakson P et al.⁶⁹ e valutata dall'accumulo di lipidi usando la colorazione Oil Red O (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). La differenziazione osteogenica è stata eseguita come descritto da

Huifang Yang et al.⁷⁰ e valutata rilevando i foci di mineralizzazione usando la colorazione di Alizarin Red S (ARS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Rapidamente, le cellule sono state fissate con formaldeide al 4% per 15 minuti, lavate con acqua bidistillata (bdH₂O) e colorate con ARS ph 4.1 per 20 minuti a temperatura ambiente con agitazione delicata. Quindi, il colorante non incorporato è stato rimosso e le cellule lavate con bdH₂O. Immagini di monostrati colorati sono state ottenute dal sistema di fotocamere digitali del microscopio Olympus DP20 (Olympus Corporation, Tokyo, Giappone). Abbiamo anche eseguito un'analisi dell'mRNA (vedi sotto) mediante RT-PCR della fosfatasi alcalina(ALP). I primer RT-PCR sono descritti nella Tabella 1.

Tabella 1: Coppie di primer utilizzate per la Real-Time PCR

Gene	Primer forward	Primer reverse	Product size
ALP	5'TAAGGACATCGC CTACCAGC 3'	5'TCTTCCAGGTGTCAAC GAGG 3'	170 bp
PPIA	5'TACGGGTCCTGG CATCTTGT 3'	5'GGTGATCTTCTTGCTG GTCT 3'	196 bp

4.4 ANALISI CITOMETRICA A FLUSSO

L'espressione dei marcatori mesenchimali su cellule isolate è stata analizzata mediante citometria a flusso. Un totale di 2×10^5 BFP- MSC sono state sospese in 200 μ l di PBS per l'analisi. Le cellule sono state incubate con anticorpo anti-CD73 PE-coniugato, anticorpo anti-CD90 FITC-coniugato, anticorpo anti-CD31 APC-coniugato e anticorpo anti-CD45 APC-Cy7-coniugato nonché anticorpi compatibili con colorante/isotipo (tutti da BD Biosciences , USA) in ambiente buio per 30 minuti a 4 C. Successivamente, gli anticorpi non legati sono stati lavati, i campioni sono stati processati da un BD LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA) e analizzati utilizzando BD FACS Diva Software. Le cellule sono state contate e confrontate con i segnali dei corrispondenti controlli dell'isotipo degli anticorpi.

4.5 ANALISI IN REAL TIME-PCR

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule utilizzando la soluzione TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in base alle istruzioni del produttore. Tutti i campioni di RNA sono stati quantificati

misurando l'assorbanza a 260 nm e 280 nm (spettrofotometro di Nanodrop, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA). Per l'analisi Real Time RT-PCR, 1 µg di RNA è stato retrotrascritto usando la trascrittasi inversa SuperScript III (Life Thechnologies, CarlsBad, CA). Le PCR sono state analizzate usando il mix SYBR Green (Bio-Rad, Hercules, CA). Le reazioni sono state eseguite utilizzando Platinum SYBR Green Quantitative PCR Super-UDG utilizzando un sistema di rilevamento PCR in tempo reale multicolor iCycler IQ (Bio-Rad, Hercules, CA). Tutte le reazioni sono state eseguite in doppio e il PPIA è stato utilizzato come controllo interno. Le sequenze di primer di ALP e PPIA sono descritte nella Tabella 1.

4.6 ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test t di Student. Le differenze sono state considerate significative a $p \leq 0,05$. (T test o ANOVA)

CAPITOLO 5 – RISULTATI

5.1 ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE BFP-MSC

Le cellule staminali mesenchimali sono state isolate dalla Bolla di Bichat (BFP-MSC) e hanno formato un monostrato di grandi cellule piatte che mostrano una forma simile al fibroblasto (figura 1A). Dopo la coltura iniziale, le BFP-MSC hanno avuto un periodo di latenza di circa 48 ore; poi, hanno iniziato a crescere e il loro tempo di raddoppiamento è stato di 24 ore in terreno normale con siero, mentre in mezzo privo di siero il loro numero si è ridotto in modo significativo (Fig. 1B).

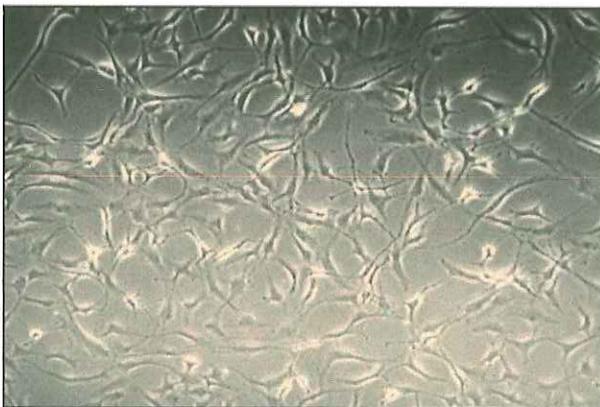


Figura 1.A

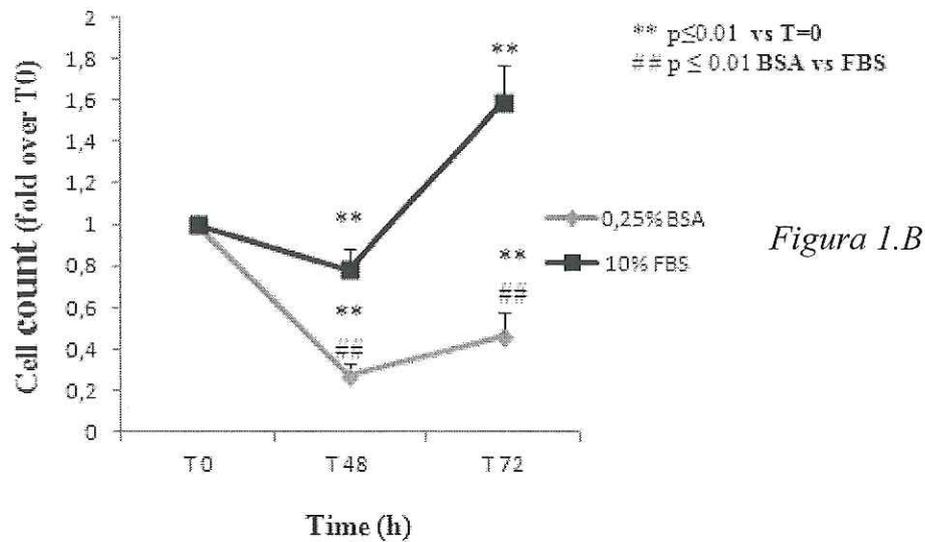


Figura 1. Isolamento e crescita delle MSC dalla bolla di Bichat. A) Immagine rappresentativa delle MSC isolate dalle biopsie della bolla di Bichat. B) Le MSC-BFP sono state incubate con DMEM F12 con FBS al 10% o BSA allo 0,25% per 48 ore e 72 ore. Cellule relative a T0. * indica valori statisticamente significativi su T0 (** $P \leq 0,01$). # indica significatività statistica contro FBS del 10% (## $P \leq 0,01$).

Le BFP-MSCs sono state quindi caratterizzate per l'immunofenotipo e per il potenziale adipogenico e osteogenico. Come mostrato nella figura 2A, le cellule sono state colorate positivamente per gli antigeni di superficie delle cellule progenitrici mesenchimali CD90 e CD73, mentre si sono colorate negativamente per i marker CD45 e CD31, markers ematopoietici ed endoteliali, rispettivamente. In presenza di stimoli adipogenici, le BFP-MSCs sono passate da un aspetto simile ai

fibroblasti a un fenotipo a cellule arrotondate, contenente citoplasma arricchito da vacuoli. La colorazione Oil Red-O indicava la presenza di goccioline lipidiche grandi e chiare che si verificano in cellule differenziate, e che appaiono come adipociti maturi (Figura 2B). Anche la differenziazione osteogenica è stata ottenuta con successo nelle BFP-MSCs quando coltivate in terreno osteogenico. Infatti, le cellule hanno mostrato un accumulo di calcio misurabile, come mostrato dalla colorazione di Alizarin Red-S (Figura 2C).

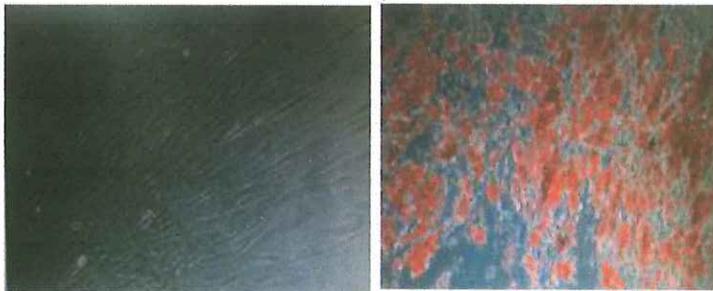


Figura 2.B



Figura 2.C

Figura

2.A

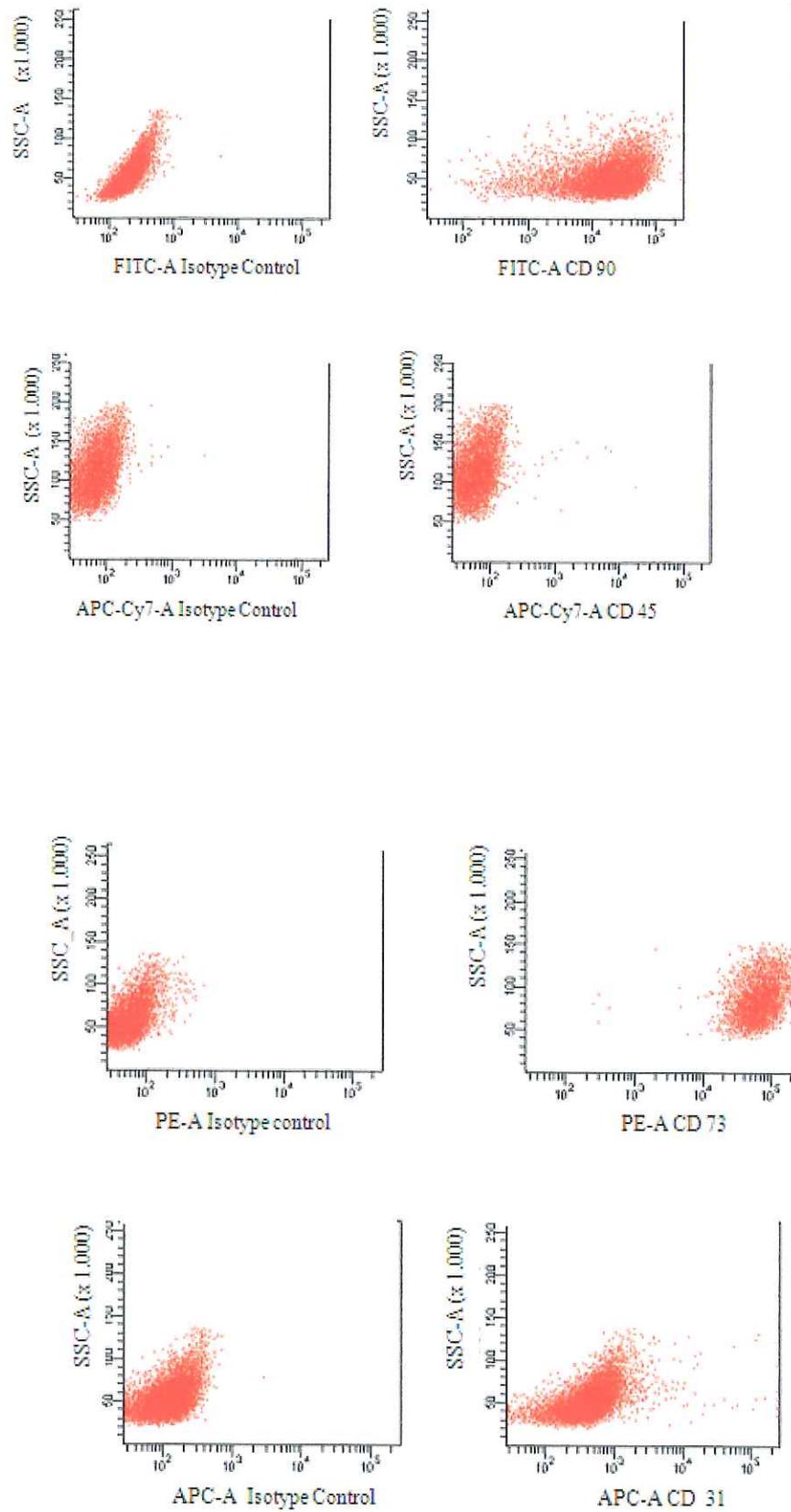


Figura 2. Caratterizzazione di MSC-BFP. A) Analisi FACS rappresentativa delle MSC-BFP con colorazione per antigeni CD 90, CD 73, CD 45 e CD 31. B) L'accumulo di lipidi è stato osservato microscopicamente con la colorazione Oil Red O; C) L'accumulo di calcio è stato osservato con la colorazione ARS al microscopio.

5.2 EFFETTO DEL GLUCOSIO SULLA PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA DELLE BFP-MS C

Successivamente, l'effetto delle alte concentrazioni di glucosio è stato valutato sulla proliferazione e sulla differenziazione osteogenica delle BFP-MS C. A tal fine, le cellule sono state coltivate in glucosio 5,5 mM (basso glucosio, LG), corrispondente a livelli di glucosio a digiuno pressoché normali nell'uomo, o in glucosio 25 mM (glucosio alto, HG), simile all'iperglicemia. La scarsità di siero ha ridotto il numero di cellule sia in LG che in HG (Figura 3A). In presenza di siero, quando le cellule mesenchimali venivano coltivate in LG, il numero di cellule aumentava di 1,5 e 2 volte ,rispettivamente, a 48 ore e a 72 ore. Invece, l'incubazione con HG ha determinato una significativa diminuzione della proliferazione cellulare sia dopo 48 ore

che dopo 72 ore. Pertanto, il numero di BFP-MSK coltivate in LG è stato significativamente più alto rispetto a quelli coltivati in HG, sia a 48 ore che a 72 ore. Per studiare l'effetto del glucosio sulla differenziazione osteogenica, le BFP-MSK sono state trattate con stimoli osteogenici (come descritto in Materiali e metodi), sia in LG che in mezzo HG. I livelli di mRNA di ALP sono stati determinati mediante qRT-PCR al giorno 2 e al giorno 21 dopo l'induzione della differenziazione (Figura 3B). I risultati hanno mostrato che, in LG, i livelli di mRNA di ALP erano già aumentati al giorno 2 e erano ancora più alti al giorno 21; al contrario, in HG, solo al giorno 21 è stato osservato un aumento significativo dei livelli di mRNA di ALP. È interessante notare che, al 21° giorno, nel mezzo HG, i livelli di espressione di ALP erano significativamente inferiori rispetto al terreno LG (Figura 3B).

Figura 3.A

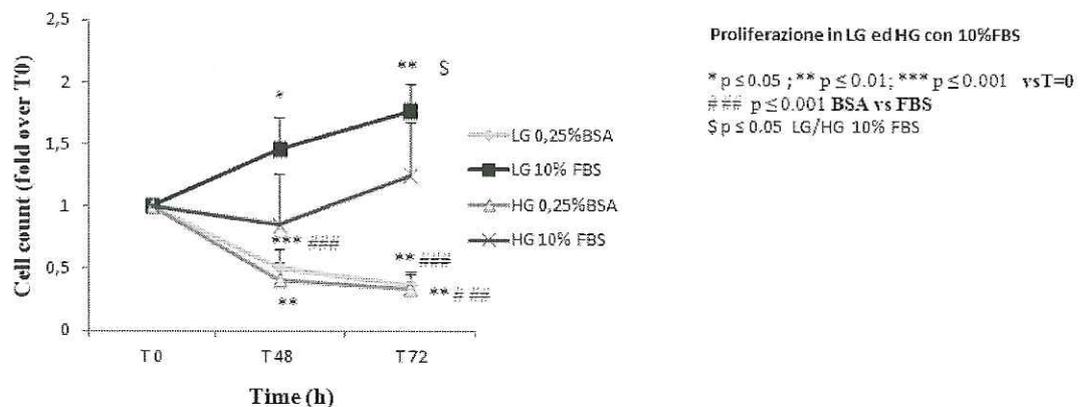


Figura 3.B

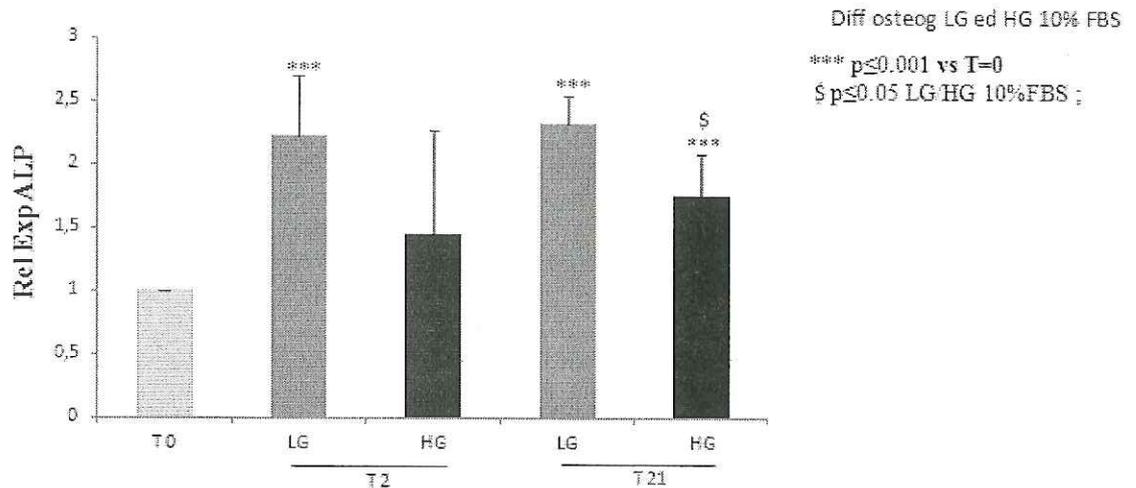


Figura 3. Effetto del glucosio sulla proliferazione e differenziazione delle MSC-BFP. A) Le MSC-BFP sono state incubate con glucosio DMEM 5,5 mM (basso glucosio, LG) e glucosio 25 mM (glucosio alto; HG) integrato con FBS al 10% o BSA allo 0,25% per 48 ore e 72 ore. Quindi, le cellule sono state contate come descritto in “Materiali e metodi” e i risultati sono stati riportati come numero di cellula relativo a T0. * denota significatività statistica su T0 (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$). # denota significatività statistica contro il 10% di FBS (### $P \leq 0.001$). \$ indica significatività statistica rispetto a HG (\$ $P \leq 0,05$); B) Le MSC-BFP sono state differenziate in osteociti come descritto in “Materiali e metodi”. I livelli di mRNA di ALP sono stati determinati mediante analisi RT-PCR sulle preparazioni di RNA. I dati sono stati normalizzati su PPIA come controllo interno. Le barre mostrano i livelli di mRNA relativi al controllo indifferenziato. * indica significativo statistico rispetto indifferenziato (*** $P \leq 0,001$). \$ indica significativo statisticamente rispetto a LG.

5.3 EFFETTO DEL PRP SULLA PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAZIONE DELLE BFP-MSC

È stato precedentemente riportato che il PRP può indurre proliferazione nelle MSC derivate da tessuto adiposo.¹⁰ Abbiamo testato, quindi, l'ipotesi che il PRP possa ripristinare la crescita di BFP-MSC in presenza di un'alta concentrazione di glucosio. Innanzitutto, l'effetto del PRP sulla proliferazione cellulare e sulla differenziazione osteogenica è stato caratterizzato in DMEM-F12, che rappresenta il mezzo di crescita standard per queste cellule. In assenza di siero bovino, il 10% PRP (volume/volume in DMEM-F12) ha aumentato il numero di cellule di 1,5 e 4 volte rispettivamente a 48 ore e 72 ore (Figura 4A). Il PRP ha ulteriormente aumentato la proliferazione anche quando aggiunto a cellule coltivate in terreno contenente il 10% di siero (dati non mostrati). Nelle stesse condizioni, come indicato dalla determinazione dei livelli di mRNA di ALP, il trattamento con PRP non ha alterato la differenziazione osteogenica (Fig. 4B).

Figura 4.A

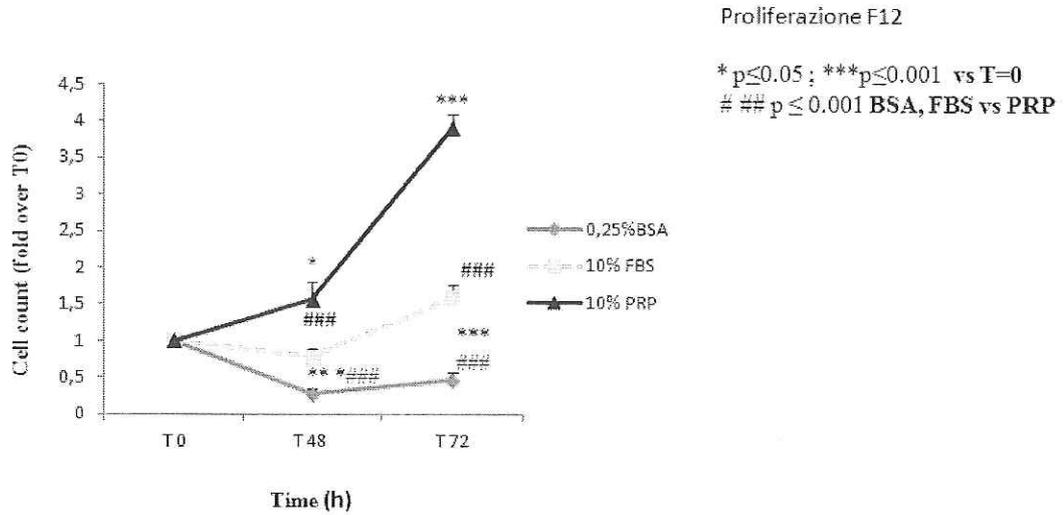


Figura 4.B

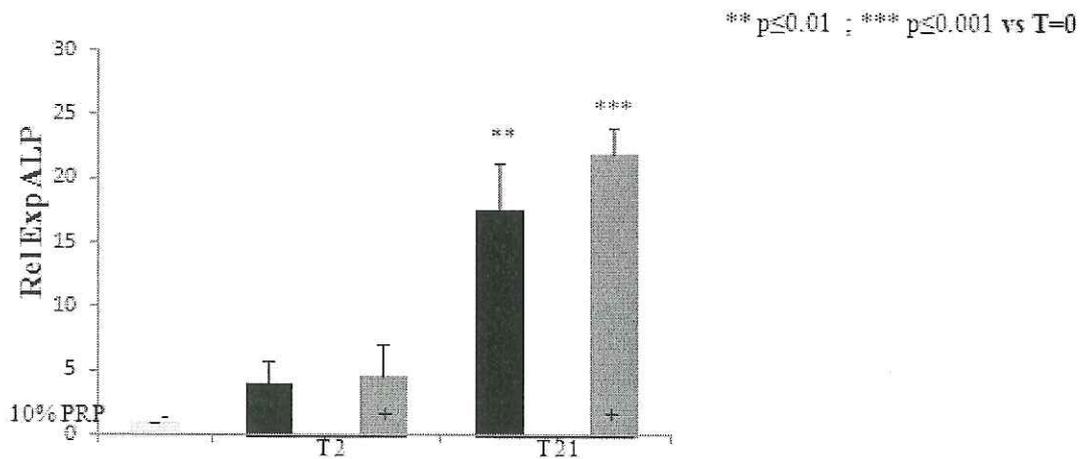


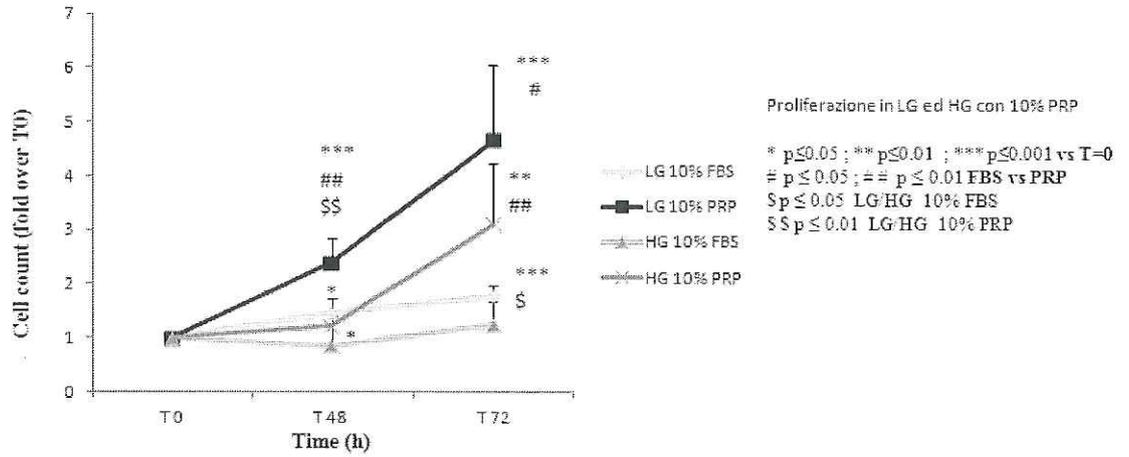
Figura 4. Effetto del PRP sulla proliferazione e differenziazione delle MSC-BFP.

A) Le MSC-BFP sono state seminate in piastre di coltura da 12 pozzetti (1×10^4 cellule). Il giorno seguente le cellule sono state lasciate a digiuno per 9 ore e poi incubate con gel PRP (10% vol /vol in DMEM F12 1: 1) per 48 ore e 72 ore senza aggiunta di siero (MEDIO BSA). Come controllo, le MSC-BFP sono state

*incubate con DMEM F12 (1: 1) senza aggiunta di siero. Quindi, le cellule sono state contate come descritto in “Materiali e metodi” e i risultati sono stati riportati come numero di cellula relativo a T0. * denota significatività statistica su T0 (* $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$). # denota significatività statistica contro il 10% PRP (### $P \leq 0.001$); B) Le MSC-BFP sono state differenziate in osteociti come descritto in “Materiali e metodi”, i livelli di mRNA di ALP sono stati determinati mediante analisi RT-PCR su preparati di RNA. I dati sono stati normalizzati su PPIA come controllo interno. Le barre mostrano i livelli di mRNA relativi al controllo indifferenziato. * indica valori statisticamente significativi su T0 (** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).*

Successivamente abbiamo valutato l'effetto del PRP sulla crescita cellulare e sulla differenziazione osteogenica in presenza di terreno LG e HG. In LG, il PRP ha aumentato il numero di cellule di 2,5 e 4,5 volte, dopo 48 ore e 72 ore, rispettivamente. È interessante notare che in HG, mentre il 10% di siero non ha quasi avuto alcun effetto, il 10% PRP ha aumentato la proliferazione cellulare di 2,5 volte a 72 ore (Figura 5A).

Figura 5.A



Inoltre, nel mezzo LG, i livelli di mRNA di ALP sono aumentati in modo simile sia in presenza che in assenza di PRP. Invece, nel mezzo HG, il PRP ha indotto un aumento significativo dei livelli di mRNA di ALP rispetto al controllo. In particolare, in presenza di PRP, non c'era più differenza statisticamente significativa nei livelli di mRNA ALP tra le cellule in LG e HG, suggerendo che, almeno in HG, il PRP potenzia la capacità di differenziazione delle BFP-MSc.

Figura 5.B

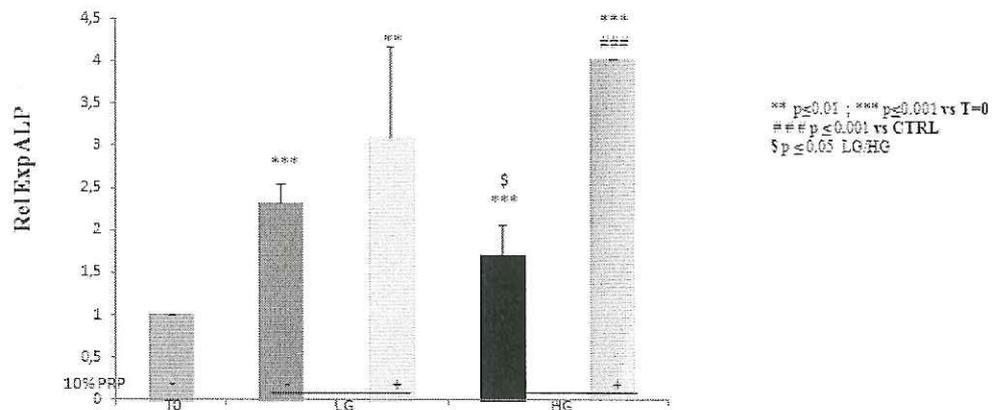


Figura 5. Effetto del PRP sulla proliferazione e differenziazione delle MSC-BFP nei terreni LG e HG. A) Le MSC-BFP sono state seminate in piastre di coltura da 12 pozzetti (1×10^4 cellule) e il giorno successivo incubate con gel PRP (10% vol/vol in DMEM LG e HG senza l'aggiunta di siero e DMEM LG e HG con siero) per 48 h e 72 h. Quindi, le cellule sono state contate come descritto in "Materiali e metodi" e i risultati sono stati riportati come numero di cellule relativo a T0 (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). # denota significatività statistica contro il 10% PRP (# $P \leq 0.05$; ## $P \leq 0.01$); \$ indica significatività statistica rispetto a LG (\$ $P \leq 0.05$; \$\$ $P \leq 0.01$); B) Le MSC-BFP sono state differenziate in osteociti, in presenza o in assenza di gel PRP (10% vol/vol in DMEM LG e HG) I livelli di mRNA ALP sono stati determinati al 21 ° giorno mediante analisi RT-PCR su preparazioni di RNA. I dati sono stati normalizzati su PPIA come controllo interno. Le barre mostrano i livelli di mRNA relativi al controllo indifferenziato. * indica valori statisticamente significativi su T0 (** $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$). # denota significatività statistica rispetto al controllo differenziato (### $P \leq 0.001$). \$ indica significatività statistica rispetto a LG (\$ $P \leq 0.05$).

CAPITOLO 6 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'uso delle MSC in medicina rigenerativa ha molte promesse. In effetti, le MSC possono essere manipolate per ottenere tessuti maturi e facilitare la corretta riabilitazione degli organi. La loro potenziale plasticità rappresenta anche un vantaggio per la ricostruzione dei tessuti danneggiati. Tuttavia, la disponibilità di MSC potrebbe essere un passo limitante, a causa della difficile accessibilità alle fonti principali. Come già suggerito da altri lavori^{10,65,71}, qui mostriamo che la BFP contiene MSC che possono essere isolate e coltivate per diversi passaggi. Queste mostrano tutti i principali marcatori di MSC che possono essere trovati nel midollo osseo e nel tessuto adiposo sottocutaneo. Quindi, hanno una buona capacità di differenziare verso la linea adipogenica, e osteogenica, fornendo una forte motivazione per il loro uso nella chirurgia maxillo-facciale. Infatti, sono state adottate sia per la guarigione delle ulcere orali che per le procedure di ricostruzione ossea⁷². Inoltre, sia il prelievo che l'applicazione del BFP nelle cavità alveolari o sui tessuti molli buccali si sono dimostrati sicuri e senza alcun rischio per il paziente⁷³. Tuttavia, si dovrebbe tenere conto del fatto che condizioni patologiche concomitanti

possono compromettere la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti.⁷⁴ Ciò si verifica, almeno in parte, influenzando la crescita delle MSC e il loro potenziale di differenziazione.⁷⁵ A questo proposito, il diabete mellito può influenzare la funzione delle cellule mesenchimali a diversi livelli. Innanzitutto, la compromissione dei progenitori adipogenici può avere un ruolo causale nella progressione verso il disordine del metabolismo del glucosio.⁷⁵ Infatti, la ridotta capacità del tessuto adiposo di reclutare più pre-adipociti può portare a un sovraccarico lipidico degli adipociti maturi esistenti, che a loro volta potrebbero esacerbare la resistenza all'insulina e mobilizzare i lipidi di altri organi, inclusi fegato e muscoli, contribuendo così al peggioramento della malattia e l'insorgenza di complicanze. In secondo luogo, le MSC compromesse funzionalmente possono essere terapeuticamente inefficaci. Ad esempio, le ferite non cicatrizzanti sono caratteristiche comuni del diabete e uno scarso controllo metabolico (accompagnato da livelli più elevati di glucosio nel sangue) altera ulteriormente la chiusura delle ferite, almeno in parte, influenzando le MSC.⁷⁵ Esistono prove sostanziali che, oltre alle ben note complicazioni del diabete, l'aumento del rischio di fratture è una morbilità importante.⁷⁶ Questo rischio è probabilmente dovuto al rimodellamento osseo alterato e ad un alterata funzione delle cellule

ossee nel diabete.⁷⁷ Inoltre, la terapia implantare dentale in pazienti con diabete è ancora considerata una controindicazione relativa. Tuttavia, se i livelli plasmatici di glucosio sono normali o vicini alla norma, il tasso di fallimento dell'impianto osservato nei pazienti diabetici tende ad essere più vicino a quello osservato nei soggetti non diabetici⁵. Qui, mostriamo per la prima volta che l'esposizione di BFP- MSC a concentrazioni elevate di glucosio, paragonabili ai livelli di glucosio rilevabili nell'iperglicemia, compromettono la crescita cellulare e il potenziale di differenziazione osteogenica. Questa osservazione suggerisce che il glucosio eccessivo può essere dannoso per la formazione dell'osso, anche quando le MSC vengono utilizzate per le procedure di ricostruzione. Pertanto, negli individui diabetici, un controllo glicemico stretto è certamente necessario per l'omeostasi ossea e per un migliore risultato della rigenerazione. Tra le strategie per migliorare la rigenerazione dei tessuti e la formazione ossea, l'uso di prodotti derivati dalle piastrine gioca un ruolo importante. Questi hanno trovato applicazioni in diversi campi della medicina rigenerativa, dalla chirurgia ricostruttiva a quella estetica, dall'ortopedia all'oftalmologia.⁷⁷ Il principio di base è il rilascio di fattori di crescita e citochine da piastrine attivate, che possono aiutare a accelerare localmente la guarigione delle ferite e la riparazione dei

tessuti.⁷⁸ Diverse procedure sono state implementate per ottenere fattori piastrinici, con o senza fattori aggiuntivi rilasciati dai leucociti.⁶⁶ La produzione di fattori specifici può variare a seconda della procedura e può esercitare effetti specifici in singoli tipi di cellule.⁶⁶ A livello cellulare, abbiamo precedentemente dimostrato che il PRP migliora la proliferazione e la motilità delle MSC ottenute dal tessuto adiposo sottocutaneo.¹² Ora forniamo prove che il PRP può anche promuovere la sopravvivenza e la crescita delle BFP-MS, senza interferire con la differenziazione osteogenica. È interessante notare, tuttavia, che l'effetto del PRP sulle BFP-MS è risultato rilevabile anche in presenza di elevate concentrazioni di glucosio. Questa scoperta implica che, anche in un "ambiente diabetico", il PRP potrebbe essere uno strumento utile per arricchire la quantità di MSC disponibili ai fini della rigenerazione dei tessuti.

BIBLIOGRAFIA

1. Morris, H.F., Ochi, S., & Winkler, S. (2000) Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months. *Ann Periodontol.* Dec;5(1):157-65.
2. Schwartz-Arad, D., Levin, L., & Sigal, L. (2005) Surgical success of intraoral autogenous block onlay bone grafting for alveolar ridge augmentation. *Implant Dent.* Jun;14(2):131-8.
3. Retzeppi, M., Calciolari, E., Wall, I., Lewis, MP., & Donos, N. (2018) The effect of experimental diabetes and glycaemic control on guided bone regeneration: histology and gene expression analyses. *Clin Oral Implants Res.* Feb;29(2):139-154
4. Stewart, JE., Wager, KA., Friedlander, AH., & Zadeh, HH. (2001) The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J ClinPeriodontol.* Apr;28(4):306-10.
5. Ladha, K., Sharma, A., Tiwari, B., & Bukya, DN. (2017) Bone augmentation as an adjunct to dental implant rehabilitation in patients with diabetes mellitus: A review of literature. *Natl J Maxillofac Surg.* Jul-Dec;8(2):95-101.

6. Caplan, AI. (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* Nov;213(2):341-7.
7. Orbay, H., Tobita, M., & Mizuno, H. (2012) Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int.*;2012:461718.
8. Baer, PC., & Geiger, H. (2012) Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.*;2012:812693.
9. Yousuf, S., Tubbs, RS., Wartmann, CT., Kapos, T., Cohen-Gadol, AA., & Loukas, M. (2010) A review of the gross anatomy, functions, pathology, and clinical uses of the Bichat fat pad. *SurgRadiol Anat.* Jun;32(5):427-36.
10. Broccaioli, E., Niada, S., Rasperini, G., Ferreira, LM., Arrigoni, E., Yenagi, V., & Brini, AT. (2013) Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: In Vitro Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *Biores Open Access.* Apr;2(2):107-17.
11. Burnouf, T., Goubran, HA., Chen, TM., Ou, KL., El-Ekiaby, M., & Radosevic, M. (2013) Blood-derived biomaterials and

- platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* Mar;27(2):77-89.
12. D' Esposito, V., Passaretti, F., Perruolo, G., Ambrosio, MR., Valentino, R., Oriente, F., Raciti, .GA., Nigro, C., Miele, C., Sammartino G, Beguinot F., & Formisano P. (2015) Platelet-Rich Plasma Increases Growth and Motility of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Controls Adipocyte Secretory Function. *J Cell Biochem.* Oct;116(10):2408-18.
 13. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. 49 Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-67.
 14. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Leukocyte- and platelet-rich Plasma (L-PRP)/fibrin (L-PRF) in medicine - past, present, future. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):i-ii.
 15. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1121-30.
 16. Borzini P, Balbo V, Mazzucco L. Platelet concentrates for topical use: bedside device and blood transfusion technology.

Quality and versatility. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1138-44.

17. Mishra A, Collado H, Fredericson M. Platelet-rich plasma compared with corticosteroid injection for chronic lateral elbow tendinosis. *Pm R.* 2009;1(4):366-70.
18. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006;34(11):1774- 8. 50
19. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638-46.
20. Alio JL, Arnalich-Montiel F, Rodriguez AE. The role of "eye platelet rich plasma" (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1257-65.
21. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(1):229-37;discussion 38-9.
22. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-

- generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e37-44.
23. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, Rasmusson L, Evert PA. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), 51 fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1131-7
24. Matras H. [Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]. *Osterr Z Stomatol.* 1970;67(9):338- 59.
25. Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion.* 1990;30(8):741-7.
26. Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR, Rubenstein E. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Invest Ophthalmol.* 1975;14(11):872-5.
27. Rosenthal AR, Egbert PR, Harbury C, Hopkins JL, Rubenstein E. Use of platelet-fibrinogen-thrombin mixture to seal

- experimental penetrating corneal wounds. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol. 1978;207(2):111-5.
28. Pearl RM, Wustrack KO, Harbury C, Rubenstein E, Kaplan EN. Microvascular anastomosis using a blood product sealant-adhesive. Surg Gynecol Obstet. 1977;144(2):227-31.
29. Silverberg GD, Harbury CB, Rubenstein E. A physiological sealant for cerebrospinal fluid leaks. J Neurosurg. 1977;46(2):215-9.
30. Fischer H. [A method of suture-free anastomosis of nerve transplantation is being reported, using facial nerve as the example (author's transl)]. Laryngol Rhinol Otol (Stuttg). 1979;58(2):154-6.
31. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). Ann Surg. 1986;204(3):322-30.
32. Knighton DR, Doucette M, Fiegel VD, Ciresi K, Butler E, Austin L. The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. Prog Clin Biol Res. 1988;266:319-29.
33. Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous

- ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet.* 1990;170(1):56-60.
34. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(11):1294-9.
35. Kingsley CS. Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature.* 1954;173(4407):723-4.
36. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1207-30.
37. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1231-56.

38. Weibrich G, Kleis WK. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(4):437-43.
39. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRP™ system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(2):233-9.
40. Tamimi FM, Montalvo S, Tresguerres I, Blanco Jerez L. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(6):1084-93.
41. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Vox Sang.* 2008;94(3):202-8.
42. Christensen K, Vang S, Brady C, Isler J, Allen K, Anderson J, Holt D. Autologous platelet gel: an in vitro analysis of platelet-rich plasma using multiple cycles. *J Extra Corpor Technol.* 2006;38(3):249-53.
43. Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, Kormoczi GF, Buchta C. Platelet content and growth

factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.*2006;91(2):135-9.

44. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sang.* 2009;97(2):110-8.
45. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(2):184-90.
46. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg.* 2002;30(2):97-102.
47. Weibrich G, Kleis WK, Kunz-Kostomanolakis M, Loos AH, Wagner W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16(5):693-9
48. V.kumar, A.K. Abbas, N.Fausto, J.C. Aster. *Le basi patologiche delle malattie, vol. II.*

49. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103: 137-49.
50. Pinhas-Hamiel O, Zeitler P: Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Lancet* 369:1823,2007.
51. Frayling TM: Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat Rev Genet* 8:657,2007
52. Zeggini E, et al.: Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2008
53. Muoio DM, Newgard CB: Mechanism of disease: molecular and metabolic mechanism of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:193,2008
54. Kasuga M: Insulin resistance and pancreatic β -cell failure. *J Clin Invest* 116:1756,2006
55. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, et al.: Mechanism by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes, *J Clin Invest* 117:2155,2007

56. Loukas M, Kapos T, Louis RG, Wartman C, Jones A, Hallner B. Gross anatomical, CT and MRI analyses of the buccal fat pad with special emphasis on volumetric variations, *Surg Radiol Anat* (2006) 28:254-260
57. Zhang HM, Yan YP, Wang JQ, Liu ZF. Anatomical structure of the buccal fat pad and its clinical adaptations, *Plast Reconstr Surg*. 2002 Jun;109(7):2509-18; discussion 2519-20.
58. Stuzin JM, Wagstrom L, Kawamoto HK, Baker TJ, Wolfe SA. The anatomy and clinical applications of the buccal fat pad. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Jan;85(1):29-37.
59. Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL (1983) growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev* 8:1-11.
60. Bagdade JD, Hirsch J (1966) gestational and dietary influences on the lipid content of infant buccal fat pad. *Proc Soc Exp Biol Med* 122:616-619.
61. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):132-41

62. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28.
63. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101-9.
64. Kakudo N, Shimotsuma A, Miyake S, Kushida S, Kusumoto K. Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Jan;84(1):191-7.
65. Niada S, Ferreira LM, Arrigoni E, Addis A, Campagnol M, Broccaioli E, Brini AT. Porcine adipose-derived stem cells from buccal fat pad and subcutaneous adipose tissue for future preclinical studies in oral surgery. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(6):148.
66. Passaretti, F., Tia, M., D'Esposito, V., De Pascale, M., Del Corso, M., Sepulveres, R., Liguoro, D., Valentino, R., Beguinot,

- F., Formisano, P., & Sammartino G., (2014) Growth-promoting action and growthfactor release by different platelet derivatives.*Platelets*.;25(4):252-6.
67. Giacco, F., Perruolo, G., D'Agostino, E., Fratellanza, G., Perna, E., Misso, S., Saldalamacchia, G., Oriente, F., Fiory, F., Miele, C., Formisano, S., & Beguinot, F., Formisano, P. (2006) Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor -. *FASEB J* 20:2402–2404
68. D' Esposito, V., Passaretti, F., Hammarstedt, A., Liguoro, D., Terracciano, D., Molea, G., Canta, L., Miele, C., Smith, U., Beguinot, F., & Formisano, P. (2012) Adipocyte-released insulin-like growth factor-1 is regulated by glucose and fatty acids and controls breast cancer cell growth in vitro. *Diabetologia*55:2811–2822
69. Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B., & Smith, U. (2009) Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. *Diabetes*. ;58:1550–1557.
70. Yang ,H., Hong , N., Liu, H., Wang, J., Li, Y., & Wu, S. (2018) Differentiated adipose

derived stem cell cocultures for bone regeneration in RADA16-I in vitro. *J Cell Physiol.* Jul 11.

71. Kishimoto, N., Honda, Y., Momota, Y., & Tran SD. Dedifferentiated Fat (DFAT) cells: A cell source for oral and maxillofacial tissue engineering. *Oral Dis.* 2018 Jan 21.

72. Ardeshirylajimi, A., Mossahebi-Mohammadi, M., Vakilian, S., Langroudi, L., Seyedjafari, E., Atashi, A., & Soleimani M. Comparison of osteogenic differentiation potential of human adult stem cells loaded on bioceramic-coated electrospun poly (L-lactide) nanofibres. *Cell Prolif.* 2015 Feb;48(1):47-58.

73. Lee, DY., Kim, H.B., Shim, I.K., Kanai, N., Okano, T., & Kwon, S.K. Treatment of chemically induced oral ulcer using adipose-derived mesenchymal stem cell sheet. *J Oral Pathol Med.* 2017 Aug;46(7):520-527.

74. Hassan, WU., Greiser, U., & Wang, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014 May-Jun;22(3):313-25.

75. Van de Vyver, M. (2017) Intrinsic Mesenchymal Stem Cell Dysfunction in Diabetes mellitus. *Stem Cells Dev.* Jul 15;26(14):1042-1053.
76. Rubin, MR. Bone cells and bone turnover in diabetes mellitus. *Curr Osteoporos Rep.* 2015 Jun;13(3):186-91.
77. Mulder, GD., Lee, DK., & Jeppesen NS. Comprehensive review of the clinical application of autologous mesenchymal stem cells in the treatment of chronic wounds and diabetic bone healing. *Int Wound J.* 2012 Dec;9(6):595-600.
78. Didangelos, T., Koliakos, G., Kouzi, K., Arsos, G., Kotzampassi, K., Tziomalos, K., Karamanos, D., & Hatzitolios AI. Accelerated healing of a diabetic foot ulcer using autologous stromal vascular fraction suspended in platelet-rich plasma. *Regen. Med.* 2018 Apr;13(3):277-281.