

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

**METODOLOGIE SPERIMENTALI ED APPLICAZIONI
TECNOLOGICHE IN CHIRURGIA**

XXIII° CICLO

Dott.ssa MARIA CONCETTA ARCERITO

**RUOLO DELLA BIOTECNOLOGIA NELL'
IMPIANTO DI PARATIREOCITI**

TESI DI DOTTORATO

Tutor.

Prof. M. Costanzo

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. P. Veroux

Anno Accademico 2010 - 2011

A Leandra

INDICE

Introduzione	4
Razionale e scopo dello studio	5
Cenni di anatomia	6
Colture cellulari	7
Tipi di colture cellulari	9
Pazienti e metodi	11
Estrazione e coltura 2D e 3D dei paratireociti umani	12
Test di vitalità cellulare (MTT-wst8)	13
Valutazione dei livelli di PTH	14
Risultati	16
Valutazione della vitalità cellulare	18
Produzione di PTH, colture 2D e 3D	19
Iconografia	20
Conclusioni	31
Bibliografia	32

INTRODUZIONE

Da una collaborazione tra l'Università di Napoli e l'Università di Catania si cercherà di isolare paratireociti da tessuto di paratiroide umana in quanto già sappiamo che le cellule estratte da questo tipo di campione secernono PTH in funzione della concentrazione di calcio e sono reimpiantabili in matrici 3D. Lo scopo è quello di ripristinare la corretta secrezione di PTH utilizzando paratiroidi bioingegnerizzate. La prima fase di questa attività è quella di realizzare una coltura di paratireociti umani. In seguito si dovrà "ingegnerizzare" in vitro la paratiroide umana all'interno di scaffold per tessuti biologici. Finora, infatti, era possibile coltivare cellule in vitro ma non si potevano trapiantare, perché non avevano struttura tridimensionale. Attualmente ciò è possibile grazie a sottilissime reti (scaffold) sintetizzate in laboratorio. In questi biomateriali vengono fatte sviluppare le cellule, che assumono la forma dell'organo che si intende ricreare.

Per scaffold si intende un supporto poroso tridimensionale realizzato in un materiale biocompatibile e biodegradabile sul quale far avvenire l'adesione iniziale delle cellule e la successiva ricrescita fino a formazione del tessuto. Durante la produzione della matrice extracellulare da parte delle cellule lo scaffold tende a biodegradarsi e a farsi sostituire da tessuto biologico rigenerato.

RAZIONALE E SCOPO DELLO STUDIO

Scopo del nostro studio è quello di sostituire il trapianto di cellule paratiroidee nei pazienti in cui esiste una deficitaria produzione di PTH.

Lo studio prevede che cellule paratiroidee asportate da donatore vivente vengano opportunamente modificate in laboratorio e reimpiantate in un donatore affetto da un ipoparatiroidismo idiopatico o iatrogeno. Tutto ciò prevede il ripristino di una corretta secrezione di PTH utilizzando paratiroidi bioingegnerizzate.

CENNI DI ANATOMIA

Le sono piccole ghiandole endocrine cordonali, la loro struttura vede cordoni di cellule endocrine circondate da connettivo lasso. Le più numerose sono le cellule principali, queste sono piccole e rotondeggianti, hanno un nucleo centrale e hanno un citoplasma che può avere un aspetto chiaro, pallido o scuro. Le cellule principali sono comunemente disposte in cordoni anche se a volte possono formare dei piccoli follicoli, analoghi a quelli tiroidei. Il parenchima paratiroideo possiede un secondo citotipo, le cellule ossifile. Queste sono lievemente più grandi rispetto alle precedenti con un nucleo più piccolo anch'esso centrale e con un citoplasma ricchissimo in mitocondri. La loro funzione non è ancora stata chiarita, nelle ghiandole paratiroidee queste cellule possono trovarsi in cluster noti come Arvin's Bodies. Lo stroma delle paratiroidi è costituito da un tessuto connettivo lasso ricco di capillari di tipo sinusoidale. La ricca vascolarizzazione conferisce alla ghiandola un colorito rosso-bruno. Esiste una innervazione simpatica che regola esclusivamente il tono vasale. Le paratiroidi possono andare incontro a una sostituzione adiposa con la senescenza. I cordoni ghiandolari si riducono di numero e il connettivo si arricchisce di cellule adipose.

COLTURE CELLULARI

Le cellule eucariotiche provenienti dalla dissociazione di tessuti animali possono essere mantenute in vita in colture cellulari per tempi molto lunghi, usando condizioni appropriate (1). Le cellule degli organismi pluricellulari non sono adatte ad una vita autonoma e la loro sopravvivenza dipende dalla disponibilità di un numero elevato di sostanze (zuccheri, aminoacidi, lipidi, vitamine, ioni etc.) che le cellule non sono in grado di procurarsi da sole e che normalmente sono presenti in quantità ben controllate all' interno del tessuto in cui esse si trovano. Le cellule animali sono anche molto sensibili a parametri chimico-fisici dell'ambiente in cui si trovano, quali il pH, l'osmolarità, la concentrazione di anidride carbonica, l'ossigeno, la temperatura e in molti casi la presenza di un substrato adeguato per il loro ancoraggio. Dato il numero di fattori richiesti per la loro sopravvivenza le cellule derivate da animali sono molto delicate e difficili da mantenere in vita in ambiente artificiale (2). Le tipiche condizioni di coltura sono ottenute mantenendo le cellule in contenitori di plastica opportunamente trattata (fiasche e piastre da coltura), immerse in appropriati mezzi di coltura (detti anche terreni di coltura) liquidi che contengono disciolte le quantità appropriate delle sostanze necessarie, in incubatori che sono in grado di mantenere controllata la temperatura, la pressione parziale dell' anidride carbonica e l'umidità (3). Il problema della sterilità viene affrontato a vari livelli. Tutte le manipolazioni delle colture vengono fatte in cappe a flusso laminare provviste di filtri, che limitano la contaminazione occasionale con microrganismi trasportati dall' aria. Tutti i materiali utilizzati per la manipolazione (pipette e piastre da coltura) sono sterili e di norma monouso. Infine ai terreni di coltura, sterilizzati per filtrazione (con

filtri da 0.22 micron), vengono spesso aggiunti antibiotici per limitare la possibilità di inquinamento da parte dei batteri.

TIPI DI COLTURE CELLULARI

Le cellule che sono mantenute in coltura possono derivare direttamente dalla dissociazione di un tessuto (colture cellulari primarie) o possono derivare da colture precedenti (colture secondarie, o terziarie etc). Nella maggior parte dei casi, le cellule derivate dalla dissociazione di tessuti hanno una limitata capacità replicativa e tendono a diventare senescenti. Vi sono tuttavia linee cellulari che sono in grado di replicarsi indefinitamente in coltura e che vengono spesso usate come modelli sperimentali. Le cellule di tali linee sono derivate da colture primarie di tumori o da manipolazioni genetiche di colture primarie. Tali manipolazioni collettivamente chiamate immortalizzazione, prevedono l'inserimento di specifici geni virali o anche la sola propagazione per molti passaggi di una coltura primaria. Le linee cellulari derivate dalla stessa linea cellulare originaria ma mantenute per tempo indefinito, ibernata a bassa temperatura (al di sotto di 60° C, ma tipicamente a -192, in azoto liquido). Le cellule mantenute in coltura tendono a cambiare con il passare del tempo (4). L'origine di tali cambiamenti è sia genetica (mutazioni, perdita di cromosomi o parte di essi) sia epigenetica (metilazione del DNA, etc.). Linee cellulari derivate dalla stessa linea cellulare originaria ma mantenute separate in differenti laboratori per molto tempo tendono ad acquisire alcune caratteristiche proprie (5). E' pertanto necessario tenere conto di queste differenze per interpretare risultati sperimentali. Un'ulteriore tipo di coltura cellulare è la cosiddetta coltura organo tipica, nella quale una fettina di tessuto mantiene in vitro molte caratteristiche presenti nell'organo originale. Tali colture vengono utilizzate per studiare la fisiologia di organi in cui la struttura del tessuto ha una particolare importanza, come per esempio i tessuti neurali (6).

USI: le colture cellulari vengono utilizzate nella ricerca come modello sperimentale in innumerevoli tipi di esperimenti. Esse sono utilizzate per analizzare l'effetto dei farmaci e verificare la mutagenicità e cancerogenicità delle sostanze. Vengono utilizzate come modello in cui studiare l'effetto dell'espressione di particolari geni. Il mantenimento in coltura di cellule è un passaggio fondamentale per la produzione di organismi transgenici, la produzione di anticorpi monoclonali, di proteine ricombinanti, la produzione di alcuni tipi di vaccini.

PAZIENTI E METODI

La prima fase della ricerca è stata incentrata sull'ottimizzazione del metodo di estrazione ed amplificazione in vitro dei paratireociti umani. I campioni chirurgici provenivano da tre pazienti uremici cronici, in emodialisi sottoposti a paratiroidectomia totale per iperparatiroidismo secondario. Il tessuto paratiroideo asportato è stato processato enzimaticamente per disgregare la struttura delle ghiandole e facilitare la fuoriuscita di paratireociti e la sospensione è stata centrifugata a 800 g. Il pellet risultante è stato lavato con RPMI e risospeso in un mezzo integrato. La quantità di cellule vitali è stata determinata con il test del trypan blu. Le colture proliferanti sono state mantenute in flaconi da 25 cm² e incubate in atmosfera umidificata 95% aria e 5% CO₂ a 37 ° C. Dopo circa 15 giorni la coltura è giunta a subconfluenza e le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione e lavate con PBS risospese in mezzo integrato e ripiastrate. Le colture sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico e dal punto di vista funzionale. La seconda fase ha riguardato la semina delle popolazioni di paratireociti su scaffolds collagenici ed in questa fase le cellule seminate sono state caratterizzate da un punto di vista sia morfologico che funzionale. La vitalità e la proliferazione cellulare è stata valutata con il WST-8 test. Il dosaggio del PTH è stato effettuato su aliquote di terreni di coltura dei paratireociti a vari tempi di crescita. I valori di PTH (metodo ELISA) nei brodi di coltura cellulari sono stati normalizzati rispetto al numero delle cellule in coltura ricorrendo alla valutazione delle proteine totali mediante il saggio proteico (Biorad)

ESTRAZIONE E COLTURA 2D E 3D DEI PARATIREOCITI UMANI

I paratireociti umani sono stati ottenuti da ghiandole iperplastiche rimosse chirurgicamente da pazienti uremici sottoposti ad emodialisi.

Ogni soggetto ha prodotto un numero variabile di frammenti. 6 pezzi ghiandolari sono stati utilizzati in questo studio. I tessuti sono stati frammentati in piccoli pezzi e digeriti a 37°C per 90 minuti con 0,1% collagenasi di tipo II (Worthington, Coger, Parigi, Francia) in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Cergy, Francia). I frammenti di tessuto paratiroideo sono stati meccanicamente dispersi per aspirazione ogni 15 minuti con una pipetta. Alla fine del trattamento, la sospensione è stata centrifugata a 800g. Il pellet risultante è stato lavato con RPMI e risospeso in un mezzo integrato (RPMI 1640 con 10% di siero fetale bovino, 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomina, e 2mM L-glutammina).

La quantità di cellule vitali è stata determinata con il test del trypan blu. (figure 1-5)

Le cellule sono state disperse in fiasche di coltura da 75 cm² e incubate in atmosfera umidificata 95% aria e 5% CO₂ a 37°C .

Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni. Dopo circa 15 giorni, la coltura è giunta a subconfluenza e le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione, lavate con PBS e risospese in mezzo integrato e ripiastrate alla densità di 1x10⁴ cm².per le colture secondarie.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti dopo il primo passaggio.

Per la coltura dei paratireociti umani su spugne collageniche tridimensionali, le cellule, dopo il primo passaggio, sono state piastrate alla densità di 2X10⁶/cm² su dischi di collagene del diametro di 1 cm e 2 mm di spessore ed incubate in atmosfera umidificata 95% aria e 5% CO₂ a 37°C .

Test di vitalità cellulare (MTT-wst8)

Il test MTT prevede la valutazione della vitalità e della proliferazione cellulare mediante la misurazione dell'attività dell'enzima deidrogenasi mitocondriale. Noi abbiamo valutato la vitalità e la proliferazione cellulare ricorrendo al WST-8 test messo a punto dalla Dojindo (Japan), variante del metodo MTT (Mitochondrial Tetrazolium salt Test).

In breve, la quantificazione dell'attività della deidrogenasi mitocondriale viene valutata mediante la conversione del sale solubile di tetrazolio (MTT, incolore) nel suo corrispondente prodotto, il formazano (colorato). La valutazione quantitativa della conversione del sale nella sua forma colorata è stata effettuata calcolando spettrofotometricamente l'assorbimento a 450 nm e correggendo la lettura con il valore di assorbimento a 600 nm (turbidimetria).

I livelli di conversione del substrato sono quindi proporzionali all'attività enzimatica la quale, a sua volta, rappresenta un marker della vitalità e proliferazione cellulare. Utilizzando questo metodo, la vitalità cellulare è stata valutata a vari tempi sia sulle colture bidimensionali (flasca) che tridimensionali (scaffold collagenici). Ogni punto sperimentale è stato ripetuto in triplicato ed è stata calcolata sia la media che la deviazione standard.

Per quanto riguarda le colture bidimensionali, dopo 2 settimane (tempo in cui la popolazione raggiunge la sub-confluenza), le cellule venivano sottoposte al saggio MTT-wst8, staccate con la tripsina e ripiastrate alla densità di $1 \times 10^4 \text{ cm}^2$.

Valutazione dei livelli di PTH

Il saggio immunoenzimatico PTH intatto Biomerica (Newport beach CA, USA) è un test ELISA (saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato) a doppio anticorpo per la misurazione della catena di 84 aminoacidi biologicamente intatta del PTH. Due diversi anticorpi policlonali di capra anti-PTH umano sono stati purificati mediante cromatografia per affinità al fine di ottenere una specificità per regioni ben definite della molecola PTH. Un anticorpo biotilinato è preparato per legarsi solo al PTH 39-84 della regione medio molecolare e C-terminale.

L'altro anticorpo è preparato per legarsi solo al PTH 1-34 del frammento N-terminale ed è marcato con perossidasi di rafano [HRP].

C-terminali siano legati dall'anticorpo anti-PTH biotilinato (29-84), soltanto il PTH intatto 1-84 forma il complesso sandwich necessario per rilevare l'anticorpo. Le capacità dell'anticorpo biotilinato e del micropozzetto rivestito di streptavidina sono state regolate per mostrare un'interferenza trascurabile dei frammenti inattivi, anche a livelli estremamente elevati. In questo saggio, i calibratori, i controlli o i campioni paziente vengono incubati contemporaneamente con un anticorpo marcato con enzima e con uno coniugato con biotina in un pozzetto per micropiastre rivestite di streptavidina. Al termine dell'incubazione del saggio, il micropozzetto viene lavato per eliminare i residui non legati e l'enzima legato alla fase solida viene incubato con il substrato (tetrametilbenzidina, TMB). In seguito per arrestare la reazione viene aggiunta una soluzione bloccante acida, che conferisce al liquido una colorazione gialla. L'intensità cromatica è direttamente proporzionale alla concentrazione di PTH intatto nel campione. Sulla base dei risultati ottenuti dai calibratori viene generata una curva di risposta alla dose di

unità di assorbanza in relazione alla concentrazione. Le concentrazioni di PTH intatto presenti nei controlli e nei campioni cellulari sono determinate direttamente da questa curva.

La valutazione è stata effettuata su aliquote dei terreni di coltura dei paratireociti a vari tempi di crescita. L'assorbanza è stata letta a 450 nm utilizzando uno spettrofotometro UV/visibile della Thermofisher (Biomate 3). I valori di PTH nei brodi di coltura cellulari sono stati normalizzati rispetto al numero di cellule in coltura, ricorrendo alla valutazione delle proteine totali mediante il saggio Biorad. Esperimenti di variazione nella produzione di PTH in funzione del Calcio extracellulare sono stati effettuati incubando le popolazioni cellulari in terreni di coltura sia a basso (0,5 mM) che ad alto contenuto di Calcio (2,0 mM).

RISULTATI

Dopo 24 ore di coltura in RPMI supplementato, le cellule estratte dalle paratiroidi umane erano quasi tutte adese, molte raggruppate in clusters che ricordavano l'organizzazione ghiandolare. erano presenti due popolazioni cellulari: una a morfologia epithelial-like predominante (i paratireociti, circa 90-95 %) ed una endothelial-like (cellule dell' endotelio vasale 5-10%) (figura 5) (7).

Questi dati dimostrano che le nostre condizioni estrattive generano una co-coltura composta da paratireociti e cellule dell' endotelio vasale. Per quanto riguarda la morfologia delle cellule staminali sulle matrici collageniche tridimensionali dopo 10 settimane di incubazione mantengono ancora una morfologia epithelial-like, arrivando a colonizzare completamente la superficie dello scaffold (figure 6 e 7) (8).

La co-coltura è composta da paratireociti e cellule dell'endotelio vasale. Per quanto riguarda la morfologia strutturale delle cellule seminate sulle matrici collageniche tridimensionali , dopo 10 settimane di incubazione mantengono ancora una morfologia epithelial-like, arrivando a colonizzare completamente la superficie dello scaffold.

Le condizioni estrattive generano una co-coltura ed è per questo motivo che si ha la neoangiogenesi del tessuto trapiantato perché con la co-coltura oltre ad avere una rigenerazione dei tireociti si formano anche i vasi (epithelial-like) che arrivano a colonizzare completamente la superficie dello scaffold. In particolare la co-coltura in pistra evidenzia un buon livello di progressione proliferativa nel range temporale da 0 a 10 settimane, dimostrando che anche dopo 10 settimane di coltura le cellule sono ancora vitali. Dopo 10 settimane di incubazione le cellule conservano anche in ambiente 3 D una buona progressione proliferativa. L'

andamento della produzione di PTH nelle colture cellulari bidimensionali è regolato dalla concentrazione di calcio nel terreno. E' stato osservato che a basse concentrazioni di calcio i paratireociti conservano la capacità di secernere il PTH con un andamento abbastanza costante nel tempo. Tuttavia verso la decima settimana di coltura si evidenzia una leggera tendenza alla diminuzione della produzione di PTH. In presenza di elevate concentrazioni di calcio la secrezione di PTH si riduce notevolmente nel tempo fino ad azzerarsi completamente tra l'ottava e la decima settimana. Tali risultati sono stati confermati anche nelle colture tridimensionali.

Valutazione della vitalità cellulare

Il test MTT Wst-8 è stato effettuato sia sulle colture bidimensionali (piastra) che su quelle tridimensionali. La figura 8, mostra la vitalità/proliferazione delle cellule estratte dalle paratiroidi umane a vari tempi di coltura. In particolare, la co-cultura in piastra evidenzia un buon livello di progressione proliferativa nel range temporale da 0 a 10 settimane, dimostrando che anche dopo 10 settimane di coltura le cellule sono ancora vitali.

La figura 9, mostra la vitalità/proliferazione delle cellule pilastrate sulle matrici collageniche tridimensionali (Integra) a vari tempi. In particolare, anche dopo 10 settimane di incubazione le cellule conservano anche in ambiente 3D una buona progressione proliferativa

Produzione di PTH, colture 2D e 3D

L'andamento della produzione di PTH nelle colture bidimensionali è mostrato in figura 10. Come si può vedere dal grafico a basse concentrazioni di Ca^{++} i paratirociti umani conservano la capacità di produrre e secernere il PTH con un andamento abbastanza costante nel tempo. Tuttavia verso la 10 settimana di coltura si evidenzia una leggera tendenza alla diminuzione della produzione di PTH.

In presenza di elevate concentrazioni di Ca^{++} la produzione e secrezione del PTH si riduce notevolmente nel tempo fino ad azzerarsi completamente tra l'ottava e la decima settimana.

Anche le colture tridimensionali mantengono la capacità di produrre PTH in risposta alla concentrazione di Ca^{++} . L'andamento della produzione di PTH nelle colture di paratirociti umani su scaffold collagenico è mostrato in figura 11. Come si può vedere dal grafico a basse concentrazioni di Ca^{++} i paratirociti umani conservano la capacità di produrre e secernere il PTH con un andamento abbastanza costante nel tempo. Tuttavia verso la 10 settimana di coltura si evidenzia una leggera tendenza alla diminuzione della produzione di PTH.

In presenza di elevate concentrazioni di Ca^{++} la produzione e secrezione del PTH si riduce notevolmente nel tempo fino ad azzerarsi completamente tra l'ottava e la decima settimana.

ICONOGRAFIA

Figura 1: Test del trypan blue

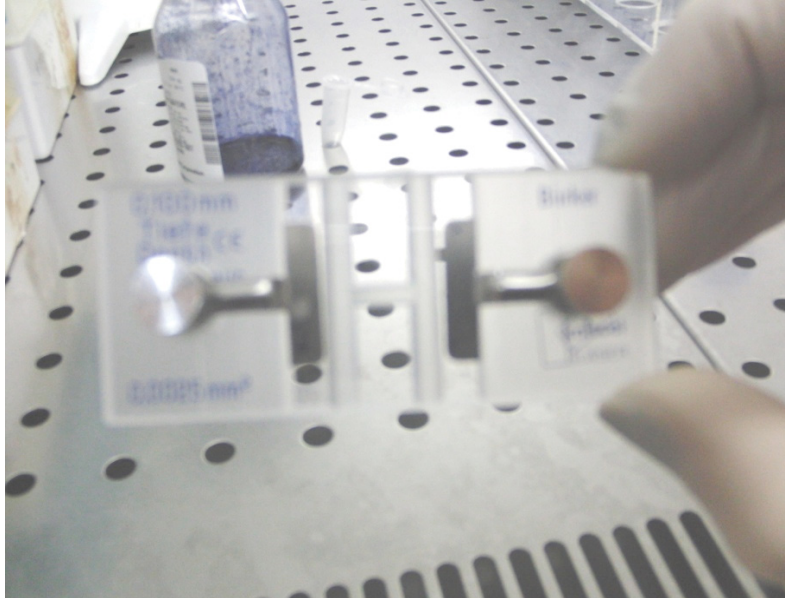


Figura 2: Metodica per conta dei paratireociti

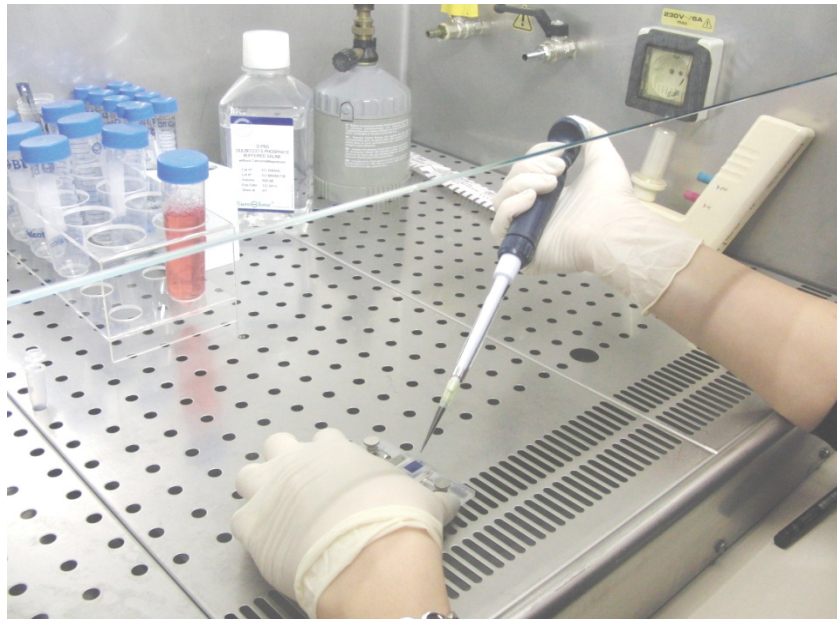


Figura 3: Camera di Buerker

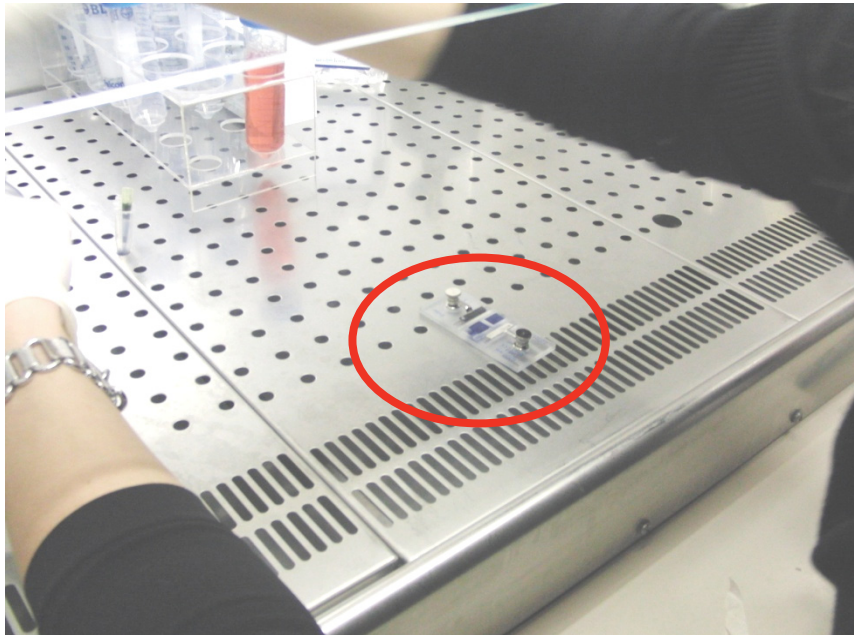


Figura 4: Conta dei paratireociti



Figura 5: Paratireociti

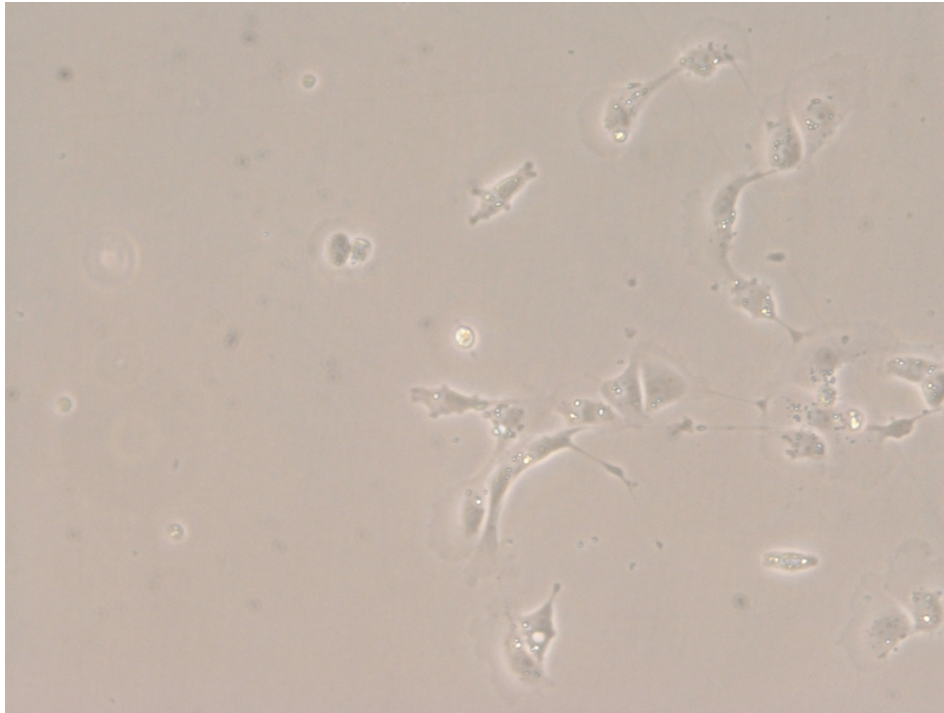


Figura 6. Immagine in microscopia Elettronica a Scansione (SEM) della matrice collagenica con paratireociti.

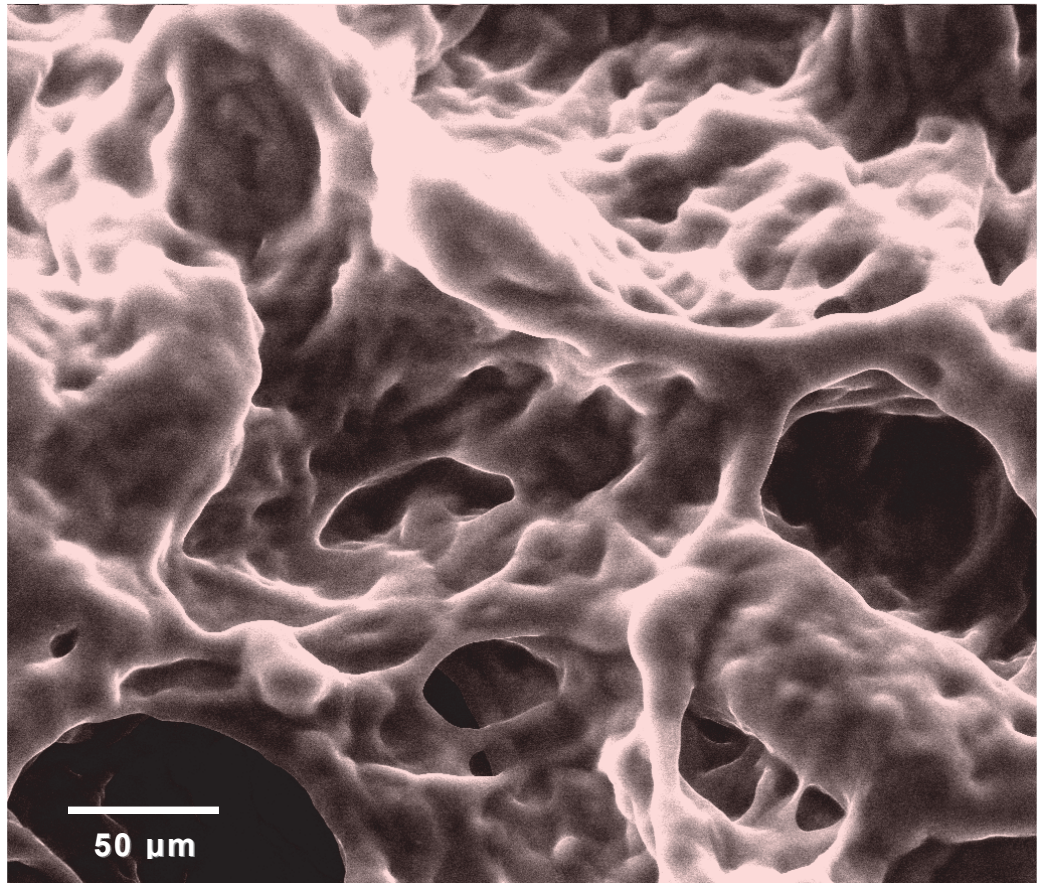


Figura 7. Immagine in microscopia Elettronica a Scansione (SEM) della matrice collagenica, le frecce indicano le cellule (paratireociti).

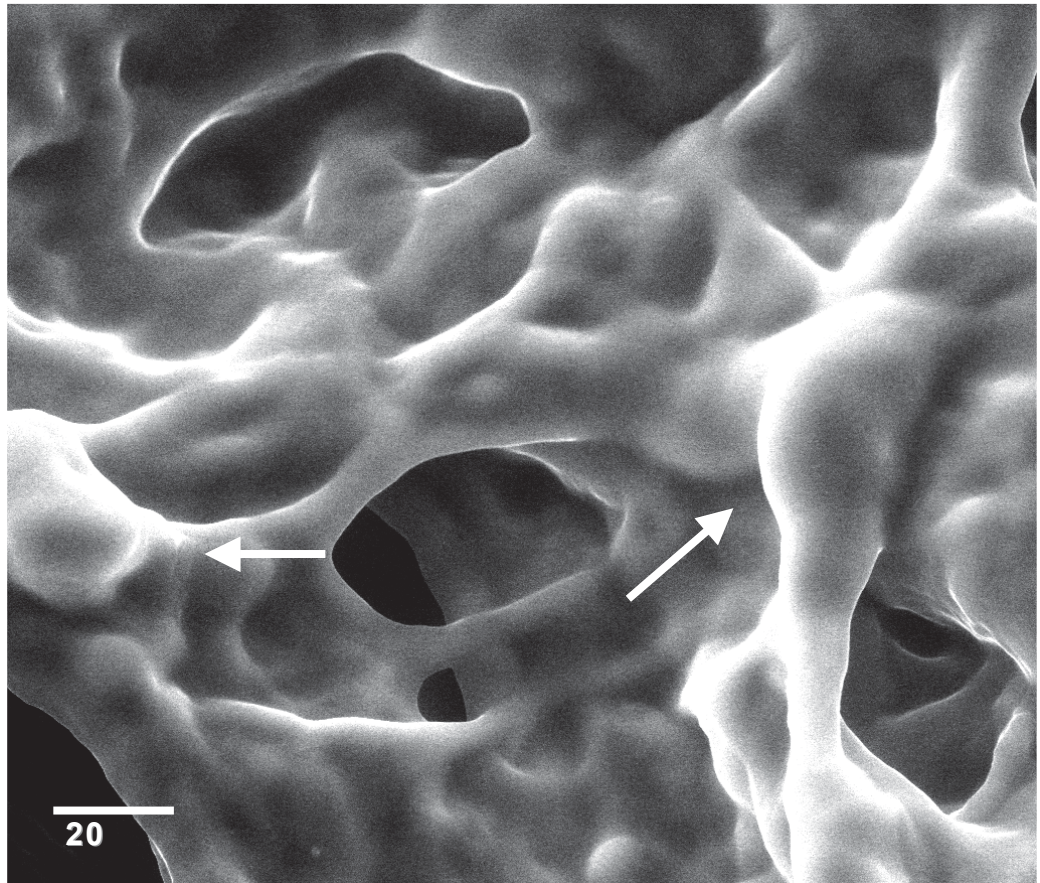


Figura 8. Grafico vitalità/proliferazione cellulare delle colture bidimensionali (flasca).

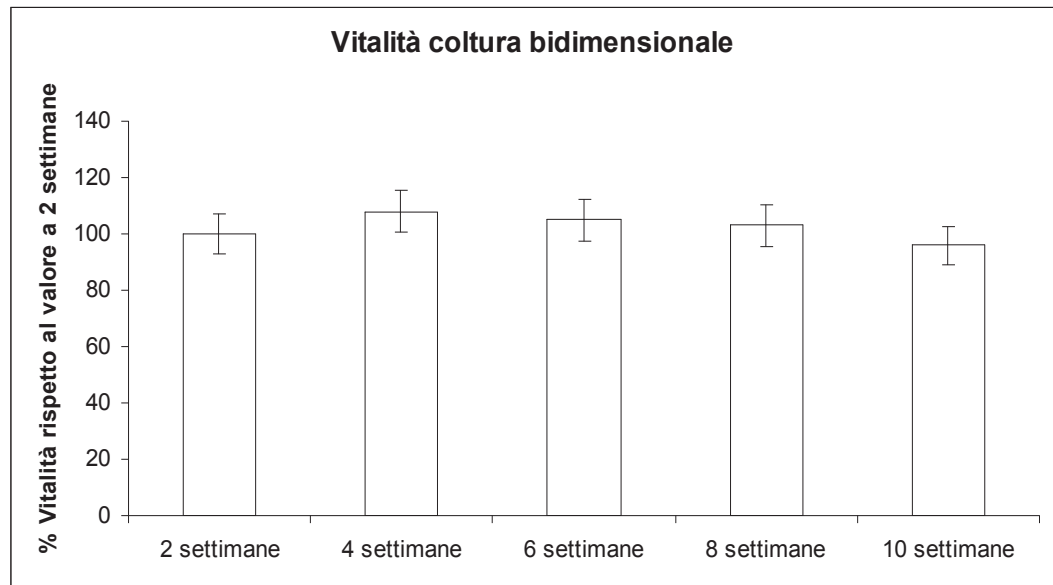


Figura 9. Grafico vitalità/proliferazione cellulare delle colture tridimensionali (Scaffold collagenico).

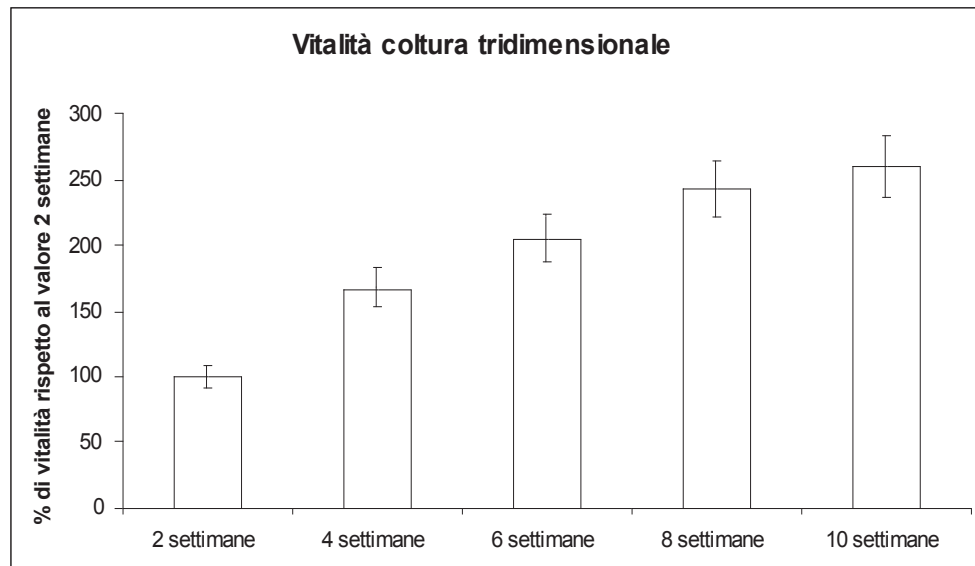


Figura 10. Produzione di PTH in colture bidimensionali. Le barre bianche si riferiscono ai paratireociti umani coltivati in RPMI supplementato con 0,5 mM di Ca^{++} . Le barre grigie si riferiscono ai paratireociti umani coltivati in RPMI supplementato con 2,0 mM di Ca^{++} . Dati normalizzati rispetto alla quantità di cellule in coltura.

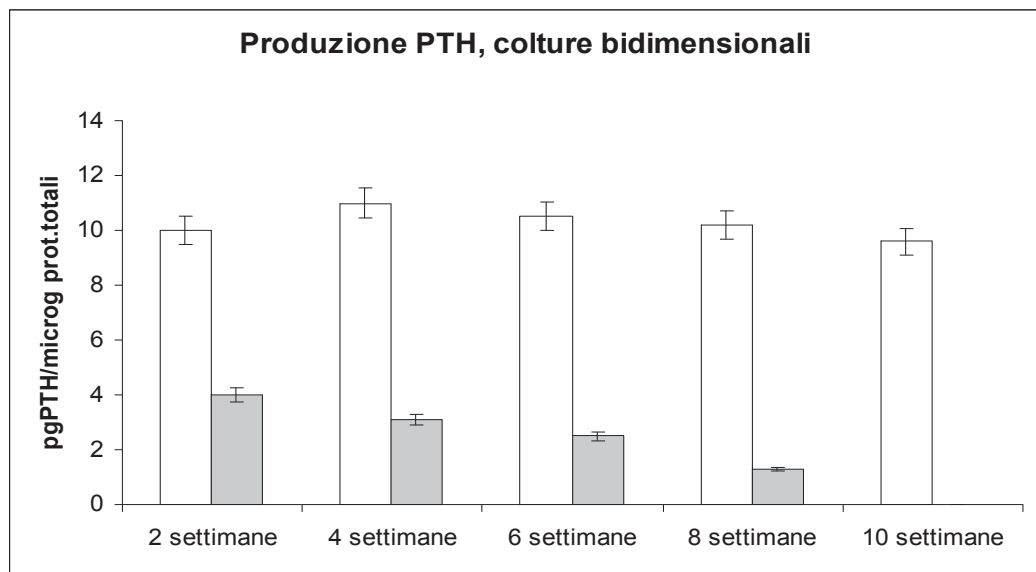
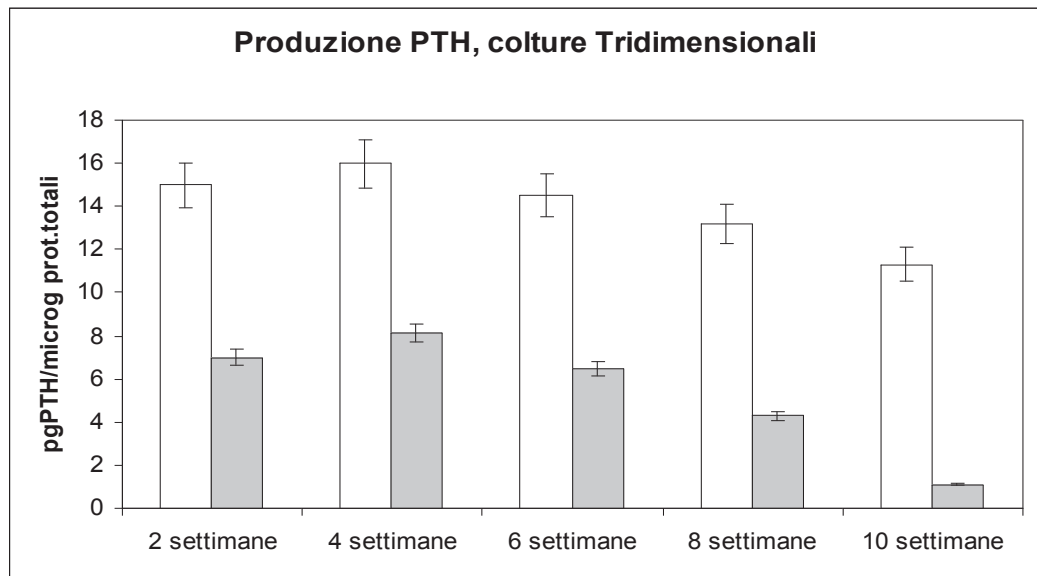


Figura 11. Produzione di PTH in colture tridimensionali. Le barre bianche si riferiscono ai paratireociti umani coltivati in RPMI supplementato con 0,5 mM di

Ca⁺⁺. Le barre grigie si riferiscono ai paratireociti umani coltivati in RPMI supplementato con 2,0 mM di Ca⁺⁺. Dati normalizzati rispetto alla quantità di cellule in coltura.



CONCLUSIONI

La scelta di utilizzare paratireociti di pazienti affetti da iperparatiroidismo secondario ha contribuito ad ottenere questi risultati, che, seppur parziali e in vitro, vanno sperimentati in vivo su modelli animali. Il costrutto bioingegnerizzato in scaffold impiantabile (9) nel sottocutaneo può evitare la temuta dispersione delle cellule paratiroidi impiantate e dunque favorire la loro agevole rimozione in caso di complicanze (10). La nostra ricerca ha avuto come obiettivi innanzitutto la realizzazione di colture cellulari di paratireociti umani e successivamente la ingegnerizzazione in vitro di paratiroidi umane all' interno di scaffold collagenici. L'insieme dei dati mostrati in questo lavoro sperimentale, dimostrano che è possibile sviluppare una cultura di paratireociti umani su matrici collageniche tridimensionali in grado di mantenere una discreta spinta proliferativa associata alla capacità di produrre PTH. Ancora più interessante è la capacità del sistema di rispondere allo stimolo fisiologico (Ca^{++} extracellulare) modulando la produzione dell'ormone stesso in funzione dello stimolo.

Confrontando i nostri dati in termini di vitalità cellulare e produzione di PTH con quelli di altri lavori presenti in letteratura (1,2,3), si evince che in passato è stato un grosso problema individuare condizioni colturali in grado di soddisfare questi due parametri. Probabilmente la scelta del terreno RPMI, ricco in fosfati, associato alla presenza di cellule dell'endotelio vasale nella co-cultura hanno stimolato la capacità proliferativa dei paratireociti umani con mantenimento della funzione fisiologica (produzione PTH).

In ultima analisi anche la scelta di estrarre i paratireociti da pazienti affetti da iperparatiroidismo secondario ha notevolmente contribuito all'ottenimento di questo risultato.

BIBLIOGRAFIA

1. Liu W, Ridefelt P, Akerström G, Hellman P. Differentiation of human parathyroid cells in culture. *J Endocrinol* 2001; 168: 417-425.
2. Nawrot I, Wozniewicz B, Tolloczko T, Sawicki A, Gorski A, Chudzinski W, Wozniewicz B, Tolloczko T, Sawicki A, Gorski A, Chudzinski W, Wojtaszek M, Grzesiuk W, Sladowski D, Karwacki J, Zawitkowska T, Szmidt J. Allotransplantation of cultured parathyroid progenitor cells without immunosuppression: clinical results. *Transplantation*. 2007; 83: 734-40.
3. Shih Y R, Kuo Tk, Yang AH, Lee OK, Lee CH. Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland. *Cell Prolif*. 2009; 42: 461-470.
4. Hellman. Culture of Parathyroid cells. *Methods Mol Med* 2005; 107: 291-301.
5. Guerrero MA, Evans DB, Lee JE, Bao R, Berek A, Gantela S, Griffin GD, Perrier ND. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated? *World J Surg*. 2008; 32: 836-839.
6. Gahwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1981; 4: 329-342).
7. Picariello L, Benvenuti S, Recenti R, Formigli L, Falchetti A, Morelli A, Masi L, Tonelli F, Cicchi P, Brandi ML. Microencapsulation of Human Parathyroid cells :An ‘in vitro’ Study. *J Surg Res*. 2001; 96: 81-89.
8. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2004; 199: 174-180.
9. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2005; 203: 465-470.

10. Iovino F, Armano G, Auriemma PP, Sergio R, De Sena G, Capuozzo V, Rosso F, Marino G, Papale F, Grimaldi A, Barbarisi A. L'ingegnerizzazione tissutale delle cellule paratiroidi. G Chir 2010; 31: 312-315.