

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

TISSUE ENGINEERING AND MESENCHIMAL STEM CELLS: EXPERIMENTAL PROTOCOL OF PERIODONTAL REGENERATION. PART 2

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

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

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

PAROLE CHIAVE

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

RIASSUNTO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

KEY WORDS

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

MATERIALI E METODI

Considerando i limiti delle attuali tecniche chirurgiche di rigenerazione parodontale ed i risultati degli studi in vitro sulla rigenerazione tissutale mediante MSCs condotti nei nostri laboratori, è stato definito un protocollo di rigenerazione parodontale mediante cellule staminali adulte di tipo mesenchimale e sono state sviluppate tecniche di ingegneria tissutale oggetto di brevetto internazionale.

Il lavoro di ricerca ha previsto una fase di sperimentazione in vitro con MSCs (estrazione, isolamento e differenziamento in senso osteogenico) e successivamente la formulazione del Protocollo Clinico Sperimentale.

Realizzazione del Laboratorio GMP di terapia cellulare e genica

Negli ultimi 10-15 anni sono emerse una serie di innovative terapie cellulari, tra le quali manipolazione genica, immunoterapia, terapia con cellule staminali per la cura di malattie metaboliche, autoimmuni, neurologiche, cardiovascolari, ortopediche, oculistiche, odontostomatologiche. Le cellule ed i tessuti utilizzati in tali approcci terapeutici necessitano di processi di preparazione complessi, talora richiedenti procedure di isolamento di specifici subset cellulari rari, fasi prolungate di espansione in vitro, manipolazione genica, stimolazione in vitro con particolari molecole a fini maturativi e/o attivatori. Il tutto si è accompagnato ad una diversa definizione culturale delle cosiddette "cell factories", che oggi non sono più considerate laboratori di semplice processazione cellulare, bensì veri e propri centri di ingegneria cellulare e genica. Tale complessità produttiva si è inevitabilmente accompagnata ad un incremento dei rischi relativi.

La direttiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo (attuato in Italia con Decreto Legislativo 24 giugno 2003, n. 211), relativa all'implementazione delle buone pratiche di produ-

zione (GCP) all'interno dei protocolli clinici su medicinali per uso umano, stabilisce, come previsto dall'articolo 9 comma 6, che i prodotti utilizzati per la terapia genica e per la terapia cellulare basati su cellule umane e xenogeneiche devono essere considerati come farmaci e conseguentemente devono essere prodotti secondo quelle che vengono chiamate le buone pratiche di produzione (Good Manufacturing Practice, GMP).

Le regole GMP sono essenzialmente mirate a prevenire la contaminazione dei prodotti cellulari con microrganismi infettivi e a garantire che, a manipolazione avvenuta, le cellule mantengano la loro integrità e funzionalità. Tali regole coprono le modalità di preparazione cellulare, le caratteristiche dei laboratori di produzione, le modalità di screening ed i test effettuati sui donatori, le modalità di raccolta, selezione, analisi, manipolazione, conservazione, labeling e distribuzione dei prodotti cellulari. Una documentazione completa ed estensiva deve essere fornita per tutti i processi ed i controlli effettuati. Alcuni aspetti delle regole GMP sono particolarmente vincolanti:

- ▶ un sistema di tracciabilità del prodotto;
- ▶ reagenti, materiali e strumenti: le regole GMP impongono che tutto ciò che entra nella fase produttiva abbia un proprio certificato di qualità e sia sottoposto ad un sistema di tracking che ne verifichi continuamente le caratteristiche e la scadenza.
- ▶ la struttura di laboratorio: la maggior parte dei processi produttivi GMP richiede ambienti di classe B (con l'eccezione delle cappe sterili, che sono di classe A), sottoposti quindi ad un continuo filtraggio e ricircolo d'aria tramite filtri HEPA; gli ambienti devono essere sottoposti ad un continuo monitoraggio particellare dell'aria e microbiologico di aria e superfici;
- ▶ il personale: tutto il personale GMP deve possedere un adeguato curriculum ed essere sot-

toposto ad un preciso training per essere infine autorizzato ad operare nel laboratorio GMP; tutti gli operatori devono operare nel rispetto di Procedure Operative Standard (POS) che descrivano nei dettagli ogni singola attività svolta nei processi di manipolazione e cultura cellulare, così come l'uso e la manutenzione di ogni apparecchiatura, la gestione del laboratorio, le regole di accettazione o di respingimento della materia prima da manipolare o il rilascio del lotto;

- ▶ il test di rilascio dei prodotti cellulari: ogni prodotto cellulare che esca da un laboratorio GMP deve essere sottoposto ad una batteria di test che ne assicuri la sicurezza, la purezza, l'identità, la funzionalità e la stabilità; test microbiologici obbligatori sono quelli batteriologici e fungini, il test per il micoplasma e l'endotossina batterica; i test di purezza ed identità comprendono la valutazione della vitalità, delle caratteristiche fenotipiche (immunofenotipo e morfologia, cariotipo qualora necessario);
- ▶ questi requisiti obbligati culminano in un dossier da sottoporre all'approvazione ministeriale, in cui deve essere esplicitata la terapia proposta (razionale scientifico e vantaggi terapeutici), la descrizione della qualità d'ogni step del processo produttivo, la documentazione sull'inattivazione virale, sulla farmacologia, sulla tossicologia e la mutagenesi del prodotto proposto, e la formulazione analitica della proposta clinica.

Sperimentazione in vitro con MSCs: estrazione, isolamento e differenziamento in senso osteogenico

Presso il Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca e la Clinica Odontoiatrica dell'Ospedale San Gerardo di Mon-

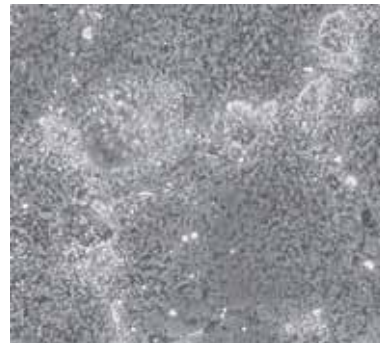
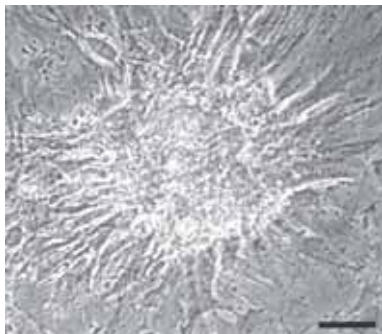
za, sono stati condotti degli studi sperimentali su modello animale con MSC per ottenere la rigenerazione di tessuto osseo in vitro, utilizzando uno scaffold di collagene (Gingistat) (figg 1A, 2A e 3A). I risultati di questo studio hanno confermato le ampie capacità proliferative e differenziative delle MSCs in senso osteogenico, nonostante il rapido tempo di degradazione del supporto in collagene (4-5 settimane) (94, 95).

Tali studi sperimentali hanno indirizzato l'attività di ricerca verso il possibile utilizzo di MSCs umane autologhe cresciute su scaffold in collagene Gingistat nella rigenerazione del tessuto osseo orale.

Sono state quindi effettuate quattro simulazioni su larga scala in ambiente GMP partendo dal midollo osseo di quattro donatori (96) (figg. 1B, 2B e 3B).

Le MSCs sono state isolate dal midollo osseo ed espanse fino al passaggio 3 per ottenere un numero adeguato di cellule per un eventuale uso clinico. Nel periodo di coltura è stata quantificata la crescita delle cellule, la vitalità e, ad ogni passaggio, sono stati effettuati test microbiologici specifici (risultati sempre negativi). Le MSC sono state caratterizzate per l'alta espressione degli antigeni di membrana CD90, CD105 e HLA-ABC ($\geq 70\%$) e

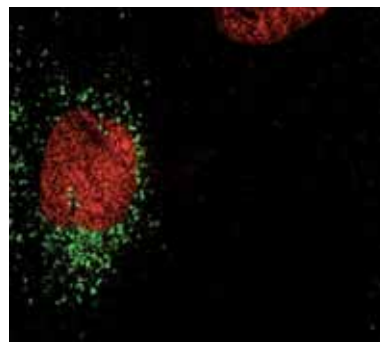
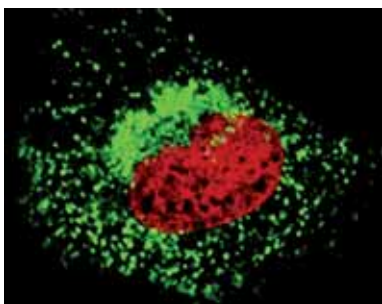
dalla bassa espressione degli antigeni CD33, CD34 e HLA-DR ($\leq 5\%$). È stato ottenuto il differenziamento osteogenico delle MSC sia su dishes che su scaffold Gingistat, trattando le cellule con mezzo di coltura addizionato da agenti differenzianti clinical-grade (desametasone, vitamina C e sodio glicerofosfato). I risultati di tali validazioni hanno confermato il comportamento delle cellule mesenchimali, che hanno aderito e si sono distribuite in maniera omogenea tra le maglie dello scaffold in collagene, depositando matrice mineralizzata solo se incubate con il mezzo osteogenico (95, 96).



Figg. 1A e 1B: morfologia di cellule rMSCs e hMSCs trattate con OS medium. Le rMSCs sono state trattate per 7 giorni con terreno con OS medium (A); le cellule hMSCs sono state trattate per 28 giorni con OS medium (B). Le immagini (fotografate al microscopio ottico a contrasto di fase) mostrano le fasi iniziali del differenziamento osteogenico (Barra=50 μ m).



Figg. 2A e 2B: colorazione con alizarin red S. Le rMSCs sono state coltivate per 28 giorni con OS medium (A); le hMSCs sono state coltivate per 35 giorni con OS medium (B). Le cellule sono state colorate con alizarin red S. La deposizione di matrice ossea è risultata più precoce nelle rMSCs rispetto alle hMSCs.



Figg. 3A e 3B: immunofluorescenza per osteopontina. Le rMSCs sono state trattate per 14 giorni con OS medium (A). Le hMSCs sono state trattate per 28 giorni con OS medium (B). È stata condotta una immunolocalizzazione dell'osteopontina mediante immunofluorescenza (verde). I nuclei sono stati colorati con ioduro di propidio (rosso).

FORMULAZIONE DEL PROTOCOLLO CLINICO

Il prodotto sperimentale che è stato proposto all'Istituto Superiore di Sanità consisteva nel differenziamento in senso osteoblastico di cellule mesenchimali autologhe (isolate ed espanse da prelievo di midollo osseo) e successiva deposizione su scaffold biodegradabile in collagene.

Al fine di ottenere l'autorizzazione all'utilizzo sull'uomo, è stato necessario codificare le procedure in un dossier dettagliato che è stato poi valutato dall'Istituto Superiore di Sanità per quanto riguarda la conformità ai principi delle pratiche GMP e dell'etica per la ricerca medica che coinvolge soggetti umani, presenti nella Dichiarazione di Helsinki adottata dalla 18^a Assemblea Generale dall'AMM a Helsinki, Finlandia, nel giugno 1964 ed emendata dalla 29^a Assemblea Generale a Tokyo, Giappone, nell'ottobre 1975, dalla 35^a Assemblea Generale a Venezia, Italia, nell'ottobre 1983, dalla 41^a Assemblea Generale a Hong Kong, nel settembre 1989, dalla 48^a Assemblea Generale a Somerset West, Repubblica del Sud Africa, nell'ottobre 1996 e dalla 52^a Assemblea Generale a Edimburgo, Scozia, nell'ottobre 2000. L'intera fase di produzione ed uso clinico consiste nelle seguenti fasi operative.

Selezione dei pazienti

- Criteri di inclusione:
 - malattia parodontale severa;
 - nessun trattamento parodontale disponibile per severità della malattia;
 - prova radiografica di riassorbimento verticale dell'osso inferiore a 8 mm;
 - almeno un sito parodontale per quadrante avente Indice Gingivale (GI)≥2;
 - profondità di tasca parodontale (PPD) inferiore a 8 mm;
 - età compresa tra i 30 e 50 anni;
 - disponibilità a terminare lo studio;

- accettazione del consenso informato;
- Criteri di esclusione:
 - gravidanza, insufficienza renale acuta, mieloma multiplo, artrite e collagenopatie, fibrosi polmonare, enfisema, tumori, osteoporosi, intervento chirurgico recente (1 mese), malattie infiammatorie croniche, condizione infettiva recente, disordini neurologici e/o disautonomici conosciuti, tiroide, ematopatie, depressione o disturbi dell'alimentazione;
 - elementi con difetti circolatori e/o i denti con lesione periapicale;
 - stato allergico conosciuto ai prodotti in studio;
 - pazienti dopo trattamento antitumorale o con malattie severe a carico della struttura ossea;
 - condizione o storia medica che impone profilassi antibiotica prima del trattamento dentale, (e.g., febbre reumatica, malattie reumatiche del cuore, prolasso della valvola mitrale, disfunzione valvolare, ipertrofia cardiaca, endocardite batterica, difetto congenito del cuore, valvola cardiaca o altri manufatti protesici in altri distretti anatomici [anca], eccetera);
 - abuso di alcool o/e droghe;
 - severo bruxismo;

Prelievo di midollo osseo

10-15 mL di midollo osseo verranno prelevati dalla cresta iliaca posteriore del paziente e trasportati nel laboratorio di terapia cellulare e genica.

Isolamento, espansione e differenziamento su scaffold delle MSCs

Le MSC verranno isolate ed espanse nel laboratorio di terapia cellulare e genica. Le cellule verranno mantenute in coltura fino al raggiungimento di un numero adeguato in base all'entità del difetto osseo di ciascun singolo paziente. Un'aliquota cellulare verrà utilizzata per

la caratterizzazione fenotipica, mentre un'aliquota di surnatante verrà riservata per i test microbiologici (endotossina, micoplasma, batteri aerobi e anaerobi).

Le cellule verranno deposte su scaffold Gingistat alla concentrazione di 1x10⁶ MSC/125mm³ scaffold e, dopo tre giorni, indotte al differenziamento in senso osteogenico mediante mezzo osteogenico clinical-grade, consistente di DMEM GMP-grade, 10% FBS Hyclone, antibiotici GMP-grade, L-glutamina GMP-grade con l'aggiunta dei fattori differenzianti 100 nM desametasone, 0,05 mM vitamina C e 10 mM sodio glicerofosfato (Farve).

In parallelo agli scaffold, un'aliquota cellulare di controllo verrà piastata anche su dishes e indotta a differenziamento con mezzo osteogenico clinical-grade al fine di eseguire le opportune valutazioni di differenziamento osteoblastico. A partire dal 21esimo giorno, e non oltre il 42esimo giorno, con scadenza settimanale, verrà effettuata la colorazione Alizarin Red sulle dishes di controllo per osservare l'inizio del processo di mineralizzazione che coincide con l'iniziale positività di comparsa del colorante Alizarin Red. Nel giorno in cui si osserverà un inizio di colorazione su piastra, uno scaffold di controllo verrà congelato ed analizzato, al fine di avere una più corretta ed adeguata valutazione del grado di differenziamento sul materiale biodegradabile da inoculare nel paziente.

Se il prodotto verrà ritenuto idoneo, quindi solo se avrà inizio il processo di differenziamento in senso osteogenico, verrà programmato l'intervento chirurgico in un tempo prevedibile di 1-3 giorni, mentre nel contempo saranno effettuati i controlli microbiologici opportuni (endotossina, micoplasma, colture anaerobi ed aerobi).

Il dato relativo alla negatività per l'endotossina sarà l'unico dato disponibile per il rilascio del lotto cellulare ad uso clinico. I dati relativi all'esame colturale del micoplasma e dei batteri/miceti aerobi-anaerobi verrà reso noto al clinico

solo ad inoculo avvenuto, per questioni legate alla lettura dell'esame batteriologico.

Procedure Chirurgiche di inoculo del prodotto cellulare

Una settimana/10 giorni prima dell'impianto dello scaffold verrà effettuato un trattamento parodontale non chirurgico. La procedura chirurgica di inoculo prevederà una prima fase di Open Flap Debridement ed in seguito verrà riempito il difetto osseo con lo scaffold collagenico (di Gingistat - Vebas) in cui sono state deposte e differenziate in senso osteogenico 1×10^6 MSCs.

In seguito verrà effettuato un regolare follow-up per valutare l'andamento della rigenerazione ossea e l'eventuale comparsa di effetti collaterali locali o sistemici.

Lo scopo primario di questo protocollo sarà di valutare la fattibilità della procedura di espansione e differenziamento proposta e la sua safety, in termini di tossicità locale o sistemica a breve e lungo termine.

Altrettanto importanti saranno gli End-point secondari di questo studio:

- ▶ valutazione del processo di differenziamento delle MSC innestate, dopo stimolazione con mezzo osteogenico, nella lacuna ossea parodontale;
- ▶ valutazione della capacità dello scaffold in collagene Gingistat (usato fino ad ora unicamente come emostatico e riempitivo) di supportare la crescita e il differenziamento delle MSC in vivo con tempo di degradazione adeguato alla formazione del neo-tessuto;
- ▶ valutazione clinica del processo riparativo parodontale tramite analisi di read-out radiologici.

CONCLUSIONI

Le cellule staminali mesenchimali costituiscono una frontiera terapeutica di grande interesse e po-

tenzialità clinica per il trattamento delle malattie degenerative dell'apparato muscolo-scheletrico-articolare. Le MSC, infatti, presentano molteplici vantaggi, tra cui la facile isolabilità, coltura e stabilità fenotipica in vitro (97), dimostrata capacità di differenziamento nei lineages mesengenic (93, 95, 96, 98, 99), e proprietà immunomodulatorie importanti, qualora utilizzate in contesto allogenico (100).

L'ingegneria tissutale è un campo nuovo nella medicina rigenerativa, il cui scopo è quello di studiare come riparare o sostituire organi e tessuti danneggiati a causa di anomalie congenite, malattie, traumi o processi degenerativi. Questa tecnica prevede l'impianto di uno scaffold (biomateriale poroso) caricato con cellule appropriate per indurre la rigenerazione del tessuto. Tali costrutti sono stati impiantati in modelli animali, ottenendo risultati promettenti per quanto riguarda la formazione di tessuto osseo, anche del tessuto osseo orale (37, 48). Questi studi, differenti per la specie di animale utilizzata, per il difetto osseo creato e per la natura dello scaffold, mostrano comunque un vantaggio significativo nella guarigione dei difetti ossei dimostrando un buon attecchimento cellulare ed una diretta partecipazione delle cellule MSC inoculate nella formazione del nuovo tessuto. Il recovery funzionale e i tempi di guarigione sembrano migliorare trattando i difetti ossei con MSC precedentemente isolate, espanse, deposte su una matrice tridimensionale e successivamente impiantate (49-52) o addirittura coltivando le MSC nello scaffold in presenza di agenti differenziativi come desametasone, glicerol fosfato e acido ascorbico (53, 54).

L'utilizzo di queste tecniche nell'uomo è ancora in fase iniziale ma i lavori confermano l'importanza dell'espansione ex vivo di MSC autologhe da midollo osseo per ridurre l'invasività della tecnica ed il bisogno di un supporto poroso sul quale possa svilupparsi il tessuto di nuova formazione (95, 96, 101, 102). Sulla base di queste considerazio-

ni, è stato definito nel 2002 un protocollo di ricerca sulle MSCs dal titolo "Tissue Engineering: Development of New Strategies for Periodontal and Alveolar Bone Regeneration by Using Haematopoietic-Derived Mesenchymal Cells in Animal and Human. Evaluation of Systemic Effects" (sostenuto dal contributo del Ministero dell'Università e della Ricerca, progetto FIRB, protocollo RBNE017HYL_001), che ha coinvolto la Clinica Odontoiatrica dell'Ospedale San Gerardo di Monza, il Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca ed il Laboratorio Interdipartimentale di Terapia Cellulare e Genica "Stefano Verri" dell'Ospedale San Gerardo di Monza.

I risultati delle ricerche in vitro hanno permesso di definire un protocollo di rigenerazione parodontale mediante cellule staminali adulte di tipo mesenchimale (Alveolar bone regeneration in human by using hard tissue engineering with bone marrow mesenchymal stem cells - Clinical study), nonché di sviluppare nuove metodiche oggetto di brevetto internazionale ("Scaffold ed impianti odontoiatrici ed osteogenici contenenti cellule staminali mesenchimali").

L'applicazione di tali procedure in campi diversi dalla chirurgia orale, come la chirurgia maxillofaciale e l'ortopedia, costituiscono solo un aspetto delle potenziali applicazioni di tali metodiche, che vanno commisurate alla possibilità di conservare le MSCs.

Questa tecnica di stoccaggio non altera né le capacità proliferative né le potenzialità differenziali delle MSCs (103), le rende disponibili per utilizzi successivi senza la necessità di ripetere il prelievo autologo e consente di effettuare interventi a distanza in assenza di una Cell-factory come il Laboratorio GMP di terapia cellulare e genica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Eichelbaum M, Evert B. Influence of pharmacogenetics on drug disposition and response. Clin Exp Pharm Physiol

- 1996;23:983-5.
- 2) Elligsen JE, Thomsen P, Lyngstadaas SP. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontol* 2000 2006;41:136-56.
- 3) Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-91.
- 4) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-45.
- 5) Peltronen L, McKusick VA. Dissecting human diseases in the postgenomic era. *Science* 2001;291:1224-9.
- 6) Cohen DW, Slavkin HC. Periodontal disease and systemic disease. In: Rose LF, Genco RJ, Cohen DW, Mealey BL, editors. *Periodontal Medicine*. Hamilton, Canada: B.C. Decker Inc.; 2000. p. 1-11.
- 7) Hood L, Health JR, Phelps ME, Lin B. System's biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* 2004;306:640-3.
- 8) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
- 9) Slavkin HC. Applications of pharmacogenomics in general dental practice. *Pharmacogenomics* 2003;4:163-70.
- 10) Smith DS. The government's role in advancing regenerative medicine and tissue engineering - science, safety and ethics. *Periodontol* 2000 2006;41:16-29.
- 11) Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953;171:737-8.
- 12) Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999;354 (suppl.1):32-4.
- 13) Stock UA & Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001;52:443-51.
- 14) Gehron Robey P. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest* 2000;105:1489-91.
- 15) Watt FM, Hogan BLM. Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 2000;287:1427-30.
- 16) Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634-8.
- 17) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- 18) Smith AG. Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J Tiss Cult Methods* 1991;13:89-94.
- 19) Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:862-9.
- 20) Wiles MV & Joahansson BM. Embryonic stem cell development in chemically defined medium. *Exp Cell Res* 1999;247:241-8.
- 21) Wiles M, Keller GM. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem cells in culture. *Development* 1991;111:259-67.
- 22) Li M, Pevny M, O'Connell R et al. Generation of purified neural precursor from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 1998;8:971-4.
- 23) Dani C, Smith AG, Dessolin S et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 1997;110:1279-85.
- 24) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98:216-24.
- 25) Kramer J, Hegert C, Guan K et al. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 2000;92:193-205.
- 26) Lumelsky N, Bondel O, Laeng P et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-93.
- 27) Spangrath A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001;414:98-104.
- 28) Bianco P, Gehron-Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000;105:1663-8.
- 29) Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis of the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:287-93.
- 30) Gallacher L, Murdoch B, Wu Det al. Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. *Blood* 2000;96:1740-7.
- 31) Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283:534-7.
- 32) Azizi SA, Strokes D, Augelli BJ et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brain of albino rats: similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3908-13.
- 33) Alison MR, Poulson R, Jeffery R et al. Hepatocytes from non-hepatic stem cells. *Nature* 2000;406:257.
- 34) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-4.
- 35) Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105: 369-77.
- 36) Vogel G. Can adult stem cells suffice? *Science* 2001;292:1820-2.
- 37) Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol* 2003;28: 165-72.
- 38) Olde Damink LLH, Dijkstra PJ, Van Luyn MJA et al. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water soluble carbodiimide. *Biomaterials* 1996;17:765-73.
- 39) Hench LL. Bioceramics. From concept to clinic. *J Am Ceramic Soc* 1991;74:1487-510.
- 40) Petite H, Viateau V, Bensaïd W et al. Tissue engineered bone regeneration. *Nature Biotechnol* 2000;18:959-63.
- 41) Yukna RA, Yukna CN. A 5-years follow up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (biocoral) bone replacement grafts in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 1998;25:1036-40.
- 42) Yukna RA. Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1994;65:177-85.
- 43) Cao YL, Vacanti JP, Paige KT et al. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast reconstr Surg* 1997;100:297-302.
- 44) Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M et al. Effect of allogenic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 2002;173:213-23.
- 45) Niklason LE, Gao J, Abbot WM et al. Functional arteries growth in vitro. *Science* 1999;284:489-93.
- 46) *Advanced Tissue Sciences* (www.advancedtissue.com). URL <http://www.advancedtissue.com>
- 47) *Organogenesis*. (www.organogenesis.com) <http://www.organogenesis.com>
- 48) Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 1998;66:1272-8.
- 49) Huttmacher DW, Sittinger M, Risbud MD. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol* 2004;22:354-62.
- 50) Abukawa GH, Shin M, Williams WB, Vacanti JP, Kaban LP, Troulis MJ. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:601-6.
- 51) Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:589-97.
- 52) Warneke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M et al. Growth and transplantation of a custom vascularized bone graft in a man. *Lancet* 2004;364:766-70.

- 53) Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG et al. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol* 2002; 587-91.
- 54) Gronthos S, Chen S, Wang CY, Robey PG, Shi S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of Cbfa1, osterix and osteocalcin. *J Bone Miner Res* 2003;18:716-22.
- 55) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13625-30.
- 56) Grzesik WJ, Kuznetsov SA, Uzawa K, Mankani M, Robey PG, Yamauchi M. Normal human cementum-derived cells: isolation clonal expansion and in vitro and in vivo characterization. *J Bone Miner Res* 1998;13:1547-54.
- 57) D'Errico JA, Ouyang H, Berry JE, MacNeil RL, Strayhorn C, Imperiale MJ et al. Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. *Bone* 1999;25:39-47.
- 58) Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T et al. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* 2005;20:50-7.
- 59) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-55.
- 60) De Moerloose L, Spencer-Dene B, Revest J, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 in mesenchymal-epithelial signaling during mouse organogenesis. *Development* 2000;127:483-92.
- 61) Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 1999;19:40-58.
- 62) Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996;19:235-375.
- 63) Graves DT, Kang YM, Kose KN. Growth factors in periodontal regeneration. *Compend Suppl* 1994;18:S672-S677.
- 64) Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:474-84.
- 65) King GN. New regenerative technologies: rationale and potential for periodontal regeneration: 2. Growth factors. *Dent Update* 2001;28:60-5.
- 66) King GN. New regenerative technologies: rationale and potential for periodontal regeneration: 1. New advances in established regenerative strategies. *Dent Update* 2001;28:7-12.
- 67) King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 2002;73:925-36.
- 68) Lamster IB, Karabin SD. Periodontal disease activity. *Curr Opin Dent* 1992;2:39-52.
- 69) Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2003;21:1025-32.
- 70) Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995;66:522-30.
- 71) Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and nonhuman primate animal models for periodontal therapy. Results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 1994;65:1158-68.
- 72) Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997;68:1186-93.
- 73) Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniadis HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991;62:458-67.
- 74) Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ. Periodontal regeneration in class III furcation defects in beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 1995;66:462-77.
- 75) Rutherford RB, Niekrah CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontol Res* 1992;27:285-90.
- 76) Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992;63:515-25.
- 77) Sato Y, Kikuchi M, Ohata N, Tamura M, Kuboki Y. Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *J Periodontol* 2004;75:243-8.
- 78) Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 1993;20:537-44.
- 79) King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodontol Res* 1998;33:226-36.
- 80) Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:154-63.
- 81) Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE, Nevins M. Periodontal regeneration in human Class II furcations using purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:213-25.
- 82) Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol* 2003;74:1282-92.
- 83) Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:529-35.
- 84) De Obarrio JJ, Arauz-Dutari JJ, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology - case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:486-97.
- 85) Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74:849-57.
- 86) Anusaksathien O, Webb SA, Jin QM, Giannobile WV. Platelet-derived growth factor gene delivery stimulates ex vivo gingival repair. *Tissue Eng* 2003;9:745-56.
- 87) Anusaksathien O, Jin Q, Zhao M, Somerman MJ, Giannobile WV. Effect of sustained gene delivery of platelet-derived growth factor or its antagonist (PDGF-1308) on tissue engineered cementum. *J Periodontol* 2004;75:429-40.
- 88) Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, Tejada KM, Zhu Z. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2001;72: 815-23.
- 89) Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Enamel matrix derivative prolongs primary osteoblast growth. *J Endod* 2001;27:110-2.

- 90) Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissues. *Periodontol 2000* 1997;13:20-40.
- 91) Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2003;74:202-13.
- 92) Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogeninlike factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:193-204.
- 93) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004;75:1281-7.
- 94) Donzelli E, Salvadè A, Papagna R, Baldoni M, Tredici G. Cellule staminali mesenchimali: estrazione, isolamento e differenziamento oseogenetico. *Doctor Os* 2005 Nov-Dic;16(9):1-6.
- 95) Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, Morrone M, Papagna R, Carini F, Zoapo A, Miloso M, Baldoni M, Tredici G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: in vitro osteogenic differentiation. *Archives of Oral Biology* 2007;52:64-73.
- 96) Salvadè A, Belotti D, Donzelli E, D'Amico G, Gaipa G, Renoldi G, Carini F, Baldoni M, Pogliani EM, Tredici G, Biondi A, Biagi E. *Cytotherapy* 2007 (in press).
- 97) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti W, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- 98) Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-20.
- 99) Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 2002;61(suppl II):ii29-ii31.
- 100) Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64:295-312.
- 101) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-55.
- 102) Papapanou PN, Wennström JL. The angular bony defects as indicator of further alveolar bone loss. *J Clin Periodontol* 1991;8:317-22.
- 103) Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004;28:33-9.