



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

# Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE  
INDIRIZZO UNICO  
XXVI CICLO

## Le applicazioni biotecnologiche nella medicina traslazionale

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi  
**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi  
**Supervisore:** Ch.mo Dott.ssa Barbara Zavan

**Dottorando** MARCO INFERRERA

# Indice

<b>Riassunto</b>	pag.1
<b>Abstract</b>	pag.4
<b>Introduzione</b>	pag.7
<b>Scopo generale della ricerca</b>	pag.11
 <i>Primo lavoro: INGEGNERIA TISSUTALE IN ORTOPEDIA; STUDIO COMPARATIVO TRA CELLULE STAMINALI DA TESSUTO ADIPOSO E DA MIDOLLO OSSEO</i>	
<b>Introduzione</b>	pag.12
<b>Ingegneria dei tessuti</b>	pag.12
<b>Principi di rigenerazione ossea</b>	pag.13
<b>Metodiche rigenerazione ossea</b>	pag.15
<b>Innesti ossei e matrici ossee demineralizzate</b>	pag.17
<b>Le cellule staminali</b>	pag.22
<b>Le cellule staminali dal tessuto adiposo</b>	pag.25
<b>Le cellule staminali dal midollo osseo</b>	pag.26
<b>Scopo della ricerca</b>	pag.28
<b>Materiali e metodi</b>	pag.28
<b>Risultati</b>	pag.40
<b>Discussione</b>	pag.46
<b>Conclusioni</b>	pag.49
<b>Bibliografia</b>	pag.50

*Secondo lavoro: LOW-LEVEL LASER THERAPY; STUDIO SPERIMENTALE IN VITRO  
SULLA PROLIFERAZIONE DELLA LINEA CELLULARE FIBROBLASTICA*

<b>Introduzione</b>	pag.59
<b>Che cos'è il laser a diodi</b>	pag.59
<b>Com'è fatto</b>	pag.62
<b>Come viene trasportato il raggio</b>	pag.64
<b>Come agisce</b>	pag.65
<b>Cos'è un cromoforo</b>	pag.68
<b>Low-Level Laser Therapy</b>	pag.69
<b>Scopo della ricerca</b>	pag.75
<b>Materiali e metodi</b>	pag.75
<b>Risultati</b>	pag.85
<b>Discussione</b>	pag.93
<b>Conclusioni</b>	pag.96
<b>Bibliografia</b>	pag.97

*Terzo lavoro:* ATTIVITÀ COLLAGENASICA DEL VIBRIO ALGINOLYTICUS; STUDIO  
SPERIMENTALE E PROSPETTIVE CLINICHE

<b>Introduzione</b>	pag.100
<b>Le collagenase umane</b>	pag.100
<b>Struttura</b>	pag.103
<b>Regolazione dell'attività</b>	pag.106
<b>Inibizione della collagenasi</b>	pag.107
<b>Relazione enzima-substrato</b>	pag.108
<b>Collagenase batteriche e loro struttura</b>	pag.110
<b>Malattie fibroproliferative della fascia</b>	pag.113
<b>Malattie di dupuytren</b>	pag.114
<b>Scopo della ricerca</b>	pag.125
<b>Materiali e metodi</b>	pag.125
<b>Risultati</b>	pag.132
<b>Discussione</b>	pag.151
<b>Conclusioni</b>	pag.152
<b>Bibliografia</b>	pag.153

# Riassunto

Questo lavoro si prefigge di evidenziare il massivo potenziale dell'impiego delle biotecnologie nella medicina traslazionale. La tesi è tripartita sulla base delle tre distinte ricerche in essa illustrate: ciascuna di esse è caratterizzata dall'utilizzo di approcci biotecnologici differenti. La prima ricerca ha come scopo il confronto in vitro del potenziale osteogenico di cellule staminali mesenchimali prelevate da midollo osseo (hBMSCs) e da tessuto adiposo (hASCs). Ancora, la ricerca si prefigge di valutare in vitro la capacità di due DBM (TBM e DBX) di stimolare il differenziamento in senso osteogenico di due popolazioni di cellule staminali (hBMSCs e hASCs). Le cellule mesenchimali staminali prelevate dal tessuto adiposo (Liposuzione Addominale) e dal midollo osseo (Artroprotesi D'anca), sono state coltivate in un Scaffold a base di osso bovino (Orthoss), in presenza di terreno non differenziativo con l'aggiunta di TBM e DBX. In tal modo, sono stati ottenuti 4 diversi gruppi cellulari. Dopo 28 giorni di incubazione, sono stati effettuati i test MTT (vitalità cellulare) e RT-PCR per la variazione dell'espressione genica di Osteopontina, Osteocalcina, Osteonectina e Collagena I. I test MTT hanno dimostrato una maggiore vitalità cellulare delle cellule coltivate con il TBM rispetto alle cellule coltivate con il DBX e nessuna differenza significativa tra i due tipi di cellule mesenchimali. I risultati suddetti sono stati confermati anche con la RT-PCR, in cui si nota un aumento dell'espressione genica dei geni dell' Osteopontina, Osteocalcina, Osteonectina e Collagene I in quelle cellule coltivate con il TBM rispetto alle cellule coltivate con il DBX e nessuna differenza significativa tra i due tipi di cellule mesenchimali. Alla luce di ciò, è possibile asserire che i risultati hanno dimostrato l'assenza di una differenza significativa nel potenziale osteogenico delle cellule mesenchimali prelevate dal tessuto adiposo e midollo

osseo; si è, inoltre, evidenziate che tra le due DBM analizzate il TBM risulta essere migliore rispetto al DBX sia come capacità differenziativa che come sopravvivenza cellulare.

La seconda ricerca si basa sullo studio delle applicazione del laser a diodi nell'infiammazione e rigenerazione gengivale, utilizzando bassi livelli di potenze ( Low Level Laser Therapy). Lo scopo di questa ricerca è stato quello di creare un protocollo clinico da poter utilizzare in ambito odontoiatrico. Fibroblasti gengivali umani sono stati isolati da tessuto connettivo gengivale umano, piastrati in multiwell e biomateriale HYAFF a base di acido ialuronico e irradiate con il laser a diodi a diverse potenze (1 W- 24 mW) e a diverso minutaggio ( 10 minuti- 75sec). A fine giornata, a 24 e a 48 ore sono stati effettuati i test MTT (vitalità cellulare) e RT-PCR per la variazione dell'espressione genica dei geni del Collagene I e della Fibronectina. Dai test MTT risulta che le cellule trattate con il laser - con una potenza che varia tra i 24 mW e 110 mW e un minutaggio che varia dai 75 sec ai 300 sec - esprimono una vitalità cellulare maggiore rispetto ai CTRL. Tali risultati sono stati confermati anche dalla RT-PCR, in cui si nota un aumento dell'espressione genica dei geni del Collagene I e della Fibronectina di quelle cellule irradiate con una potenza che varia tra i 24 mW e i 110 mW e un minutaggio che varia dai 75 sec ai 300 sec. Conseguentemente, è possibile sostenere che un protocollo clinico che potrebbe essere utilizzato in ambito odontoiatrico è una bassa potenza che varia tra i 24 mW e i 110 mW e un minutaggio che varia dai 75 sec ai 300 sec.

La terza ricerca si pone l'obiettivo di studiare in vivo l'effetto della Collagenasi del *Vibro Alginoliticus* sulla patologia fibroproliferativa della mano *Dupuytren*. La patologia di *Dupuytren* è caratterizzata dalla formazione di un cordone fibrotico sull'aponevrosi facciale della mano costituito da Collagene I ma, soprattutto, da Collagene III. I cordoni fibrotici sono stati prelevati in sala operatoria (Aponevrectomia Regionale), trasportati in laboratorio, tagliati a pezzi da 5mm, in ciascuno dei quali sono stati iniettati 20 µl di Collagenasi. Alcuni campioni sono stati sottoposti ad azioni meccaniche di compressioni verticali e distensioni longitudinali; successivamente, in essi sono stati iniettati 20 µl di Collagenasi, altri campioni sono stati trattati con l'aggiunta di 20 µl di EDTA, per la presenza di spot di calcificazioni osservati grazie alla colorazione Azan Mallory e confermati dalla IHC per l'osteopontina. Sono state applicate a 3-6-12-24-30 ore le comuni tecniche istologiche (Azan Mallory, IHC Collagene I, Collagene III e Osteopontina). E' stata utilizzata, inoltre, l'analisi semiquantitativa del Collagene III con il Software Imagej. Le analisi istologiche hanno dimostrato una riduzione del Collagene I e III in tutti i campioni trattati con Collagenasi e lo scioglimento dei nuclei di calcificazione in quei campioni trattati con EDTA. L'analisi semiquantitativa del Collagene III ha mostrato una diminuzione progressiva del segnale del Collagene III a intervalli temporali crescenti e un aumento dell'efficacia dell'utilizzo della Collagenasi se i campioni subiscono dei trattamenti meccanici e l'aggiunta di EDTA. Quindi, la Collagenasi del *Vibro Alginoliticus* potrebbe essere un'opzione alla terapia non chirurgica delle malattie fibroproliferative delle fasce.

# Abstract

This paper aims to highlight the massive potential of the use of biotechnology in translational medicine. The thesis is tripartite on the basis of three separate searches it illustrated: each of them is characterized by the use of different biotechnological approaches. The first research has as its purpose the in vitro comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells taken from the bone marrow (hBMSCs) and adipose tissue (hASCs). Still, the research aims to evaluate in vitro the ability of two DBM (TBM and DBX) to stimulate the osteogenic differentiation of two populations of stem cells (hBMSCs and hASCs). The mesenchymal stem cells taken from the adipose tissue (Abdominal Liposuction) and bone marrow (Total Hip Replacement), were cultured in a Scaffold based on bovine bone (Orthoss) , in the presence of ground not differentiation with the addition of TBM and DBX . In this way , were obtained four different cell groups . After 28 days of incubation , were performed the MTT test (cell viability) and RT-PCR for the variation of gene expression of Osteopontin , Osteocalcin, Osteonectin and Collagen I. The MTT assay showed higher cell viability of the cultured cells with the TBM compared to cells cultured with the DBX and no significant difference between the two types of mesenchymal cells . The above results were also confirmed by RT-PCR, in which there is an increase in gene expression of the genes of the ' Osteopontin , Osteocalcin, Osteonectin and Collagen I in those cells cultured with TBM compared to cells cultured with the DBX and no significant difference between the two types of mesenchymal cells . In light of this , it is possible to assert that the results have demonstrated the absence of a significant difference in the osteogenic potential of mesenchymal stem cells taken from bone marrow and



adipose tissue , it is also shown that the two DBM analyzed the TBM appears to be better than the DBX both as differentiation capacity as that cell survival.

The second study is based on the study of the application of the diode laser gingival inflammation and regeneration , using low power levels (Low Level Laser Therapy) . The purpose of this research was to create a clinical protocol that can be used in dentistry. Human gingival fibroblasts were isolated from human gingival connective tissue , and plated in multiwell HYAFF biomaterial based on hyaluronic acid and irradiated with the laser diode at different power (1 W -24 mW) and different playing time (10 minutes - 75sec) . At the end of the day, at 24 and 48 h, the test was performed MTT (cell viability) and RT -PCR for the change of gene expression of genes of Collagen I and Fibronectin . From the MTT assay showed that the cells treated with the laser - with a power that varies between 24 mW and 110 mW, and a playing time that varies from 75 sec to 300 sec - express a cell viability greater compared to CTRL . These results were also confirmed by RT-PCR, in which there is an increase in gene expression of genes of Collagen I and Fibronectin than cells irradiated with a power ranging between 24 mW and 110 mW, and a playing time that varies from 75 sec to 300 sec . Consequently, it is possible to argue that a clinical protocol that could be used in dentistry is a low power ranging between 24 mW and 110mW, and a playing time ranging from 75sec to 300sec.

The third research aims to study the in vivo effect of collagenase *Vibro Alginoliticus* on fibroproliferative disease of *Dupuytren's hand*. *Dupuytren's disease* is characterized by formation of a fibrotic cord sull'aponevrosi hand facial consisting of collagen I , but especially from collagen III . The fibrotic cords were taken to the operating room (Aponeverctomia Regional), transported to the laboratory , cut into pieces 5 mm , in each of which were injected with 20 uL collagenase. Some samples were subjected to mechanical actions of compressions vertical and longitudinal distensions ; subsequently, they were injected with 20 uL of collagenase , other samples were treated with the addition of 20 uL EDTA , for the presence of spots of calcifications observed thanks to Mallory Azan staining and confirmed by IHC for Osteopontin . 3-6-12-24-30 hours have been applied to the common histological techniques (Azan Mallory , IHC collage I, III and Collogene Osteopontin) . It was used, in addition, the semi-quantitative analysis of collagen III with ImageJ Software. Histologic analysis demonstrated a reduction of Collagen I and III in all samples treated with collagenase and the dissolution of the nuclei of calcification in those samples treated with EDTA . The semiquantitative analysis of Collagen III showed a progressive decrease of the signal of Collagen III at increasing time intervals and an increase in the effectiveness of the use of collagenase if the samples undergo the mechanical treatments and the addition of EDTA . Thus, the collagenase *Vibro Alginoliticus* could be an option to non-surgical therapy of fibroproliferative diseases of the bands .

# Introduzione

## BREVE STORIA DELLE BIOTECNOLOGIE:

### L'ipotesi dei "fermenti"

Con il termine "**biotecnologia**" si indica l'utilizzazione in modo programmato di sistemi biologici per la produzione di beni e servizi. I sistemi biologici possono essere costituiti da organismi interi, singole cellule (eucariotiche o procariotiche) o loro componenti molecolari (enzimi). In questa definizione sono comprese tecnologie produttive antichissime (biotecnologie tradizionali) che hanno accompagnato l'uomo fin dai tempi più remoti. Ad esempio la vinificazione dell'uva , che è un processo biotecnologico, veniva conosciuto e applicato fin dai tempi biblici, senza che nessuno però lo capisse. Tentativi di spiegare alcuni fenomeni come la trasformazione del vino in aceto furono affrontati da una nutrita schiera di studiosi di **alchimia**, ma la comprensione di questi fenomeni non andava al di là dell'ipotesi dell'esistenza di fantomatici "**fermenti**" che avevano queste strane proprietà trasformanti. Comunque le numerose osservazioni, prove e ricerche degli alchimisti contribuirono allo sviluppo della **chimica** che sorse verso la fine del '700.

### La svolta della seconda metà dell'800

Nel 1856 fu chiesto a un giovane chimico francese , **Louis Pasteur** (vedi immagine) di trovare un modo per evitare l'acidimento di grandi quantità di vino che generalmente avveniva durante la fermentazione dl mosto. Pasteur identificò e isolò l'agente responsabile della trasformazione del mosto in vino: un organismo unicellulare chiamato **lievito**. Il merito più grande di questo scienziato non fu solo ovviamente la soluzione del problema del vino, ma nel fatto che il suo lavoro era stato condotto con metodi scientifici, e non provando a caso o fidandosi della tradizione. Egli poneva finalmente le biotecnologie su rigorose basi razionali e scientifiche. La seconda metà dell'800 è ricca di scoperte e intuizioni basilari per la biotecnologia moderna: **Mendel** formula le leggi

fondamentali della genetica e poi **Miescher** scopre l'esistenza di **acidi nucleici** nelle cellule.

## **Il Novecento**

Il Novecento si apre con la produzione industriale di lievito ottenuto mediante la **fermentazione aerobica**. La storia delle biotecnologie del ventesimo secolo inizia con la seconda guerra mondiale, periodo in cui c'era l'urgenza di produrre qualcosa di disponibile in grande quantità per curare i numerosi feriti. Questa necessità portò alla collaborazione di scienziati e ingegneri per sviluppare il processo di produzione della **penicillina**, l'antibiotico scoperto già nel 1928 a Londra da **Alexander Fleming**, (vedi immagine) il quale aveva capito che una muffa (*Penicillium Notatum*) produceva una sostanza che impediva ai batteri di crescere. Egli trovò infatti che in una coltura di stafilococchi, inavvertitamente esposta all'aria, si era sviluppata una muffa verdastra attorno alla quale le colonie batteriche erano scomparse. Nello stesso periodo iniziano ad essere condotti in **condizione sterili** i processi biotecnologici per la cultura massiva di organismi microbici; queste tecniche eliminavano il rischio di contaminazione da parte di altri organismi. Fra i prodotti ottenuti in condizioni sterili ricordiamo gli **amminoacidi**, gli **acidi organici**, gli **enzimi**, gli **steroidi**, i **polisaccaridi**, gli **anticorpi monoclonali**, i **vaccini** e gli **antibiotici**.

## **Le Nuove Scoperte Del Dopoguerra**

Nel 1953, **Watson** e **Francis Crick** (vedi immagine) concepiscono un modello di DNA a doppia elica che permette di ipotizzare il meccanismo della duplicazione del materiale genetico, ponendo così le basi molecolari dell'ereditarietà.

Nel 1963 **Edward L. Tatum**, fondatore della "**genetica biochimica**" suddivide l'ingegneria genetica in tre categorie principali per modificare gli organismi:

- **Eugenica** (ricombinazione di geni esistenti);
- **Ingegneria genetica** (produzione di nuovi geni per un processo di mutazione diretta);
- **Ingegneria Eufenica** (modificazione o controllo dell'espressione genetica).

Alle tecnologie "classiche" si affiancano biotecnologie innovative in cui vengono utilizzate tecniche di manipolazione del materiale genetico (ingegneria genetica) con numerose applicazioni in campo scientifico e industriale.

## **Gli anni '60 e '70**

Negli anni '60 si sapeva che nei batteri vi erano degli enzimi specificatamente preposti alla riparazione del DNA e che tali enzimi erano anche impiegati nel processo di **ricombinazione genetica** che consente l'inserimento di materiale genetico virale nel DNA di un batterio. Viene scoperto, infatti, il processo di riparazione per "taglio e rattoppo" di lesioni a carico del DNA da **Setlow**. Degli enzimi di restrizione, nucleasi, tagliano la parte di DNA lesionata per azione di raggi ultravioletti, poi l'enzima DNA polimerasi inserisce i nucleotidi complementari che vengono fissati dall'enzima DNA ligasi. E' così che verso la fine degli anni '70, nasce l'ingegneria genetica, che, sfruttando la tecnica del **DNA ricombinante**, (vedi immagine) permette di creare nuove molecole di DNA attraverso l'unione di frammenti di DNA provenienti da specie diverse. Solitamente uno dei due frammenti di DNA che viene unito rappresenta il gene che interessa e l'altro un semplice vettore. Questa molecola di DNA ricombinante risultante può essere introdotta in cellule batteriche e quindi fatta riprodurre in migliaia di copie identiche (clonazione genica). Nel 1972 viene ottenuta la prima ricombinazione da **Berg, Jackson e Symons**. Ciò viene ritenuto come l'atto di fondazione dell'ingegneria genetica.

Una volta individuato il metodo per creare un DNA ricombinante nel 1973 **Cohen, Boyer, Helling e Clang** costituiscono in vitro un plasmide ricombinante che reinserito nel batterio si dimostra biologicamente funzionante sia che vengano inseriti geni della stessa specie, sia di specie diversa e superiore, come ad esempio i geni umani. Di conseguenza diventa possibile analizzare il DNA di organismi superiori. Sempre in questo periodo vengono intraprese due strade per ottenere l'identificazione dei geni da replicare e il loro isolamento una volta che sono stati identificati e replicati: una tradizionale, cercando di risalire dalle proteine ai geni identificando gli RNA messaggeri per le proteine sintetizzate in modo abbondante, e costruendo, quindi il relativo DNA

(cDNA) con l'enzima trascrittasi inversa, oppure perseguendo la strategia della "**genetica al contrario**", clonando i geni in modo casuale per creare delle banche di cloni da esplorare con particolari tecniche che consentono l'identificazione del gene. La prima strategia viene presto abbandonata. Ha grande successo la tecnica del clonaggio, messa a punto da **David Hogness** e dalla sua èquipe ,che lavorando col genoma di *Drosophila* lo frammentano e costruiscono una banca di sequenze di DNA costituita da una popolazione batterica eterogenea, con un batterio che contiene un fago diverso, portatore di un frammento di DNA distinto. Nel 1975 **Cohen** e **Milstein** ottengono anticorpi coltivando in provetta le cellule del sistema immunitario che li producono (linfociti) opportunamente fusi con cellule tumorali di mieloma. Si ottiene così un **ibrido** che produce grandi quantità di anticorpi con caratteristiche chimiche e funzionali ben definite.

### **Gli anni '80 e '90**

Nel 1981 la Corte Suprema degli Stati Uniti decide che i microrganismi prodotti dall'ingegneria genetica possono essere brevettati. **Martin Evans** e il suo gruppo stabiliscono alcune linee cellulari prelevate da embrioni di topo nei primi stadi di sviluppo che conservano la **totipotenza**. In questo modo è possibile riprodurre animali chimerici costituiti da cellule con diversi patrimoni genetici, ma di solito della stessa specie. Negli anni '90 vengono utilizzati **anticorpi monoclonali** per guidare le medicine contro il cancro fino ai tessuti cancerosi. Sempre in questo periodo abbiamo nuove varietà di piante alimentari manipolate dall'ingegneria genetica capaci di fabbricare concimi di cui hanno bisogno e di resistere alla siccità e alla malattia.

### **L'obiettivo di oggi**

Qualche anno fa ha avuto inizio il **progetto Genoma** che si è posto un obiettivo ambizioso: prendere due metri di DNA che ognuno di noi porta in ogni sua cellula, strettamente avvolti in 46 cromosomi, srotolarli e "decodificarli". Disseminati lungo la catena si trovano centomila geni umani, tutte le istruzioni che servono per costruire e tenere in vita ognuno di noi. Non solo: c'è scritto anche a quali malattie siamo predisposti, quanto a lungo possiamo vivere, che tipo di personalità abbiamo. Sulla catena c'è perfino

la storia della nostra specie. Gli scienziati studiano i geni umani per ripararli in caso di malfunzionamento in modo da eliminare le malattie ereditarie. La totale conoscenza del DNA è fondamentale per capire come funziona l'organismo nei più piccoli dettagli, imparando quindi a comprendere sempre meglio i meccanismi della vita.

## **SCOPO GENERALE DELLA RICERCA**

Il presente lavoro è costituito da una struttura tripartita che assolve al duplice compito di illustrare e spiegare i plurimi benefici ricavabili dall'impiego delle biotecnologie in campo medico. La peculiarità del lavoro è quella di offrire al lettore, allo stesso tempo, uno sguardo particolareggiato e generale. E' possibile infatti, attraverso una lettura attenta delle tre sezioni, scandagliare quelli che sono stati i risultati positivi ottenuti rispettivamente dall'impiego della rigenerazione ossea -risultante dall'utilizzo di biomateriali e cellule staminali- del laser a diodi e, infine, della collagenasi Vibro Alginoliticus ma anche, con uno sforzo di astrazione ad un livello sovrastante alle singole ricerche, prefigurarsi uno scenario futuro che, permeando il campo della medicina traslazionale *in toto*, potrà vedere numerosi cambiamenti positivi nell'ambito della ricerca, ottenuti con tempistiche minori rispetto alla medicina tradizionale. Come precedentemente accennato, dunque, attraverso uno sguardo trasversale ai tre lavori, scandagliando i benefici ottenuti con l'utilizzo delle biotecnologie impiegate, ci si prefigge l'obiettivo di pervenire ad una sintesi dei risultati positivi afferenti alla branca della medicina traslazionale che, nello specifico, si sono declinati nel campo della Rigenerazione ossea, dell'infiammazione e della rigenerazione gengivale e della attività della Collagenasi di Vibro Alginoliticus nella patologia della mano "Dupuytren

# **Introduzione**

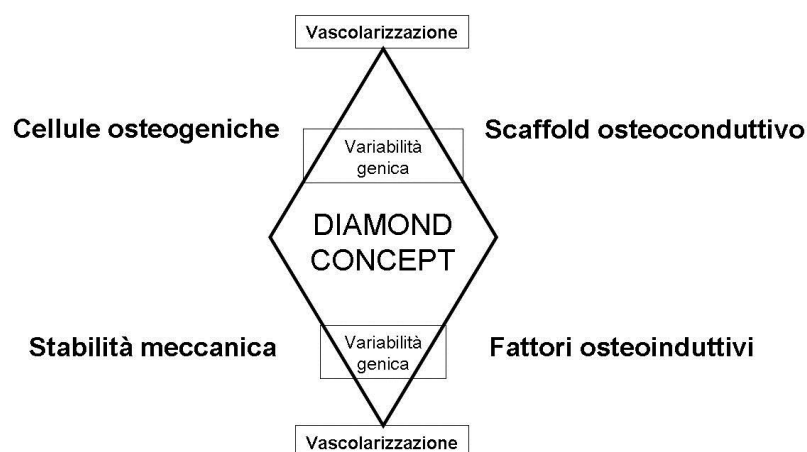
## **L'INGEGNERIA DEI TESSUTI**

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione *in vitro* di tessuti od organi, definendo una nuova branca delle scienze biomediche conosciuta come *ingegneria dei tessuti*. L'insieme di queste tecnologie rendono possibile l'espansione *ex vivo* di cellule autologhe e il loro impiego nella riparazione di lesioni e nella rigenerazione di tessuti attraverso l'uso di matrici tridimensionali biocompatibili. Modulando opportunamente le caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche di tali matrici è possibile utilizzarle come supporti per la semina, la crescita e il differenziamento di cellule autologhe al fine di rigenerare *in vitro* diversi tessuti specializzati. L'ingegneria dei tessuti permette di associare le potenzialità del trapianto di cellule viventi alla tecnologia degli organi artificiali per la realizzazione di strutture funzionali. Per questo, l'ingegneria tissutale con l'introduzione di strutture bioartificiali rappresenta un'evoluzione rispetto ai sostituti di prima generazione: organi artificiali tradizionali come protesi valvolari cardiache, pacemakers e protesi ortopediche, la cui alternativa clinica era rappresentata dal trapianto di organi da donatori. La ricostruzione *in vitro* di un tessuto o di un intero organo richiede però non solo uno studio approfondito della composizione e struttura delle matrici tridimensionali, ma anche delle forze fisiche che agiscono su di esso. Inoltre, essa necessita di conoscenze circa i fattori chimici e molecolari che regolano la crescita e il differenziamento delle cellule e dei tessuti. Si può quindi affermare che l'ingegneria dei tessuti si basa su due componenti principali: il supporto tridimensionale e la componente biologica. Il supporto tridimensionale è rappresentato dai biomateriali, mentre la componente biologica comprende sia le cellule che i fattori molecolari.



## PRINCIPI DI RIGENERAZIONE OSSEA

Lesioni ossee possono essere dovute ad eventi traumatici, neoplasie, infezioni, malformazioni congenite e malattie degenerative [Frohlich 2008]. La rigenerazione ossea fisiologica può avvenire in modo troppo lento o inefficace e, pertanto, da lungo tempo la ricerca si è prodigata nell'identificare e sviluppare nuove metodiche in grado di accelerare e favorire tale processo. Il processo rigenerativo è multifattoriale e richiede l'intervento di vari elementi riassunti nel "Diamond Concept" formulato da Giannoudis et al. nel 2007 [Giannoudis 2007] (Figura 1):



*Figura 1: Il "Diamond Concept"*

**1) Cellule osteogeniche.** Per il processo riparativo, ovvero per la deposizione di nuovo osso, sono necessarie cellule in grado di formare tale tessuto secernendo matrice e mediandone la calcificazione. Tali cellule (osteoblasti e cellule osteoprogenitrici) possono essere reclutate fisiologicamente dalla periferia del danno o trasportate chirurgicamente tramite un innesto osseo o di midollo. [Gould SE 2000].

**2) Fattori osteoinduttivi.** Sono tutte quelle proteine e fattori di crescita che favoriscono il reclutamento delle cellule osteoprogenitrici ed il loro differenziamento in osteoblasti. Particolare importanza rivestono le interleuchine 1 e 6 (IL-1 e 6), il Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), il Fibroblast Growth Factor (FGF), il Platelet Derived Growth Factor

(PDGF), il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), l'Insulin-like Growth Factor (IGF) e le proteine della famiglia del Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in particolare le Bone Morphogenetic Proteins 2 e 7 (BMP-2 e 7). [Bolander 1992, Einhorn 1995] Normalmente queste proteine sono secrete dall'endotelio, dalle componenti cellulari dell'osso e dalle cellule della linea monocito macrofagica. [Tsiridis 2006, Tsiridis 2007]

**3) Scaffold osteoconduttivo.** Per permettere la migrazione, una maggiore sopravvivenza ed una maggiore interazione e crescita cellulare è necessaria una struttura tridimensionale (scaffold) che permetta la piena adesione delle cellule. Normalmente tale proprietà è garantita dalla matrice ossea mentre in ambito clinico essa può essere fornita da numerosi materiali (ceramiche, polimeri, DBM...) [Giannoudis 2007].

**4) Stabilità meccanica.** Per garantire la corretta formazione del callo osseo e la sua successiva mineralizzazione è necessario che i due monconi della frattura siano il più possibile vicini tra loro e stabili in modo da evitare grossi spostamenti soprattutto in senso rotatorio e laterale. Per ottenere tale stabilità si può ricorrere a metodiche non invasive quali gli apparecchi gessati, o a metodiche chirurgiche come viti, placche, chiodi endomidollari e fissatori esterni. [Augat P 1998]. Il Diamond Concept è stato poi ripreso dallo stesso Giannoudis nel 2009 rimarcando altri due concetti attualmente oggetto di alcuni studi: l'importanza della vascolarizzazione, essenziale al processo di ossificazione sia della cartilagine del callo osseo che della matrice, e la variabilità genica che potrebbe spiegare le possibili differenze nell'outcome di pazienti trattati nello stesso modo per lesioni paragonabili [Giannoudis 2008]. Tutti questi elementi vengono ripresi, singolarmente od in associazione, in svariate soluzioni tecniche che stimolano il processo rigenerativo e di cui ora vedremo una panoramica.

## **METODICHE DI RIGENERAZIONE OSSEA**

Esistono numerose classificazioni delle metodiche di rigenerazione ossea ma in questo contesto seguiremo quella di Laurencin et al. [Laurencin et al 2006], modificata da Nandi

et al. [Nandi et al 2010] descrivendo soprattutto le tecniche basate sull'utilizzo delle cellule staminali e dei biomateriali oggetto del presente studio, ovvero le matrici ossee demineralizzate e le ceramiche. (Tabella I)

Tale classificazione comprende:

- Innesti ossei e matrici ossee demineralizzate
  
- Sostituti ossei basati sulla ceramica
  
- Cellule staminali
  
- Sostituti ossei basati su fattori di crescita
  
- Sostituti ossei basati sui polimeri
  
- Altro (spugne, chitosan e corallo)

*di Tabella I: Classificazione Laurencin modificata da Nandi et al.*

CLASSE	DESCRIZIONE	PROPRIETA' D'AZIONE
Innesti Autologhi	Vengono usati generalmente da soli	Osteogenica, osteoinduttiva, osteoconduttiva
Innesti omologhi e DBM	Vengono usati soli o in combinazione con altri materiali	Osteoinduttiva, osteoconduttiva
Ceramiche	Comprendono il calcio fosfato, il calcio solfato, e altri materiali	Osteoconduttiva, parzialmente osteoinduttiva se usata in associazione col midollo osseo
Cellule staminali	MSCs, usate per generare nuovo tessuto da sole o seminate in una matrice di supporto (scaffold)	Osteogenica, osteogenica e osteoconduttiva se usate con materiali carrier
Fattori di crescita	(TGF- $\beta$ , FGF, PDGF, BMP) Naturali o ricombinanti, vengono usati soli o in combinazione con altri materiali	Osteoinduttiva, osteoinduttiva e osteoconduttiva se usati su materiali carrier
Polimeri	Si dividono in degradabili e non degradabili	Osteoconduttiva, biorisorbibile se degradabili
Altro	Corallo, chirosan, scheletro di spugne	Osteoconduttiva, biorisorbibile

## **INNESTI OSSEI E MATRICI OSSEE DEMINERALIZZATE**

Un innesto osseo è definito come il posizionamento di un pezzo d'osso sopra o all'interno di un osso danneggiato o difettoso al fine di favorire la riparazione o la sostituzione della parte mancante. Durante il processo l'innesto fornisce l'impalcatura necessaria alla formazione di nuovo tessuto. Gli innesti ossei si dividono in autologhi, omologhi (di cui per analogia di derivazione fanno parte le matrici ossee demineralizzate) ed eterologhi a seconda che il donatore sia lo stesso individuo che riceve l'innesto, un individuo geneticamente diverso ma appartenente alla stessa specie o un individuo di specie diversa [Stevenson 1999].

### **INNESTO AUTOLOGO**

#### **Proprietà**

L'innesto autologo è considerato il gold standard per la riparazione e la rigenerazione ossea poiché è dotato delle migliori proprietà osteogeniche, osteoinduttive ed osteoconduttive [Samartzis 2005] dovute alla presenza di cellule derivanti dall'osso stesso e dal midollo adiacente, da una matrice ricca di proteine e da una struttura tridimensionale che fornisce una valida impalcatura per la crescita dell'osso circostante [Bauer 2000]. Il sito di prelievo più utilizzato è la cresta iliaca in quanto ha il più alto potenziale osteogenico [Damien 1991].

#### **Vantaggi**

I vantaggi sono rappresentati da:

- una reazione immunologica scarsa o nulla
- dalla completa compatibilità istologica
- dalla grande percentuale di successo e dalla sicurezza in termini di trasmissione di malattie infettive in quanto donatore e ricevente coincidono
- rappresenta un valido supporto per i dispositivi impiantabili e, una volta incorporato e lentamente sostituito dall'osso del sito di impianto, diventa meccanicamente stabile ed efficiente [Greenwald 2001]

## **Svantaggi**

L'utilizzo dell'innesto autologo pur presentando molteplici caratteristiche favorevoli alla rigenerazione ossea, comporta anche alcuni svantaggi:

- la scarsa quantità prelevabile. [Finkemeier 2002, Putzier 2009]
- la scarsa qualità dell'osso nei pazienti con osteoporosi [Gazdag 1995]
- la procedura di prelievo caratterizzata da un aumento del tempo chirurgico, infezioni, ematomi, perdita ematica, rischio anestesilogico, cicatrice ipertrofica. [Dimitriou 2011] eventuale instabilità per frattura [Nocini 2003]. Meralgie parestesiche, aree di anestesia cutanea, dolore cronico alla cicatrice sono state riportate nel 9,4% dei casi [Weikel e Habal 1977]

## **INNESTO OMOLOGO**

### **Proprietà**

L'innesto omologo, prelevato da cadavere, mantiene le potenzialità osteoconduttive ed osteoinduttive legate all'integrità della matrice e delle proteine ivi contenute; tuttavia ha ridotte proprietà osteogeniche a causa dell'assenza di cellule vitali il che lo rende meno efficace dell'innesto autologo [Habibovic 2007].

### **Vantaggi**

I vantaggi sono rappresentati da:

- la grande disponibilità in termini quantitativi e di forma dovuta ai molteplici siti in cui è possibile effettuare l'espanto
- l'assenza di possibili complicazioni legate al sito di prelievo
- buona capacità osteoconduttiva

### **Svantaggi**

Gli svantaggi sono legati a:

- qualità ossea del donatore

- trattamenti di sterilizzazione e lavorazione del tessuto, per diminuire il rischio di trasmissione di agenti infettivi, che riducono la capacità osteogenica dell'innesto rallentando, così, il processo di neoformazione ossea. [Nandi 2010].
- costo elevato
- alcune problematiche, anche di carattere legislativo, legate al prelievo ed alla conservazione del materiale [Hofmann 1996, Farrington 1998].

## **MATRICE OSSEA DEMINERALIZZATA**

### **Proprietà**

La matrice ossea demineralizzata (DBM) è un prodotto derivato da processazione di osso da cadavere e pertanto può essere considerata un innesto omologo [Nandi 2010]. E' costituita da collagene (principalmente di tipo I ma anche IV e X), proteine non collageniche, una minima percentuale di  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (1-6%) ma soprattutto fattori di crescita e BMPs essenziali per la crescita e la rigenerazione ossea. Può essere usata al meglio in associazione a midollo autologo [Connolly 1995, Tiedeman 1995] o per aumentare il volume di spongiosa prelevata dal paziente stesso qualora fosse poca [Nandi 2010]. Poichè non possiede una struttura tale da garantire robustezza è preferibile usarla in lesioni abbastanza stabili [Tuli 1978] come cavità cistiche [Docquier 2005], ricostruzioni maxillofacciali e craniche [Damien 1994], ma può essere usata anche in difetti più ampi [Pietrzak 2005]. E' stato dimostrato che questo materiale possiede capacità osteoconduttive ed osteoinduttive attribuite ai fattori di crescita ed alle proteine contenute che vengono liberate nel processo di demineralizzazione [Peterson 2004, Katz 2009].

## **Vantaggi**

I vantaggi nell'uso di DBM sono:

- grazie ai trattamenti di demineralizzazione non provoca reazione da corpo estraneo
- non presenta problemi legati al prelievo
- è disponibile in varie forme (wafer, pasta modellabile, strip adesive, composti iniettabili)
- può essere modellata anche intraoperatoriamente secondo le necessità
- è resistente ai lavaggi intraoperatori
- viene rapidamente vascolarizzata dopo l'applicazione

## **Svantaggi**

Problemi legati all'utilizzo delle DBM sono:

- la potenziale trasmissibilità di virus (peraltro mai riportata)
- il costo
- la differente capacità riparativa tra diverse partite di prodotto, dovuta alla variabilità della qualità ossea dei donatori [Nandi 2010]

## **INNESTO ETEROLOGO**

L'osso di origine animale è stato testato per l'utilizzo quale innesto osseo ma la parziale deproteinizzazione necessaria a ridurre il pericolo di rigetto causa l'alterazione delle BMPs [Oklund 1986] determinando la scarsa capacità osteoinduttiva ed osteogenica se impiantato nei tessuti [Damian 1991].



## CERAMICHE

Numerosi sono i materiali ceramici che vengono commercializzati quali sostituti ossei.

Tra questi, HA riveste un notevole interesse.

### IDROSSIAPATITE DI CALCIO

L'idrossiapatite di calcio è una ceramica biocompatibile costituita da una miscela di HA e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in una forma altamente cristallina in rapporto 1.67. La proprietà principale di questo materiale è la sua somiglianza chimica con la parte mineralizzata dell'osso che ne garantisce l'osteconduttività [Ghosh 2008]. E' biocompatibile in quanto non è tossica e non causa risposte di tipo immunologico [Wycrota 2000]. E' considerata un eccellente veicolo per fattori di crescita osteoinduttivi e per cellule osteogeniche. Normalmente viene usata come rivestimento per impianti dentari od ortopedici migliorando ad esempio la stabilità degli steli protesici [Pommer 2002], possiede grande biocompatibilità con le cellule ma è poco solubile nei fluidi corporei ed ha proprietà meccaniche differenti rispetto ai tessuti e all'osso circostante [Santos 2007]. Miglior riassorbimento si è ottenuto addizionando manganese ( $\text{Mn}^{2+}$ ) o zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) [Irigaray 1998]. Caratteristica di HA è la porosità, molto simile a quella dell'osso spongioso. La struttura tridimensionale di tale materiale infatti è determinata da una rete cristallina di minerale che si organizza in spicole interconnesse delimitanti numerosi pori di varie dimensioni. Quelli più piccoli di 10  $\mu\text{m}$  permettono la circolazione dei fluidi extracellulari mentre quelli più grandi di 50  $\mu\text{m}$  servono da supporto per le cellule [Daculsi G 1990, Daculsi G 1988]. Il diametro ideale per fornire tale supporto varia da 500 a 565  $\mu\text{m}$  a seconda degli studi. [Gauthier O 1999, Kuhne JH 1994]

## LE CELLULE STAMINALI

Si definisce cellula staminale, una cellula che può dividersi continuamente generando cellule figlie indifferenziate (*self-renewing*) o cellule specializzate (*multilineage differentiation*). Infatti esse possono dividersi simmetricamente, per aumentare il numero di cellule staminali, oppure asimmetricamente, per mantenere inalterato il numero di cellule staminali e generare cellule progenitrici che a loro volta daranno origine a cellule mature [Bluteau G., 2008]. Generalmente le cellule staminali si dividono in Cellule Staminali Embrionali (ESC) e Cellule Staminali Adulte (ASC). Le ESC derivano dalla massa interna della blastocisti di un embrione di pochi giorni. Vengono definite cellule staminali pluripotenti poiché sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari che costituiscono l'individuo adulto. Al contrario, le ASC sono solo multipotenti perché il loro potenziale di differenziazione è limitato a particolari linee cellulari. Le ASC risiedono in diversi organi e tessuti in microambienti, denominati "nicchie di staminalità", composti da cellule eterogenee, matrice extracellulare e fattori solubili che supportano il mantenimento e l'auto-rinnovamento delle cellule staminali [Yen A, 2008]. Per questo motivo, le ASC sono anche denominate cellule staminali post-natali o somatiche. Le ASC non possono essere identificate con certezza, ma solo sulla base di proprietà indirette come l'espressione di un particolare repertorio di marcatori di superficie, il lento ciclo cellulare, la clonogenicità e lo stato indifferenziato. Il modo migliore per determinare la "staminalità" è la valutazione del *self-renewal* che si basa sull'isolamento di presunte cellule staminali e il loro successivo trapianto per poter valutare la loro capacità di ricostruire il tessuto ospite [Bluteau G., 2008]. Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) sono ASC non-ematopoietiche di origine mesodermica e neuroectodermica. Sono individuabili in molti tessuti (Tabella II) come il midollo osseo, il tessuto adiposo, il cordone ombelicale e la polpa dentale. Si differenziano in cellule di origine mesodermica come adipociti, condrociti e osteociti, ma anche in cellule appartenenti agli altri foglietti embrionali (Tabella III). Per l'appunto, è noto che le MSC possiedano un grado di plasticità maggiore rispetto ad altre popolazioni di ASC e che siano in grado di differenziarsi *in vitro* in linee cellule non-mesodermiche come i neuroni e gli astrociti.

Sembra che la loro funzione nel corpo umano sia di garantire un serbatoio di cellule riparative senza particolari caratteristiche ma recettive a segnali che possano guidarle a differenziare in linee cellulari specializzate. Il destino delle MSC può essere influenzato da segnali di diversa natura: da danni tissutali quali, traumi, fratture, infiammazione, necrosi e tumori, da segnali chemotattici e da segnali provenienti dal microambiente circostante [Pountos I.,2005]. Oltre alla multipotenza, le MSC godono di altre importanti qualità: possono essere amplificate facilmente in laboratorio in condizioni standard di coltura e la fonte da cui vengono isolate non sembra incontrare problemi etici.

**Tabella II: *Elenco dei tessuti dove sono state individuate le MSC e le relative referenze***

<i>Fonte</i>	<i>Referenza</i>
Stroma del midollo osseo	Jones E. A., 2002
Tessuto adiposo	Zuk P. A., 2001
Osso trabecolare	Tuli R., 2003
Cartilagine articolare	Alsalameh S., 2004
Membrana sinoviale	De Bari C., 2003
Muscolo	Young H. E., 2001
Tendini	Salincarnboriboon R. , 2003
Cordone ombelicale	Romanov Y. A., 2003
Vasi sanguigni	Abedin M., 2004
Sangue	Kuznetsov S. A., 2001
Pelle	Toma J. G., 2005
Polpa dentale	Gronthos S., 2000
Tessuti fetali	Muench M. O., 2002

**Tabella III: Elenco delle linee cellulari generate dalle MSC e le relative referenze.**

<i>Referenze</i>	<i>Fonte</i>
Osteoblasti	Jones E. A., 2002
Condrociti	Jones E. A., 2002
Adipociti	Jones E. A., 2002
Cardiomiociti	Orlic D., 2001
Fibroblasti	Ogawa M., 2006
Miofibroblasti	Ogawa M., 2006
Muscolo scheletrico	De Bari C., 2003
Tenociti	Pittenger M., 2002
Neuroni	Long X., 2005
Astrociti	Mimura T., 2004
Epatociti	Lee K. D., 2004
Cellule pancreatiche	Chen L. B., 2004

## LE CELLULE STAMINALI DA TESSUTO ADIPOSO

Il tessuto adiposo, come il midollo osseo, deriva dal mesenchima ed è caratterizzato da uno stroma di sostegno facilmente isolabile. Il tessuto adiposo potrebbe quindi rappresentare una fonte alternativa al midollo osseo per l'isolamento di cellule staminali. Attraverso interventi di liposuzione è possibile raccogliere un gran numero di Cellule Staminali del tessuto Adiposo (ADSC) che possono essere facilmente amplificate *in vitro*. Infatti in condizioni di coltura standard, senza particolari accorgimenti, le ADSC crescono rapidamente con una cinetica di proliferazione stabile [Zuk P. A., 2001].

È stato dimostrato che le ADSC, come le BMMSC, possono differenziare *in vitro* in osteociti, adipociti, miociti e condrociti, se trattate con gli specifici fattori differenziativi [Zuk P. A., 2002]. Tale plasticità conferma ulteriormente che il tessuto adiposo è costituito da una popolazione di cellule staminali multipotenti con capacità differenziative pari alle BMMSC. La staminalità delle ADSC è stata confermata dalla caratterizzazione dei marcatori antigenici CD (*cluster of differentiation*). Come le BMMSC, le ADSC esprimono sulla superficie cellulare i marcatori CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 e SH3, che insieme a SH2, è considerato un marcatore per le MSC [Haynesworth S. E., 1992]. Oltre a questi marcatori, sia le ADSC che le BMMSC esprimono STRO-1, un marcatore utilizzato per isolare le cellule progenitrici del midollo osseo [Dennis J. E., 2002]. Al contrario, le ADSC non esprimono i marcatori della linea emopoietica, CD31, CD34 e CD45. Inoltre esse sono positive al CD13 ma negative al CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104 e CD106. Le ADSC differiscono dalle BMMSC solo per l'espressione di due marcatori antigenici: CD49d e CD106. In particolare, le ADSC esprimono il CD49d ma non il CD106, mentre viceversa è stato osservato nelle BMMSC [Zuk P. A., 2002]. L'espressione del CD106 è funzionalmente associata all'emopoiesi [Levesque J. B., 2001], quindi l'assenza di espressione di questo marcatore antigenico da parte delle ADSC è coerente con la loro localizzazione in un tessuto non emopoietico.

Poiché il tessuto adiposo, come lo stroma del midollo osseo, deriva dal mesoderma non è inaspettato osservare il differenziamento delle ADSC in cellule della linea mesodermica.

Tuttavia, è stato documentato anche il loro differenziamento in cellule dal fenotipo neuronale, generando cellule con morfologia simile ed espressione di marcatori proteici simili alle cellule nervose [Franco Lambert A. P., 2009]. In conclusione, le ADSC possiedono tutte le caratteristiche tipiche delle MSC: la morfologia fibroblastoide, la capacità di formare singole colonie denominate CFU-F (fibroblastoid colony-forming units), l'espressione del tipico set di marcatori di superficie, multipotenza e la capacità di differenziare in cellule della linea mesodermica [Kern S., 2006].

## **CELLULE STAMINALI DA MIDOLLO OSSEO**

Le BMSCs sono state le prime MSCs scoperte e le più studiate. Il midollo osseo è un tessuto complesso composto da cellule staminali ematopoietiche, con la loro progenie, e da una rete stromale di tessuto connettivo composta da adipociti, cellule endoteliali e fibroblasti. Proprio da questa frazione stromale Friedenstain per primo isolò le BMSCs. [Friedenstain 1968]. Tali cellule vengono di solito isolate a partire da un aspirato midollare ma possono anche essere prelevate da una biopsia ossea o da fresatura del canale midollare come nel nostro studio. E' necessario però sottolineare come la procedura di prelievo dalla cresta iliaca, che è la tecnica di prelievo maggiormente usata in clinica, risulti dolorosa e spesso richieda anestesia spinale o addirittura generale. Rischio di qualsiasi intervento chirurgico sono ovviamente le infezioni ed è bene ricordare come quelle a livello osseo siano tra le più temibili per la difficoltà della bonifica antibiotica. Per questi ed altri motivi il midollo è prelevabile in quantità piuttosto ridotta e può risentire della variabilità individuale in rapporto a numerosi fattori, tra cui l'età, sia in termini di quantità che di qualità dell'aspirato [Auquier 1995].

In un aspirato midollare standard, che varia tra i 10 ed i 40 ml, le BMSCs umane (hBMSCs) sono solo 1 su 25000-100000 cellule nucleate, pertanto 1 ml di midollo fornisce tra le 100 e le 1000 hBMSCs [Strem 2005]. Esse vengono infatti prelevate assieme a tutte le altre componenti cellulari del midollo facenti parte delle linee di differenziazione delle serie bianca e rossa, tuttavia non esprimono i marker tipici di tali linee, in particolare risultando negative per CD11b, 14, 19, 34, 45, 79a. [Dominici 2006]. In realtà si ritiene che quelle che noi chiamiamo BMSCs siano un insieme di sottotipi di MSCs in vari stadi di differenziazione. Isolando solamente alcuni di questi sottotipi di recente individuazione si potrebbe arrivare ad espandere moltissimo la capacità di coltura, arrivando a produrre  $10^{13}$  cellule da un singolo aspirato [Colter 2000]. In coltura le BMSCs hanno un tempo di raddoppiamento di 39 ore, contro le 28 circa delle ASCs, tuttavia hanno una maggior capacità proliferativa a lungo termine anche se entrambe le colture tendono alla quiescenza dopo un certo numero di passaggi. [Tang L 2012]. Inoltre, rispetto alle ASCs hanno dimostrato una maggiore capacità immunosoppressiva nei confronti dei linfociti T. [Zhu I 2012] Le MSCs infatti possiedono un ruolo immunomodulante. Normalmente esprimono solamente l'MHC I (complesso maggiore di istocompatibilità I), ma se stimolate con  $IFN\gamma$  esprimono anche l'MHC II e, fisiologicamente richiamate nei tessuti danneggiati ed infiammati, possono bloccare la proliferazione di cellule T attivate ed indurre l'apoptosi [Plumas 2005]. Sono inoltre in grado di modulare in senso negativo i linfociti NK, i linfociti B, le cellule dendritiche e possono inibire l'espressione di ligandi costimolatori sulle cellule presentanti l'antigene (APCs). [Chen & Tuan, 2008].

# SCOPO DELLA TESI

Il seguente studio si pone tre obiettivi:

- 1) Confronto in vitro del potenziale osteogenico di cellule staminali prelevate da midollo osseo (hBMSCs) e da tessuto adiposo (hASCs).
- 2) Valutazione in vitro della capacità di due DBM (TBM e DBX) di stimolare il differenziamento in senso osteogenico di due popolazioni di cellule staminali (hBMSCs e hASCs).

## MATERIALI E METODI

### *SCAFFOLD*

#### **Composizione**

Come scaffold è stato utilizzato Orthoss<sup>®</sup>, carbonato-HA naturale di origine bovina purificata, disponibile sottoforma di granuli o di blocchetti.

#### **Struttura**

Caratteristica peculiare di Orthoss<sup>®</sup> è la struttura microscopica formata da pori di diversa misura (Figura 2):

- nanopori di 10-20  $\mu\text{m}$  che ne assicurano la capacità idrofila, la penetrazione dei fluidi biologici e quindi dei nutrienti, nonché la rimozione dei cataboliti [Bufler 2007]
- macropori di 100-300  $\mu\text{m}$ , ideali per l'homing delle cellule

#### **Caratteristiche**

La porosità di Orthoss<sup>®</sup>, oltre a permettere una migliore vascolarizzazione, ne aumenta enormemente la superficie rispetto agli altri biomateriali, rendendola praticamente equivalente a quella di un uguale volume di osso da innesto e ne conferisce la grande capacità osteoconduttiva [Thorwarth 2006]. Una volta impiantato viene vascolarizzato ed è reso partecipe al naturale processo di rimodellamento. La rigenerazione ossea è favorita rispetto a scaffold in  $\beta$ -fosfato tricalcico ( $\beta$ -TCP) grazie al più lento riassorbimento di



Orthoss<sup>®</sup>, che garantisce maggior stabilità all'impianto mantenendo il volume iniziale, ed al fatto che il  $\beta$ -TCP, degradandosi, può indurre risposte infiammatorie locali [Rumpel 2006, Hing 2007].

### **Sicurezza**

Tutte le proteine ed i componenti organici vengono eliminati dal processo di lavorazione ed il prodotto viene sterilizzato con raggi  $\gamma$ .

### **Uso clinico**

Orthoss<sup>®</sup> viene usato per riempire difetti ossei post traumatici, cavità cistiche, siti di prelievo, aiutare la guarigione di pseudoartrosi, effettuare artrodesi in chirurgia del rachide. Può essere utilizzato da solo per difetti di piccola entità o in associazione ad osso autologo o aspirato midollare come espansore di volume [Thorwarth 2006, Jaeger 2009, Jaejer 2008].



*Figura 2: Struttura porosa di Orthoss<sup>®</sup>*

## ***MATRICI OSSE DEMINERALIZZATE***

### **Accell Tbm<sup>®</sup> (total bone matrix)**

#### **Composizione**

Accell TBM<sup>®</sup> (Figura 3) è un prodotto formato al 100% da DBM umana liofilizzata in forma di fogli o di “wafer”.

#### **Sicurezza**

Il prelievo del tessuto osseo di base viene effettuato su donatori clinicamente esenti dal sospetto di patologie infettive e valutati mediante test sierologici per HIV 1 e 2, HTLV, HBV. Il prodotto finito inoltre viene sterilizzato mediante fascio di elettroni. Ad oggi non si sono riscontrati casi di sieroconversione dopo il suo utilizzo, così come per le altre DBM.

#### **Caratteristiche**

Accell TBM<sup>®</sup> è un materiale osteoinduttivo e questa sua caratteristica viene testata in vitro per ogni lotto di prodotto. Prove in vivo sull'efficacia delle DBM sono state ottenute con innesti intramuscolari in ratti atimici [Zhanf 1997, Colnot 2005]. Tale DBM può essere utilizzata singolarmente od in associazione ad innesto autologo, midollo o sangue del ricevente in proporzioni consigliate dalla casa produttrice. Può anche essere modellata intraoperatoriamente per adattarla alla necessità. Poiché non possiede una struttura sufficientemente rigida non può essere utilizzata da sola, ma necessita comunque di dispositivi di stabilizzazione.



***Figura 3: Accell TBM<sup>®</sup>***

## **DBX (Putty)**

### **Composizione**

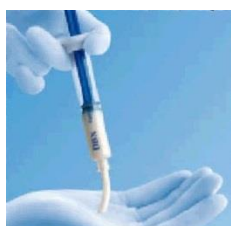
DBX è un prodotto composto da DBM proveniente da corticale ossea di cadavere. E' commercializzato in forma Putty (iniettabile), Mix (pasta modellabile associata a pezzetti di corticale) e Strip (strisce adesive associate a gelatina porcina). Per questo studio è stata utilizzata la forma Putty (Figura 4), composta da DBM (31% in peso, 93% in volume), sodio ialuronato (4%) e tampone fosfato.

### **Sicurezza**

I donatori sono selezionati e vengono esclusi i portatori di malattie infettive, cancro, malattie neurologiche degenerative, patologie ad eziologia ignota ed intossicazioni. Vengono anche effettuati test per HIV 1 e 2, HTLV, HBV e HCV ed il processo di produzione stesso, tramite passaggio in varie soluzioni, è in grado di inattivare HIV, HAV, HCV, parvovirus B19, poliomavirus ed i virus della famiglia degli Herpes. Particolare rispetto alle altre DBM è il processo di sterilizzazione che non utilizza radiazioni ionizzanti o calore, che si pensa possano influire sulle proprietà induttive [Boyce 1999], bensì è compreso nella lavorazione la quale viene effettuata in una camera bianca di grado 5.

### **Caratteristiche**

DBX è costituita da varie molecole tra cui collagene, VEGF e soprattutto TGF- $\beta$  e BMPs che ne determinano la capacità osteoinduttiva [Colnot 2005] e viene completamente rimpiazzata da osso autologo nel giro di sei mesi dall'utilizzo [Reddi 1993, Urist 1994, Wozney 1992]. Specificamente per DBX sono state effettuate prove in vivo sull'efficacia dell'osteoinduttività, sempre utilizzando topi atimici [Gerzmann 2001]. Le tre forme commercializzate permettono la scelta del prodotto più indicato per ogni situazione.



**Figura 4: DBX Putty**

Caratteristiche comuni alle due DBM, in parte già accennate nella parte introduttiva sono la consistenza modellabile, la resistenza ai lavaggi operatori e la capacità di permanenza nel sito di innesto, oltre alla possibilità di associazione a pezzi di corticale o altri biomateriali. Aspetto comune di carattere più tecnico è invece la conservazione che viene effettuata a temperatura ambiente in confezioni sterili pronte all'uso e di cui ne viene testata la capacità osteoinduttiva per ogni lotto.

**Tabella IV: Caratteristiche di TBM® e DBX**

<u>DBM</u>	ACCELL TBM®	DBX
COMPOSIZIONE	100% DBM umana	Corticale ossea umana e carrier di sodio ialuronato
PRODOTTI DISPONIBILI	Wafer	-Iniettabile (Putty) -Strips adesive -Mastice
SCREENING DONATORI	HIV1, 2, HTLV, HBV	HIV1, 2, HTLV, HBV, HCV
STERILIZZAZIONE	-Metodi di disattivazione virale durante la lavorazione ed uso di polimixina B, bacitracina, gentamicina e iodio -Fascio di elettroni su prodotto finito	-Processo di lavorazione brevettato -Lavorazione in camera bianca di grado 5

## ***PRELIEVO DI MIDOLLO OSSEO ED ISOLAMENTO DELLE***

### ***hBMSCs***

Le hBMSCs sono state isolate da midollo osseo prelevato, previo consenso informato, da una paziente settantenne di sesso femminile sottoposta ad artroprotesi d'anca elettiva per artrosi nel reparto di Ortopedia e Traumatologia di Padova. Sotto anestesia spinale si è proceduto con la rimozione della testa e del collo del femore. Il canale midollare così esposto è stato fresato e sono stati aspirati 45 ml di midollo ai quali sono stati aggiunti 5 ml di eparina sodica (5000 U.I./ml) in un Redon. Il materiale è stato poi lavato e diluito con uguale volume di soluzione salina Phosphate - Buffered Saline (PBS) e quindi centrifugato per 4 minuti a 1200 rpm. Il pellet residuo (30 ml) è stato portato a 100 ml tramite l'aggiunta di soluzione tamponata Red Blood Cells (RBC) Lysis Buffer a PH 7.2 (NH<sub>4</sub>Cl 15,5 mMol, KCl 1 mMol, EDTA 0,01 mMol) per lisare i globuli rossi e posto in agitazione per 10 minuti. Questa procedura è stata ripetuta altre due volte. Il pellet così ottenuto è stato infine sospeso in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Lonza) completo (10% Fetal Bovine Serum, 1% Penicillina Streptomicina), seminato in una fiasca F75 e posto in incubazione per 15 giorni a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>.

## ***PRELIEVO DEL TESSUTO ADIPOSO ED ISOLAMENTO***

### ***DELLE hASCs***

Le hASCs sono state isolate, previo consenso informato, da tessuto adiposo proveniente da interventi di liposuzione su cinque pazienti di sesso femminile del reparto di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva di Padova. Dopo una piccola incisione addominale è stata iniettata in loco una soluzione anestetica tipo Klein modificata tramite microcannule per infiltrazione tipo Lamis non taglienti. Il prelievo è stato effettuato attraverso la stessa incisione mediante l'uso di microcannule a punta smussa dal diametro di 3mm e di lunghezza dai 15 ai 23 cm connesse a siringhe tipo LuerLok da 10ml.

Il lipoaspirato è stato lavato con pari volume di PBS, finemente sminuzzato e digerito in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. La digestione è stata effettuata utilizzando una soluzione allo 0.075% di Collagenasi di Clostridium histolyticum tipo II (Sigma) in una soluzione Hank's Balanced Salts (HBSS, Lonza). Al termine delle tre ore l'attività collagenasica è stata bloccata con pari volume di DMEM completo. Dopo centrifugazione per 4 minuti a 1200 rpm il pellet è stato lavato in PBS e filtrato con un filtro da 70 µm (BD Biosciences) per eliminare i residui della digestione. In seguito è stato sospeso in terreno DMEM completo e posto in incubazione per 15 giorni a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>.

## **CARATTERIZZAZIONE DI STAMINALITA' MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA**

Al fine di valutare l'espressione dei marker di staminalità mediante immunofluorescenza, le cellule isolate sono state seminate su un vetrino al primo passaggio, fissate con formalina 3,8% e trattate per 30 minuti con sieroalbumina bovina (BSA) 1% per bloccare i siti specifici. Successivamente i vetrini sono stati posti in incubazione a 37°C per 1 ora con l'anticorpo primario anti-CD73 umano (Abcam), anti-CD90 umano (Abcam), anti-CD 105 umano (Santa Cruz) prodotti in coniglio, anticorpo primario anti-fibroblasti (Abcam) prodotto in topo e anticorpo primario anti-CD34 umano coniugato a Fluoresceina Isotiocianato (FITC, Macs). Al termine si è proceduto ad una seconda incubazione a 37°C per 1 ora con gli anticorpi primari ed i rispettivi anticorpi secondari: capra anti coniglio coniugati a Tetrametilrodamina Isotiocianato (TRITC, KPL) e capra anti topo coniugati a FITC (KPL).

## ***TEST DI ESCLUSIONE AL TRYPAN BLU E SEMINA SU***

### ***SCAFFOLD 3D IN PRESENZA DI DBM***

Al raggiungimento della confluenza al 15° giorno le hBMCs e le hASCs sono state staccate dalle fiasche con una soluzione contenente 0,25% di tripsina e 0,02% di EDTA. Dopo una breve agitazione manuale è stato aggiunto DMEM completo e le cellule sono state centrifugate per 4 minuti a 1200 rpm. I pellet sono stati risospesi in DMEM completo e sono state quindi contate le cellule vitali mediante il test di esclusione al Trypan Blu. Sono stati aggiunti 20 µl di sospensione con le cellule a 80 µl di Trypan Blu per ogni coltura. Tale test sfrutta la capacità del colorante Trypan di colorare in blu le cellule morte e di non colorare le cellule vitali. Ciò è reso possibile dal fatto che la membrana cellulare delle cellule vive è integra ed impedisce il passaggio del colorante. Si è quindi proceduto alla conta al microscopio ottico delle cellule vitali poste su una cameretta di Burker. Tali cellule, noto il quantitativo di materiale usato per il test, è proporzionale al numero di cellule per il volume di coltura. Si è in questo modo risaliti ad una stima del quantitativo totale delle cellule per ciascuna coltura.

Si sono quindi seminate le cellule su uno scaffold 3D di Orthoss® ad una densità di  $10^6/\text{cm}^2$  in terreno non differenziativo DMEM completo con l'aggiunta di TBM® e DBX ottenendo quattro distinte popolazioni cellulari:

- 1) hBMSCs + Orthoss® + TBM®
- 2) hBMSCs + Orthoss® + DBX
- 3) hASCs + Orthoss® + TBM®
- 4) hASC + Orthoss® + DBX

Le cellule sono state lasciate proliferare e differenziare in incubazione a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub> per 28 giorni rinnovando il DMEM ogni due giorni.

## ***PROLIFERAZIONE CELLULARE SU SCAFFOLD 3D E TEST***

### ***MTT***

La proliferazione cellulare è stata valutata al ventottesimo giorno mediante Test MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2YL-2,5-bromuro diphenyltetrazolium). Tale test misura quantitativamente l'attività della succinico deidrogenasi (SDH) che risulta attiva solamente nei mitocondri delle cellule vitali. Esso si basa sulla conversione da parte dell'enzima del sale di MTT (giallo) in sali di Formazano (blu); la concentrazione misurata spettrofotometricamente risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vive. Dopo l'aspirazione del surnatante e lavaggio con PBS e nuova centrifugazione, i pellet sono stati addizionati con 1 ml di soluzione con MTT (0,8 mg/ml in PBS) e posti in incubazione per 3 ore. Al termine, eliminato il surnatante, ogni scaffold è stato trasferito in una Eppendorf con l'aggiunta di 0.5 ml di soluzione estraente per MTT (10% dimetil sulfossido e 90% isopropanolo). A questo punto le Eppendorf sono state vortexate vigorosamente per 5 minuti per permettere la fuoriuscita dallo scaffold della soluzione di MTT che è stata posta in incubazione e poi centrifugata per altri 5 minuti a 14000 rpm. Il surnatante ottenuto è stato utilizzato per la lettura con lo spettrofotometro a 570 nm.



## ***RT-qPCR***

La differenziazione in senso osteogenico è stata verificata valutando l'espressione genica di alcune proteine tipiche della matrice ossea mediante Real Time Polymerase Chain Reaction quantitativa (RT-qPCR) su termociclatore Rotor Gene™ 3000A (Corbett Research, Australia).

### **ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA**

L'estrazione dell'RNA dai campioni è stata effettuata utilizzando una soluzione monofasica a base di fenolo e guanidina isotiocianato, il TRIzol® Reagent (Invitrogen). Tale soluzione causa la lisi delle membrane cellulari e l'inibizione delle RNAasi, garantendo così l'integrità dell'RNA. 1 ml di TRIzol® Reagent è stato addizionato ad ogni microprovetta contenente i campioni ed incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio, si è effettuata un'agitazione vigorosa per 30 secondi ed una nuova incubazione per 2 minuti. I campioni sono stati poi centrifugati per 15 minuti a 14000 rpm a 4°C ottenendo tre fasi: una superiore, acquosa e limpida contenente l'RNA; un'interfase centrale bianca contenente DNA; una fase inferiore rosa contenente proteine, fenolo e cloroformio. Per far precipitare l'RNA, la fase acquosa, trasferita in una microprovetta, è stata addizionata con 500 µl di isopropanolo, è stata posta in incubazione per 10 minuti e quindi nuovamente centrifugata a 14000 rpm a 4°C per 10 minuti. Il pellet ottenuto, costituito da RNA, è stato lavato con 1 ml di etanolo 75% freddo, agitato e nuovamente centrifugato a 14000 rpm a 4°C per 5 minuti. In seguito l'RNA è stato asciugato a temperatura ambiente per 10 minuti e risospeso in acqua DNAase e RNAase-free. L'RNA è stato quantificato con lo spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific), in grado di stimare la concentrazione dei campioni e la purezza da contaminanti. Lo strumento fornisce i rapporti delle assorbanze 260/280 (assorbanza RNA e assorbanza DNA) e 260/230 (assorbanza RNA e assorbanza proteine), che devono essere compresi negli intervalli tra 1,8-2 e 2-2,2 per definire i campioni di RNA privi di contaminanti.

## SINTESI DEL DNA COMPLEMENTARE (cDNA)

Il cDNA è stato sintetizzato con l'uso di M-MuLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) secondo il protocollo Invitrogen: First-Strand cDNA Synthesis Using M-MuLV RT. Tale enzima utilizza l'RNA come stampo per sintetizzare un filamento di cDNA. Per ogni campione sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA in un volume di reazione pari a 20 µl. Utilizzando provette nuclease-free sono stati mescolati:

- 500 ng di RNA totale;
- 1 µl di Oligo (dT)12-18 [500 µg/ml] (Invitrogen);
- 1 µl di dNTP Mix [10 mM] (Invitrogen);
- acqua distillata nuclease-free fino al volume di 12 µl.

Le miscele così ottenute sono state riscaldate per 5 minuti a 65°C, poi poste in ghiaccio per alcuni minuti ed infine centrifugate brevemente. A questo punto sono stati aggiunti:

- 4 µl di First-Strand Buffer 5X (Invitrogen);
- 2 µl di DTT [0,1 M] (Invitrogen);
- 1 µl di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor [40 U/µl] (Invitrogen).

Tali miscele sono state poste in incubazione a 37°C. Dopo 2 minuti di incubazione è stato aggiunto 1 µl di M-MuLV RT [200 U/µl] (Invitrogen) ed il tutto è stato nuovamente posto in incubazione a 37°C. Dopo 50 minuti si è provveduto ad inattivare la reazione riscaldando i campioni per 15 minuti a 70°C. Si è così ottenuto il cDNA che è stato conservato a -20°C fino al suo impiego come template per l'amplificazione in PCR.

## AMPLIFICAZIONE MEDIANTE RT-qPCR

La RT-qPCR è una versione avanzata della Polymerase Chain Reaction (PCR) che permette la quantificazione in tempo reale dell'amplificazione del DNA. Mediante l'utilizzo di coloranti o sonde fluorescenti viene fatta una correlazione tra l'intensità della fluorescenza e la concentrazione dei prodotti della PCR. Infatti ogni reazione di RT-PCR è caratterizzata da un accumulo di segnale fluorescente che viene definito dal Cycle Threshold (CT), ovvero il numero di cicli richiesti per ottenere un'intensità di segnale superiore al rumore di fondo del sistema. Se il DNA di partenza è in quantità elevate corrisponde un rapido incremento del segnale fluorescente e quindi un basso valore di CT. Per generare il segnale fluorescente è stato aggiunto alla miscela il colorante SYBR Green I, una cianina asimmetrica che, a causa di una modificazione conformazionale che interviene quando si lega alla doppia elica del DNA in corrispondenza del solco minore, aumenta notevolmente la fluorescenza emessa rispetto alla forma libera in soluzione.

I primers utilizzati per l'amplificazione sono specifici e sono stati selezionati utilizzando il software Primer 3.

Primers utilizzati:

OSTEOCALCIN FOR GGCGCTACCTGTATCAATGG OSTEOCALCIN REV

TCAGCCAACTCGTCACAGTC

OSTEONECTIN FOR GTGCAGAGGAAACCGAAGAG OSTEONECTIN REV

TGTTTGCAGTGGTGGTTCTG

OSTEOPONTIN FOR GAGGGCTTGGTTGTCAGC OSTEOPONTIN REV

CAATTCTCATGGTAGTGAGTTTTCC

COLLAGEN TYPE I FOR AGCTGGAAAACCTGGTCGT COLLAGEN TYPE I REV

AATCCTCGAGCACCCCTGA

$\beta$ -ACTIN FOR CCAACCGCGAGAAGATGA

$\beta$ -ACTIN REV

CCAGAGGCGTACAGGGAT

Le reazioni di RT-qPCR sono state effettuate utilizzando i primers a 300 nM ed il SYBR Green I (Invitrogen) con 2mM MgCl<sub>2</sub> effettuando i cicli riportati nella tabella IV.

CICLI	PASSAGGIO	TEMPERATURA	TEMPO
1	Denaturazione iniziale del cDNA e attivazione polimerasi (hot start, si usa un enzima che si attiva a 95 gradi per evitare che la reazione cominci prima)	95 °C	10 minuti
40	Denaturazione	95 °C	10 secondi
	Appaiamento dei primers (annealing)	60 °C	30 secondi
	Estensione	72 °C	30 secondi
1	Estensione finale	72 °C	10 minuti

I campioni di cDNA sono stati analizzati in duplicato e le soglie di fluorescenza (CT) sono state stabilite automaticamente dal software con efficienze di amplificazione per i geni studiati compresa tra il 92 e il 100%. Per ogni campione il valore CT del gene di riferimento  $\beta$ -actina è stato sottratto dal valore CT della sequenza bersaglio per ottenere il  $\Delta$ CT secondo la formula:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ gene di riferimento}} - C_{t \text{ gene interesse}}$$

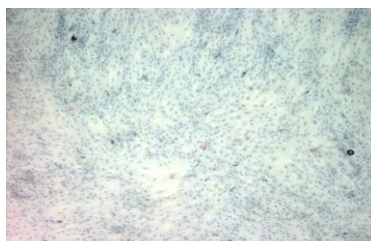
Infine il livello di espressione è stato calcolato come  $2^{-\Delta C_t}$  (dove 2 rappresenta l'efficienza di amplificazione pari al 100%) ed espresso come la media di 6 SD di campioni triplicati di due corse separate. La quantificazione dell'espressione del gene bersaglio è stata determinata in relazione all'espressione del gene di riferimento  $\beta$ -actina.

# RISULTATI

## ISOLAMENTO BMSCs e ASCs

Le hBMSCs prelevate dalla fresatura del canale femorale di una paziente di sesso femminile e le hASCs prelevate da liposuzione addominale da cinque pazienti di sesso femminile sono state isolate e poste in coltura a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub> fino al raggiungimento della confluenza dopo 15 giorni (Figura 5).

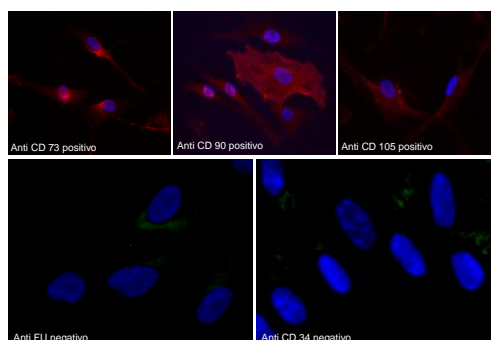
Le cellule, con la caratteristica forma simil fibroblastica, hanno aderito al supporto plastico della coltura come fu osservato da Friedenstein nel 1968. [Friedenstein 1968].



*Figura 5 : MSCs isolate e poste in coltura a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub> al raggiungimento della confluenza*

## CARATTERIZZAZIONE DI STAMINALITA' MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

In accordo con l'International Society for Cytotherapy mediante tecniche di immunofluorescenza è stata valutata la positività per i marcatori delle MSCs: CD 73, CD 90 e CD 105. Le cellule sono invece risultate negative agli anticorpi anti fibroblasti (FU) e CD 34. [Dominici et al 2006] (Figura 6)

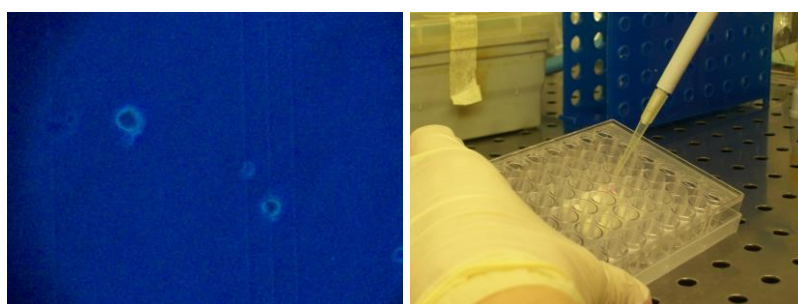


*Figura 6: Le cellule valutate all'immunoistochimica sono risultate positive a CD 73, CD 90 e CD 105;*

## **TEST DI ESCLUSIONE AL TRYPAN BLU E SEMINA SU**

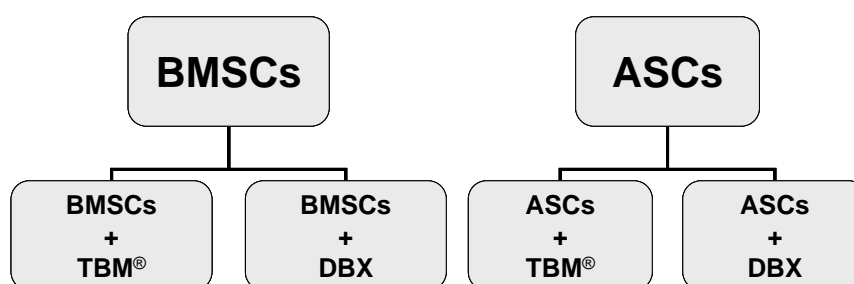
### **SCAFFOLD 3D IN PRESENZA DI DBM**

Le cellule staccate, dal supporto plastico mediante una soluzione di tripsina, sono state sottoposte al test al Trypan Blu e contate in una cameretta di Burkler. Dal numero di cellule contate si è effettuata una proporzione per ottenere la stima del quantitativo totale di cellule per ogni coltura. Un quantitativo stimato di circa  $10^6/\text{cm}^2$  è stato seminato in pozzetti, con terreno non differenziativo DMEM completo, assieme alle due DBM e allo scaffold di Orthoss<sup>®</sup>. (Figura 7)



*Figura 7: Sulla sinistra: Test al Trypan Blu. Tale test sfrutta la capacità del colorante Trypan di colorare in blu le cellule morte. Si rendono così evidenti le cellule vitali che possono essere facilmente quantificate mediante conta alla microscopia ottica una volta poste su una cameretta di Burkler. Sulla destra: semina delle cellule nei pozzetti con terreno non differenziativo DMEM completo, Orthoss<sup>®</sup> e le due DBM*

Abbiamo così ottenuto quattro linee cellulari secondo il seguente schema (Figura 8):



Ognuno seminato su uno Scaffold 3D di Orthoss<sup>®</sup> in terreno non differenziativo

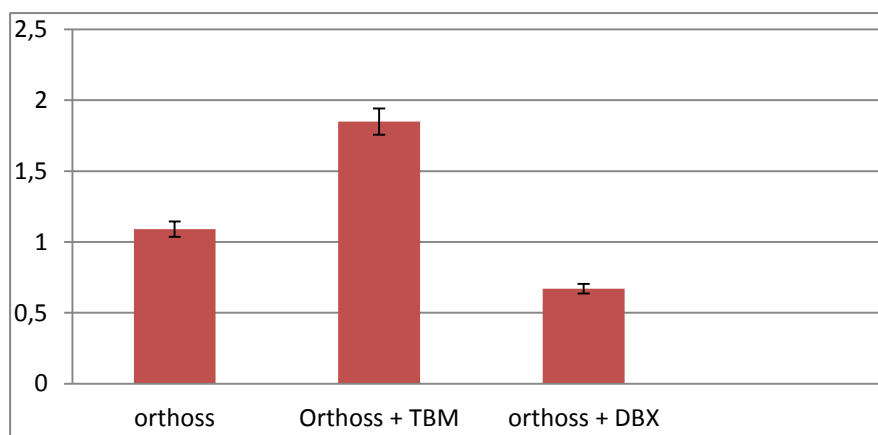
*Figura 8: Schema della semina delle cellule associate alle DBM e allo scaffold di Orthoss<sup>®</sup> in terreno non differenziativo DMEM completo*

# PROLIFERAZIONE CELLULARE SU SCAFFOLD 3D E TEST

## MTT

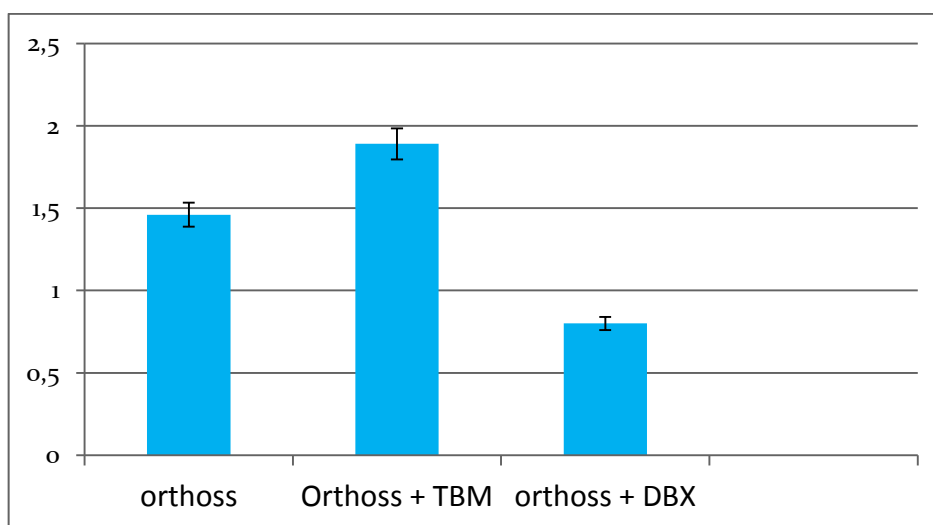
Le cellule seminate sui biomateriali sono state testate per la proliferazione cellulare a 28 giorni tramite test MTT (Grafico V-VI).

### Proliferazione cellulare BMSCs + Orthoss + DBM



*Grafico V: proliferazione cellulare BMSCs + Orthoss + DBM*

### Proliferazione cellulare hASCs + Orthoss + DBM



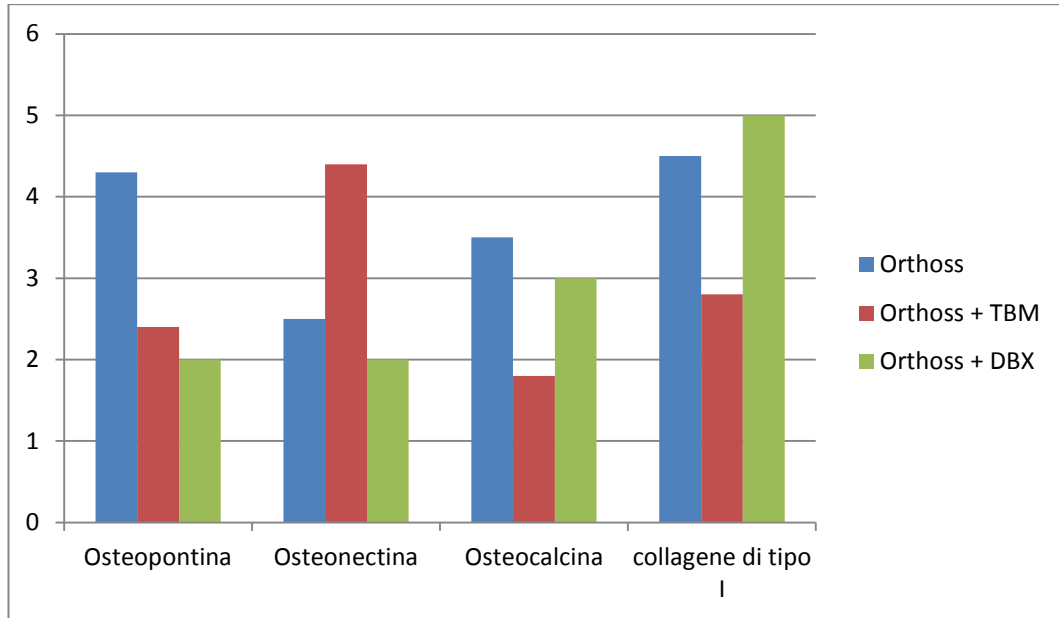
*Grafico VI: proliferazione cellulare hASCs + Orthoss + DBM*

## **RT-qPCR**

La differenziazione in senso osteogenico è stata valutata sempre al giorno 28 tramite RT-qPCR analizzando l'espressione genica di alcune proteine tipiche prodotte dagli osteoblasti. L'espressione dei geni selezionati (osteopontina, osteonectina, osteocalcina, collagene di tipo I) è stata valutata in rapporto all'espressione del gene di riferimento ( $\beta$ -actina = valore 1) nelle cellule in coltura con le due diverse DBM in terreno non differenziativo DMEM completo e scaffold di Orthoss<sup>®</sup>. Tali valori sono stati confrontati con l'espressione dei medesimi geni in una popolazione di controllo seminata su terreno non differenziativo DMEM completo e scaffold di Orthoss<sup>®</sup> senza l'aggiunta di alcuna DBM. Per quanto riguarda le hBMSCs abbiamo rilevato una significativa maggior espressione dei geni di interesse nella popolazione coltivata con TBM<sup>®</sup> ed un'espressione significativamente minore in quella coltivata con DBX rispetto al controllo senza DBM. Sovrapponibili sono i risultati ottenuti valutando l'espressione genica nelle popolazioni di hASCs (Grafico VII-VIII)

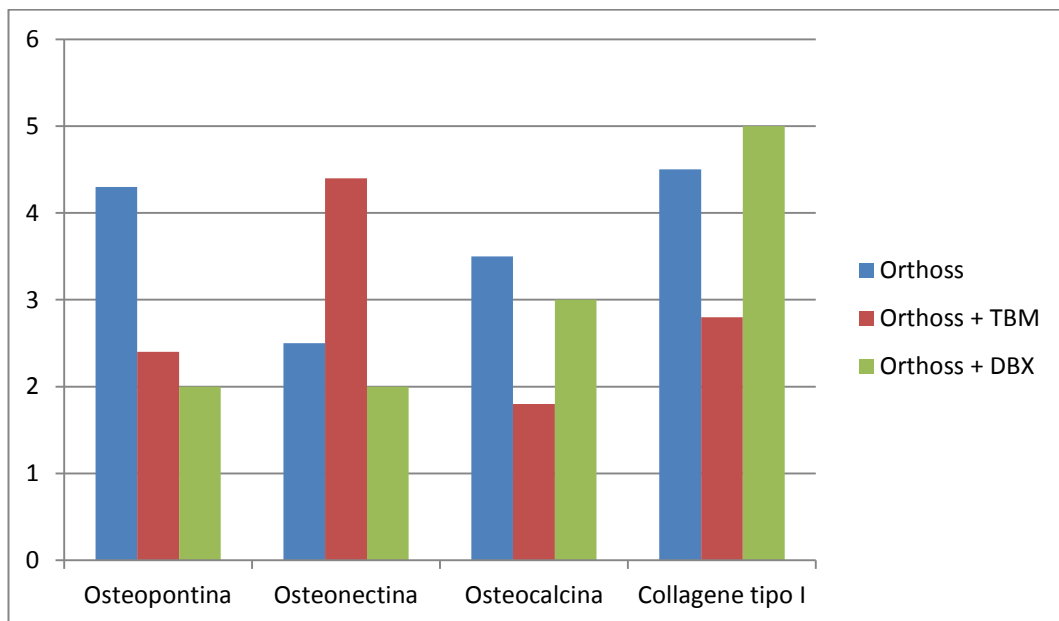


## BMSCs + Orthoss + DBM



*Grafico VII: pcr - real time BMSCs + Orthoss + DBM*

## hASCs + Orthoss + DBM



*Grafico VIII: pcr - real time hASCs + Orthoss + DBM*

# DISCUSSIONE

Questo studio è stato progettato con la finalità di comparare la capacità osteoinduttiva di due differenti DBM nei confronti di due differenti tipi di MSCs. Come DBM sono state utilizzate TBM<sup>®</sup>, composta totalmente da matrice ossea demineralizzata, e DBX, prodotto adiuvato con sodio ialuronato. Come cellule sono state utilizzate hBMSCs e hASCs. I tessuti di provenienza sono stati prelevati da pazienti previo consenso informato rispettivamente dal canale femorale e da lipoaspirato addominale. Le cellule sono state isolate tramite adesione su supporto plastico e fatte crescere in terreno non differenziativo DMEM completo. Dopo un'incubazione di 15 giorni in condizioni assimilabili a quelle in vivo, necessarie per l'espansione cellulare (37°C e 5% CO<sub>2</sub>), è stata verificata la staminalità mediante la ricerca immunostochimica dei marker CD73, 90, 105 che sono risultati positivi e Ab anti FU e CD44 che sono risultati negativi. In seguito si è proceduto con la semina delle cellule su terreno non differenziativo DMEM completo in presenza di uno scaffold di Orthoss<sup>®</sup>, supporto osteoconduttivo tridimensionale necessario per aumentare la sopravvivenza cellulare [Giannoudis 2007], e delle due DBM. Si sono ottenute così quattro linee cellulari, associando ad ogni tipo di MSCs le due differenti DBM, che sono state fatte crescere per 28 giorni in incubazione a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>:

- 1) hBMSCs + Orthoss<sup>®</sup> + TBM<sup>®</sup>
- 2) hBMSCs + Orthoss<sup>®</sup> + DBX
- 3) hASCs + Orthoss<sup>®</sup> + TBM<sup>®</sup>
- 4) hASCs + Orthoss<sup>®</sup> + DBX

Un gruppo di hBMSCs ed uno di hASCs sono state seminate su terreno non differenziativo DMEM completo in presenza del solo Orthoss<sup>®</sup>. Tali cellule, poste nelle stesse condizioni di incubazione, sono servite da controllo. Al termine dei 28 giorni è stata verificata la vitalità delle popolazioni cellulari mediante test all'MTT che ha mostrato una maggiore sopravvivenza di entrambe le linee poste in coltura con TBM<sup>®</sup> rispetto a quelle coltivate in presenza di DBX. Non sono emerse invece differenze tra i due tipi di cellule staminali impiegate.

Sempre al giorno 28 si è valutata l'efficacia dell'osteoiduzione delle DBM misurando, mediante RT-qPCR, l'espressione genica di proteine caratteristiche degli osteoblasti:

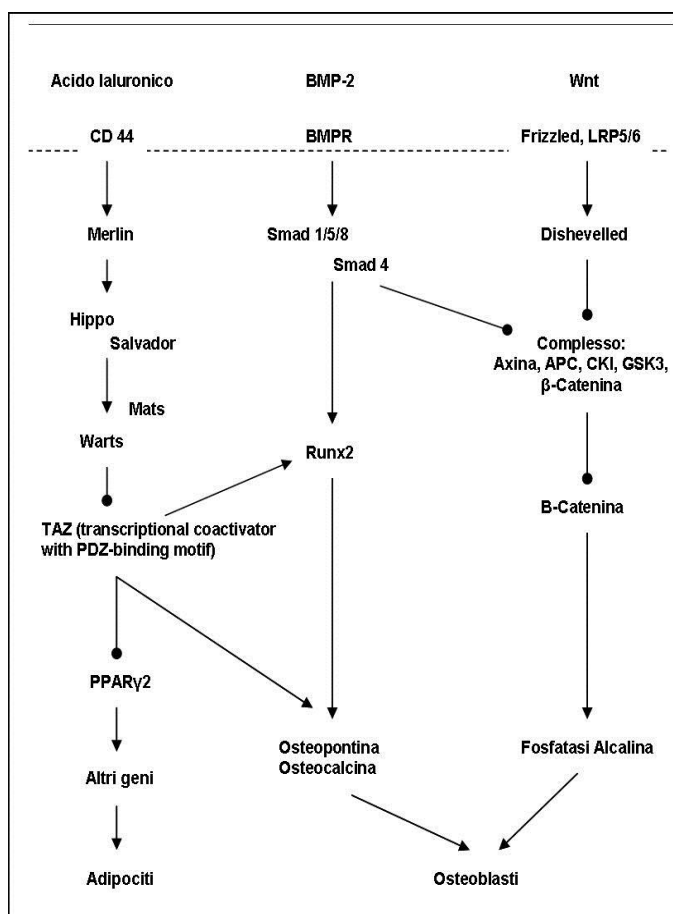
- osteopontina
- osteonectina
- osteocalcina
- collagene tipo I

L'espressione è stata valutata per ciascuna popolazione in rapporto al prodotto del gene di riferimento  $\beta$ -actina (valore 1) e confrontata con quella delle popolazioni di riferimento.

I risultati si sono dimostrati sovrapponibili tra hBMSCs e hASCs, mostrando una significativa maggior espressione genica nelle colture addizionate con TBM<sup>®</sup> rispetto al controllo con il solo Orthoss<sup>®</sup>. Significativamente meno espressi rispetto al controllo sono invece risultati i geni indagati nelle popolazioni coltivate con DBX. Ciò suggerirebbe una maggior capacità di TBM<sup>®</sup> nell'indurre una differenziazione in senso osteogenico in vitro in entrambe le linee cellulari ed una capacità osteoinduttiva del solo Orthoss<sup>®</sup> migliore rispetto all'associazione di Orthoss<sup>®</sup> e DBX. La capacità osteodifferenziativa di Orthoss<sup>®</sup> è ascrivibile alla sua struttura porosa che garantisce alle cellule un habitat estremamente simile a quello dell'osso nativo [Kouroupis D 2013].

Poiché la principale differenza tra le due DBM consiste nella presenza di acido ialuronico in DBX e poiché tale molecola in vivo si trova abbondantemente a livello del derma, abbiamo ipotizzato che la minor capacità osteoinduttiva di DBX possa essere dovuta ad un'interazione di tale molecola con il proprio recettore (CD44) espresso normalmente dalle hMSCs. [Salem HK 2010, Mitchell JB 2006]. Questa interazione potrebbe andare ad alterare il normale processo di differenziamento in osteoblasti da parte delle MSCs coltivate con DBX. Alcuni studi hanno individuato come CD44 sia implicato nella regolazione di Merlin [Maneget et al 1999], proteina che stimolerebbe positivamente Hippo [Hamaratoglu et al 2006]. Hippo, up-regolato, porterebbe ad una fosforilazione di Salvador, Mats e soprattutto di Warts [Wei et al 2007, Wu et al 2003] il quale regolerebbe l'attività di Taz (Transcriptional co-activator with PDZ - binding motif), fattore fondamentale per la regolazione della differenziazione mesenchimale [Lei et al., 2008]. Si

ritiene infatti che Taz costimoli la via di Runx2 inducendo la trasformazione delle hMSCs in osteoblasti e vada ad inibire il Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), fattore invece necessario per la differenziazione in senso adipocitico. [Hong JH et al 2005]. La stimolazione di CD44 da parte del suo ligando, l'acido ialuronico, tramite complessi meccanismi di signaling, potrebbe quindi in definitiva andare ad inibire la differenziazione in senso osteogenico. (Figura 9)



**Figura 9: Fattori di trasduzione coinvolti nel processo di differenziamento osteoblastico. Sulla sinistra l'ipotesi di inibizione da parte dell'acido ialuronico sul normale processo di differenziazione innescato dalle DBM. Le frecce appuntite rappresentano un segnale stimolatorio, le frecce tonde un segnale inibitorio**

Il fatto che la capacità differenziativa tra hBMSCs e hASCs sia risultata sovrapponibile potrebbe deporre a favore di un maggior utilizzo clinico delle seconde a causa della minor

quantità disponibile delle hBMSCs e dei rischi anestesiolgici, chirurgici, infettivi e neurologici legati al loro prelievo.

## CONCLUSIONI

In base ai risultati ottenuti da questo studio sperimentale si può concludere che:

- 1) Non vi è differenza significativa nel potenziale differenziativo in senso osteogenico tra hBMSCs e hASCs.
- 2) Tra le due DBM analizzate TBM<sup>®</sup> risulta essere migliore rispetto a DBX sia come sopravvivenza cellulare che come capacità differenziativa.

L'uso di MSCs autologhe coltivate in vitro risulta quindi promettente per il trattamento clinico dei difetti ossei di varie dimensioni riducendo le problematiche legate all'utilizzo di materiale non autologo. Vista, inoltre, l'uguale potenzialità differenziativa tra hBMSCs ed hASCs e valutati i rischi connessi alle differenti metodiche di prelievo, si può concludere che il tessuto adiposo possa essere considerato una fonte alternativa, potenzialmente meno problematica rispetto al midollo osseo, di cellule osteoprogenitrici per la rigenerazione ossea in chirurgia ortopedica.

# Bibliografia

Augat P, Margevicius K, Simon J: Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *J Orthop Res* 1998; 16: 475-481

Auquier P, Macquart-Moulin G, Moatti JP, Blache JL, Novakovitch G, Blaise D, Faucher C, Viens P, Maraninchi D: Comparison of anxiety, pain and discomfort in two procedures of hematopoietic stem cell collection: Leukocytapheresis and bone marrow harvest. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 541-547

Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 371: 10-27

Bluteau G, Luder H U, De Bari C, Mitsiadis T A. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008, 16, 1-9.

Bolander ME: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 165-170

Boyce T, Edwards J, Scarborough N: Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Ortho Clin North Am.* 1999; 30: 571-581

Bufler M: The wettability of biomaterials: comparative studies and new insights. *Osteology Monaco, International Symposium, May 10-12, 2007; Poster, Abstract No. 64.*

Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: 223

Colnot C, Romero M.D, Huang S, Helms A.J: Mechanisms of Action of Demineralized Bone Matrix in the Repair of Cortical Bone Defects. *Clinical orthopaedics and related research.* 2005; 435: 69-78

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prokop DJ: Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS* 2000; 97: 3213-3218

Connolly JF: Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 313: 8-18

Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I: Formation of carbonate apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 20-27

Daculsi G: Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1988; 19: 1473-1478

Damien CJ, Parsons JR, Prewett AB, Rietveld DC, Zimmerman MC: Investigation of an organic delivery system for demineralized bone matrix in a delayed-healing cranial defect model. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 553-561

Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991; 2: 187-208

Dennis J E, Carbillet J P, Caplan A I, Charbord P. The STRO1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. **2002**, 170, 73-82.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV: Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 2011; 42 (Suppl2): S3-15

Docquier PL, Delloye C: Treatment of aneurysmal bone cysts by introduction of demineralized bone and autogenous bone marrow. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 2253-2258

Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB: The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1272-1281

Farrington M, Matthews I, Foreman J, Richardson KM, Caffrey E: Microbiological monitoring of bone grafts: two years experience at tissue bank. *J Hosp Infect* 1998; 38: 261-71

Finkemeier CG: Bone-grafting and bone graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84A: 454-464

following hematopoietic cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor. *Blood*. 2001, 98, 1289–1290.

Franco Lambert A P, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, Pêgas Henriques J A Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation*. 2009, 77, 221-228.

Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G: Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3: 254-264

Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E: Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 28-35

Gerzmann AA, Sunwoo MH: A pilot study evaluating sodium hyaluronate as a carrier for freeze-dried demineralized bone powder. *Cell and Tissue Banking* 2001; 2: S87-S9

Ghosh SK, Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Roy SK, Basu D: In vivo response of porous hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 86: 217-227

Giannoudis P.V, Einhorn T.A, Schmidmaier G, Marsh D: The diamond concept - open questions. *Injury, Int. J. Care Injured* 2008; 39S2: S5–S8



- Giannoudis PV, Einhotn TA, Marsh D: Fracture healing: The diamond concept. *Injury, Int. J. Care Injured* 2007; 38S4: S3-S6
- Gould SE, Rhee JM, Tay BB: Cellular contribution of bone graft to fusion. *J Orthop Res* 2000; 18: 920-927
- Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN: American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg AM* 2001; 83-A (Suppl2) Pt 2: 98-103
- Habibovic P, de Groot K: Osteoinductive biomaterials - properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 25-32
- Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C, Jafar-Nejad H, Halder G: The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8: 27-36
- Haynesworth S E, Baber M A, Caplan A I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992, 13, 69-80.
- Hing KA, Wilson LF, Buckland T: Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J.* 2007; 7(4): 475-90
- Hofmann C, von Garrel T, Gotzen L: Bone bank management using a thermal disinfection system (Lobator SD-1). A critical analysis. *Unfallchirurg* 1996; 99: 498-508
- Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukov R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB: TAZ, a Transcriptional Modulator of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Science* 2005; 309: 1074-1078

Irigaray JL, Oudadesse H, Jallot LE, Brun V, Weber G, Frayssinet P: Kinetics resorption after implantation of some hydroxyapatite compounds used as biomaterials. *Advances in science and technology* 1999; 28: 399-403

Jäger M, Jelinek EM, Herten M, Krauspe R: Is Bone Marrow Concentrate Suitable To Treat Local Bone Defects? 5th International Meeting of Stem Cell Network NRW, Aachen 24-25 March 2009

Jäger M, Krauspe R: Knochenheilung durch autologe Zelltherapie. *Kompodium Orthopädie / Unfallchirurgie* 2008; 5(1): 19-20

Katz JM, Nataraj C, Jaw R, Deigl E, Bursac P: Demineralized bone matrix as an osteoinductive biomaterial and in vitro predictors of its osteobiological potential. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 89: 127-134

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

Kouropis D, Baboolal TG, Jones E, Giannoudis PV: Native Multipotential Stromal Cell Colonization and Graft Expander Potential of Bovine Natural Bone Scaffold. *J Orthop Res* 2013; Jul 19. doi: 10.1002/jor.22438

Kuhne JH, Barti R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M: Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1994; 65: 246-252

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF: Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3: 49-57

Lei QY, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, Zhao S, Xiong Y, Guan KL: TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28: 2426-2436

Levesque J B, Takamatsu Y, Hilsson S K, Haylock D N, Simmons R J. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow

*Bibliografia 93*

Mangeat P, Roy C, Martin M: ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. Trends Cell. Biol.1999; 9: 187-192

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halyorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM: Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal associated and stem cell-associated markers. Stem Cells 2006; 24: 376-85.

Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D: Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. Indian J Med Res. 2010; 132: 15-30

Nocini PF, Bedogni A, Valsecchi S, Trevisiol L, Ferrari F, Fior A, Saia G: Fractures of the iliac crest following anterior and posterior bone graft harvesting. Review of the literature and case presentation. Minerva Stomatol 2003; 52: 441-448

Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE: Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. Clin Orthop 1986; 205: 269-291

Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR: Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model. J Bone Joint Surg Am 2004; 86A: 2243-2250

Pietrzak WS, Perns SV, Keyes J, Woodell-May J, McDonald NM: Demineralized bone matrix graft: a scientific and clinical case study assessment. J Foot Ankle Surg 2005; 44: 345-53

Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC: Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. Leukemia. 2005; 19: 1597-1604

- Pommer A, Muhr G, David A: Hydroxyapatite-coated Schanz pins in external fixators used for distraction osteogenesis: a randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84A : 1162-1166
- Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*. 2005, 36, S8-S12.
- Putzier M, Strube P, Funk JF, Gross C, Monig HJ, Perka C, Pruss A: Allogenic versus autologous cancellous bone in lumbar segmental spondylodesis: a randomized prospective study. *Eur Spine J* 2009; 18: 687-695
- Reddi A.H, Cunningham N.S: Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenic proteins. *J Bone Miner Res* 1993; 8 (Suppl.2): S499-S502
- Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, Proff P: The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphologica* 2006; 65(1): 43-48
- Salem HK, Thiemermann C: Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010; 28: 585-96.
- Samartzis D, Shen FH, Goldberg EJ, An HS: Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation? *Spine* 2005; 30: 1756-1761
- Santos MH, Valerio P, Goes AM, Leite MF, Heneine LG, Mansur HS: Biocompatibility evaluation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites doped with Zn<sup>+2</sup>. *Biomed Mater* 2007; 2: 135-41
- Stevenson S: Biologie of Bone Graft. *Orthopaedics Clinics of North American*. 1999; 30: 543-52
- 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; 54(3): 132-41

Tang L, Yin Y, Zhou H, Song G, Fan A, Tang B, Shi W, Li Z: Proliferative capacity and pluripotent characteristics of porcine adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Cell Reprogram* 2012; 14: 342-352

Thorwarth M, Schlegel KA, Wehrhan F, Srouf S, Schultze-Mosgau S: Acceleration of de novo bone formation following application of autogenous bone to particulated anorganic bovine material in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(3): 309-316

Tiedemann JJ, Connolly JF, Strates BS, Lippiello L: Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix: An experimental study in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 268: 294-302

Tsiridis E, Giannoudis PV: Transcriptomics and proteomics: advancing the understanding of genetic basis of fracture healing. *Injury* 2006; 37 (Suppl): S13-19

Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P: Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 2007; 38 (Suppl1): S11-25

Tuli SM, Singh AD: The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60: 116-123

Urist MR: The search for and discovery of bone morphogenetic protein (BMP). In: *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Urist MR, O'Conner BT, Burwell RG eds. London: Butterworth Heinemann, 1994: pp 315-362

Wei X, Shimizu T, Lai ZC: Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J*.2007; 26: 1772-1781

Weikel AM, Habal MB: Meralgia paresthetica: a complication of iliac bone procurement. *Plast Reconstr Surg* 1977; 60: 572-574

Wozney JM: The bone morphogenic protein family and osteogenesis. *Mol Rep Dev* 1992; 32: S160-S167

Wu S, Huang J, Dong J, Pan D: Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003; 114: 445-456

Wykrota LL, Wykrott FHL, Garrido CA: Long-term bone regeneration in large human defects using calciumphosphate particulate. In: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Em square incorporated Publ. Toronto, Canada, 2000: pp 516-565

Zhanf M, Powers RM Jr, Wolfinbarger L Jr: A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. *J. Periodontol.* 1997; 68(11): 1076-1084

Zhu X, Shi W, Tai W, Liu F: The comparition of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 2012; 350: 277-287

Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D A, Huang J I, Mizuno H, Alfonso Z C, Fraser J K, Benhaim P, Hedrick M H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* **2002**, 13, 4279-4295.

Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, Huang J I, Futrell W J, Katz A J, Benhaim P, Lorenz H P, Hedrick M H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001, 7, 211-226.

**LOW-LEVEL LASER THERAPY: STUDIO SPERIMENTALE IN VITRO SULLA  
PROLIFERAZIONE DELLA LINEA CELLULARE FIBROBLASTICA**

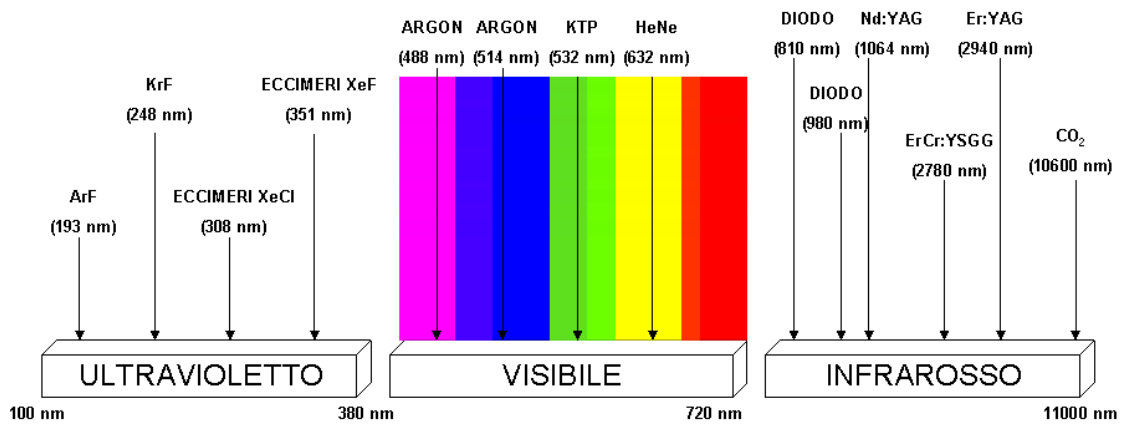
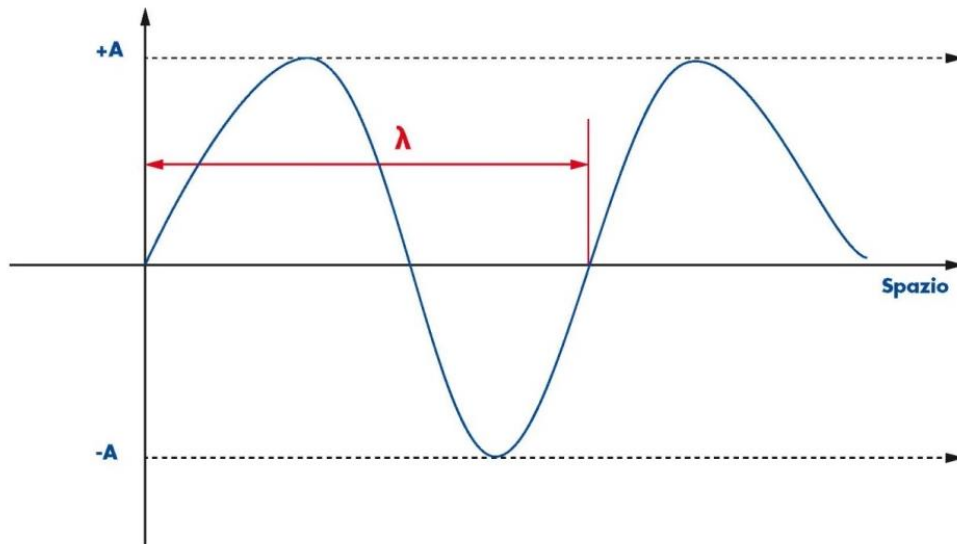
## **INTRODUZIONE**

### ***Che cos'è il Laser a Diodo?***

Il **LASER** è l'acronimo di **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation

In commercio, esistono numerosi tipi di laser che possiamo suddividere in base alle loro specifiche caratteristiche. Si potranno, quindi, classificare secondo dei criteri legati a:

- **Mezzo attivo;** Consiste in una serie di atomi o molecole i quali vengono eccitati dando luogo ad un'inversione di popolazione e, conseguentemente, ad un'emissione stimolata. Può essere solido, liquido o gassoso e da esso dipende la lunghezza d'onda di un determinato laser.
- **Spettro lunghezza d'onda;** Distanza tra due fronti d'onda contigui in concordanza di fase: coincide con la distanza percorsa dall'onda in un periodo (si misura in metri e sottomultipli) (Figura 1)



**Figura 1: Schema principali lunghezze d'onda dei laser medicali**



- **Sistema di Pompaggio;** Il sistema che viene utilizzato per ottenere l'inversione di popolazione e quindi una emissione stimolata, necessaria alla creazione di un raggio laser. Fornisce energia al mezzo attivo. Può essere ottico, elettrico oppure fornito da un altro laser.
- **Rischi connessi;** Il laser a diodi, come ogni tipologia d'apparecchiatura, non è esente da rischi. I pericoli derivano dalle caratteristiche intrinseche del raggio emesso dall'apparecchiatura, come anche dalle differenti parti del sistema che contribuiscono a creare il raggio medesimo. L'azione diretta del raggio laser può essere lesiva nei confronti degli occhi e della pelle. Dal 1976, tutti i fabbricanti di laser sono soggetti alla norma CEI 76-2 (ispirata alla direttiva originaria dell'*American National Standard Institute*, ANSI Z136.1-1976) e debbono classificare le proprie macchine con uno specifico codice di categoria - I, II, IIIA, IIIB, IV- che indica la loro pericolosità crescente. I laser a diodi rientrano nell'ultimo gruppo di classi di rischio (classe IV) e sono di conseguenza soggetti alla normativa di sicurezza più severa. I laser di classe IV, per la potenza che convogliano (> 500 mW), possono produrre gravi lesioni oculari e alla cute, anche in situazioni di fascio diffuso, e provocare incendi. A questo si deve aggiungere anche il pericolo elettrico, tipico di tutte le apparecchiature che operano con elevati voltaggi e amperaggi.

### *Com'è fatto?*

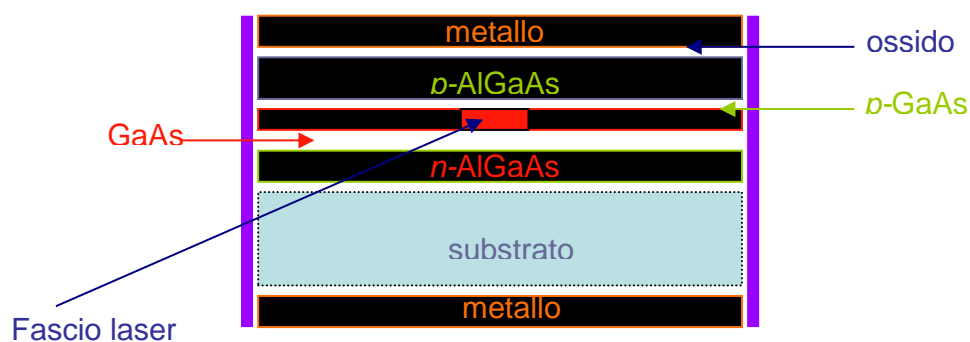
Il laser a Diodo è un semiconduttore. Non tutti i semiconduttori hanno le medesime caratteristiche: queste possono variare a seconda della qualità della componentistica e del drogaggio. I semiconduttori sono materiali la cui conducibilità è intermedia tra quella dei metalli e quella dei non metalli; hanno una resistività (indice dell'opposizione che incontrano le cariche, cioè gli elettroni, nel muoversi all'interno del materiale, come descritto nella seconda legge di Ohm) intermedia tra i conduttori e gli isolanti. Le loro caratteristiche quali resistenza, mobilità, concentrazione dei portatori di carica sono importanti per determinare il campo di utilizzo. Nei laser a diodo odontoiatrici vengono utilizzati semiconduttori estrinseci, cioè materiali che sono stati drogati con impurità: da atomi non facenti parte del reticolo cristallino per modificarne le sole caratteristiche elettriche, salvo lasciarne invariate quelle chimiche.

Si distinguono pertanto atomi detti *donori* da quelli *accettori*.

*I donori* sono quelli atomi che hanno un eccesso di elettroni e vengono rappresentati con la lettera *n*.

*Gli accettori* hanno una mancanza di carica (lacune) e sono rappresentati con la lettera *p*.

Il passaggio di una corrente elettrica tra i due poli permette un costante movimento delle cariche all'interno del mezzo attivo. Questo è il principio di funzionamento del laser a diodo, di cui viene raffigurato di seguito una rappresentazione schematica (Figura 2):



**Figura 2: Schema del wafer di un diodo Alluminio – Gallio – Arsenico (AlGaAs)**

*Il drogaggio può essere di tipo n:* l'atomo drogante ha un elettrone in più di quelli che servono per soddisfare i legami del reticolo cristallino e tale elettrone acquista libertà di movimento all'interno del semiconduttore.

*Il drogaggio può essere di tipo p:* l'atomo drogante ha un elettrone in meno di quelli che servono per soddisfare i legami del reticolo cristallino e tale mancanza o vacanza di elettrone, indicata con il nome di lacuna, si comporta come una particella carica positivamente e si può spostare all'interno del semiconduttore.

Alla luce di tali nozioni risulterà semplice per chi legge comprendere come, a seconda della qualità del semiconduttore (omogeneità) e del drogaggio, le differenze di prezzo tra prodotti dello stesso tipo (es: laser a diodo) possano essere anche sostanziali.

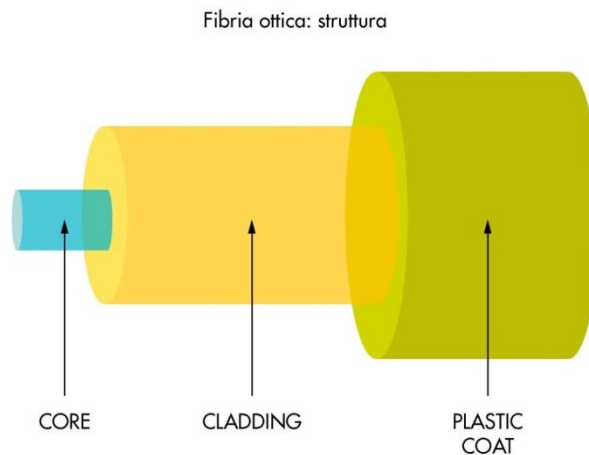
I difetti che avvengono durante il processo di produzione possono portare alla realizzazione di un dispositivo inutilizzabile. Maggiori sono le dimensioni del cristallo, più è difficile ottenere la purezza e la perfezione necessarie per una buona qualità; attualmente i processi di produzione in serie usano cristalli del diametro di otto pollici (circa 20 cm) che sono fatti crescere in forma cilindrica in laboratorio e, successivamente, ridotti in porzioni sottili dette wafer. La presenza di impurità, anche in concentrazioni molto ridotte, può causare grandi effetti sulle proprietà del materiale in toto. Per questo motivo il livello di purezza chimica necessario è estremamente elevato.

Tali caratteristiche si traducono poi in una differenza prestazionale che, ai fini clinici, può rivelarsi decisiva:

- a) in termini di efficacia di lavoro sui tessuti**
- b) efficienza in termini di durata dell'apparecchiatura nel tempo**

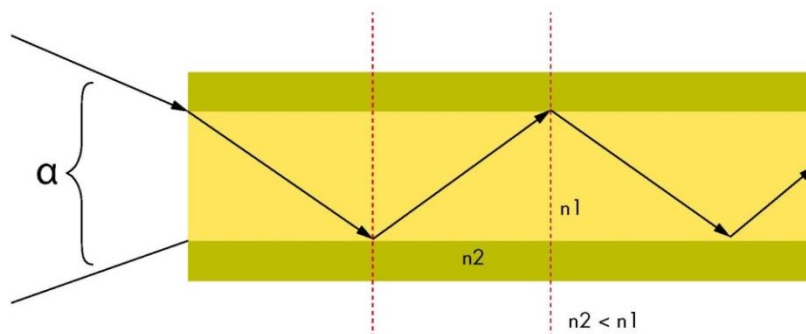
### *Come viene trasportato il raggio laser?*

Il laser a diodi è fornito con fibre da 200 $\mu$ , 300 $\mu$  e da 600 $\mu$ . Le fibre ottiche sono sottilissime fibre di vetro costituite da un *core* di circa 50 $\mu$  e circondate da un *cladding*. Esternamente sono rivestite da un materiale isolante plastico per diminuire le dispersioni ottiche e conferire resistenza alla struttura stessa (Figura 3)



**Figura 3: fibre ottiche**

La minima differenza tra i coefficienti di rifrazione ( $n$ ) dei materiali costituenti la fibra permette una conduzione del fascio di luce a “zig-zag” all’interno della fibra ( Figura 4)



**Figura 4: fascio di luce a zig-zag**

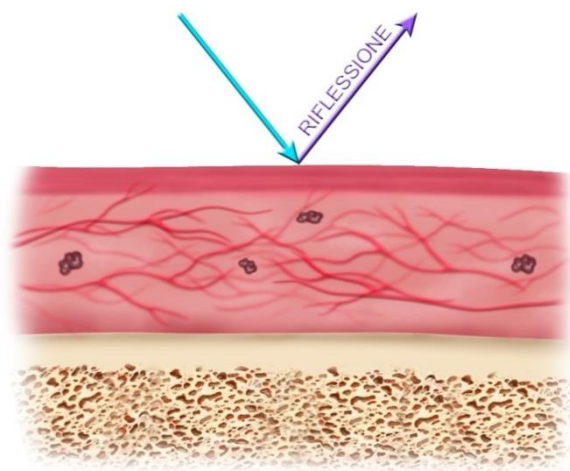
Una maggior qualità dei componenti della fibra corrisponde ad una minore dispersione del raggio, dal corpo macchina fino alla punta del manipolo. Ricordiamo che circa il 35% della perdita di efficienza in questo tipo di laser avviene proprio a livello delle fibre.

### **Come agisce?**

La radiazione laser è una luce che segue le regole della fisica ottica. Pertanto a contatto con i tessuti dà origine ai seguenti fenomeni:

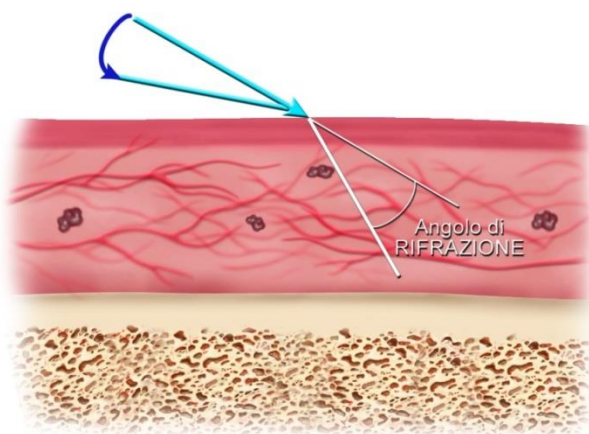
- **Riflessione**
- **Rifrazione**
- **Assorbimento**
- **Trasmissione**
- **Diffusione**

**RIFLESSIONE:** sarà totale, ad esempio, in presenza di una superficie metallica liscia (es: amalgama, corona metallica, ecc...). Quando si lavorerà sulla gengiva vicino a tali manufatti, dovremo ricordarci di schermare la superficie liscia del metallo stesso con una superficie ruvida (es.: strisce metalliche abrasive, ecc...) (Figura 5)



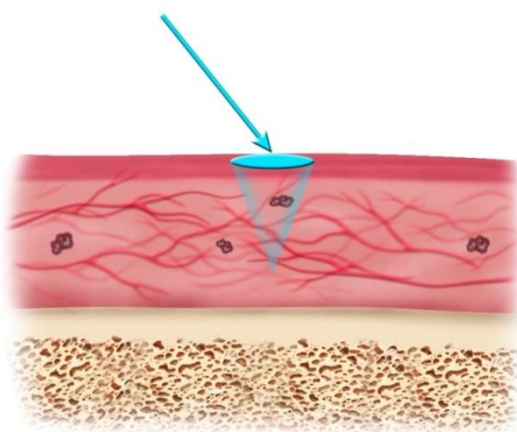
**Figura 5: Riflessione**

**RIFRAZIONE:** avviene quando un raggio attraversa due mezzi fisici a densità differente. Il raggio incidente viene deviato rispetto alla normale. In particolare, nel nostro caso, il raggio incidente viaggia in un mezzo meno denso (aria) verso uno a densità maggiore (tessuto bersaglio), per cui il raggio rifratto si avvicinerà alla normale. Anche se in termini fisici questo effetto può essere di entità trascurabile, noi consigliamo di inclinare la fibra affinché il raggio incidente sia più parallelo possibile al tessuto bersaglio; questo perché vogliamo evitare che l'effetto del raggio rifratto vada a surriscaldare i tessuti sottostanti sensibili (tessuto osseo) (Figura 6)



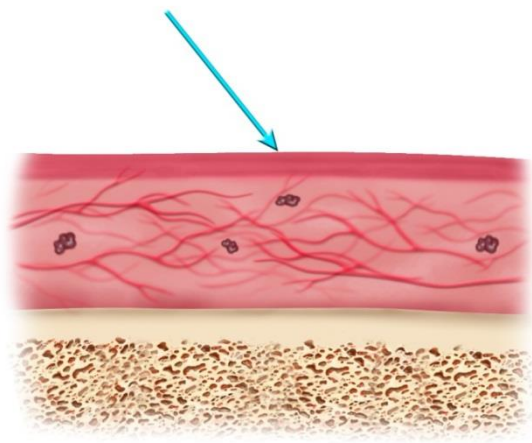
*Figura 6: Rifrazione*

**ASSORBIMENTO:** è l'effetto che desideriamo ottenere con l'utilizzo del laser (Figura7).



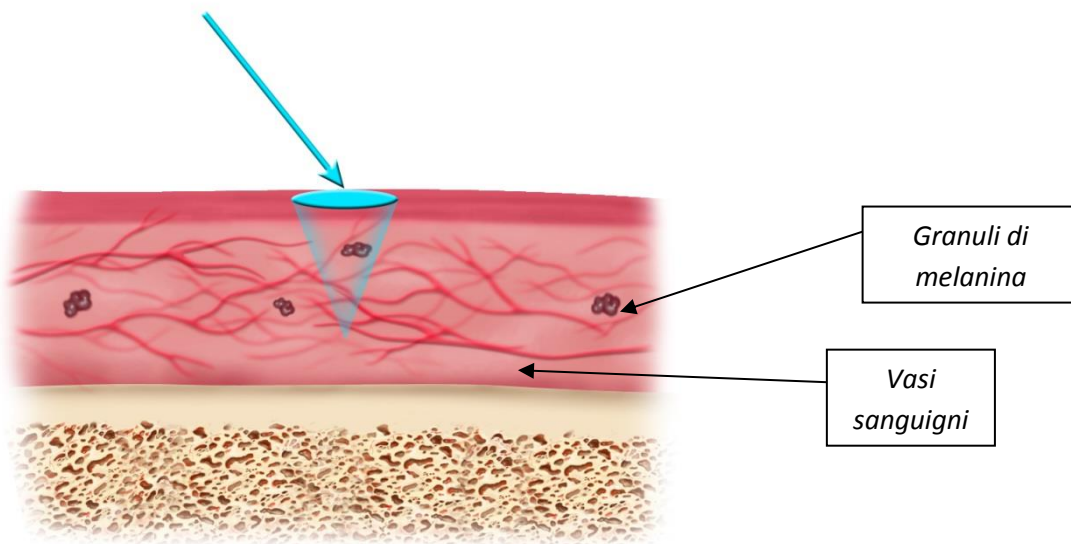
*Figura 7: Assorbimento*

**TRASMISSIONE:** è il passaggio della luce attraverso un corpo senza ottenere assorbimento. Ci piace ricordare l'esempio dell'esperimento con un albume d'uovo. Si prenda un albume d'uovo posto al di sopra di una superficie chiara e attiviamo il diodo attraverso l'albume stesso: nonostante le alte potenze impostate non si evidenzierà alcun effetto. Invece, posizioniamo sul fondo una superficie scura: vedremo che al passaggio del raggio si creerà una coagulazione dell'albume. Ciò è dovuto al cromoforo che assorbe il raggio e lo concentra, aumentando la temperatura che al passaggio crea una coagulazione proteica dell'albume (Figura 8).



*Figura 8: Trasmissione*

**DIFFUSIONE:** è un effetto sempre presente anche se non ricercato perché non controllabile. In taluni casi, però, la diffusione dell'energia all'interno dei tessuti può essere utile per ottenere un'emostasi locale. La concentrazione energetica è dovuta in particolar modo alla presenza di cromofori endogeni, cioè vasi sanguigni (emoglobina) e granuli di melanina (Figura 9)



*Figura 9: Diffusione*

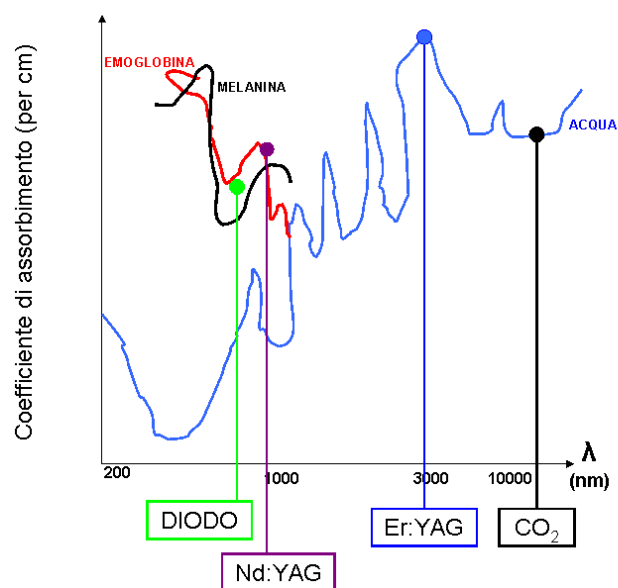
L'entità di questi effetti dipende, quindi, da:

- a) **Lunghezza d'onda del nostro laser;**
- b) **Concentrazione energetica\potenza, quindi dall'area dello *spot* data dal diametro della fibra utilizzata;**
- c) **Tempo di trattamento legata alla manualità dell'operatore;**
- d) **Tipo di superficie trattata (ampiezza);**
- e) **Caratteristiche del tessuto (gengiva cheratinizzata, mucosa, tess infiammato, tess ischemico, ecc).**

**Cos'è un cromoforo?**

Affinché si realizzi l'assorbimento del raggio laser a diodi, è necessaria la presenza sui tessuti di un cromoforo. Questo è un bersaglio molecolare di colore scuro che ha una particolare affinità di assorbimento per la lunghezza d'onda di specifica (Figura 10)





**Figura 10: Cromoforo**

L'affinità viene definita come la tendenza di due mezzi a combinarsi tra loro. Nello specifico, secondo la teoria dei Colori, ad ogni lunghezza d'onda corrisponde un preciso target molecolare che assorbe molto più delle altre sostanze i fotoni (quindi l'energia) trasportati dal raggio stesso. In medicina tali cromofori possono essere endogeni, cioè presenti nei tessuti (melanina, emoglobina, ossiemoglobina), o esogeni, cioè portati dall'esterno nei tessuti (blu di metilene, grafite, betadine, ecc). La quantità di cromoforo presente nei tessuti bersaglio aumenta l'assorbimento del raggio, di conseguenza, l'efficacia di lavoro. Per questo motivo, in clinica sarà fondamentale valutare preventivamente il tipo di tessuto su cui si agisce e la necessità o meno di usufruire dell'ausilio di un cromoforo esogeno.

### ***Low-Level Laser Therapy***

L'impiego del laser è oggi ampiamente diffuso nella pratica clinica dell'odontoiatria, in tutte le diverse specialità che la compongono. Nell'ambito dell'ortodonzia, sono ormai ben conosciuti i vantaggi offerti dalla **terapia laser ad alta intensità** nella chirurgia dei

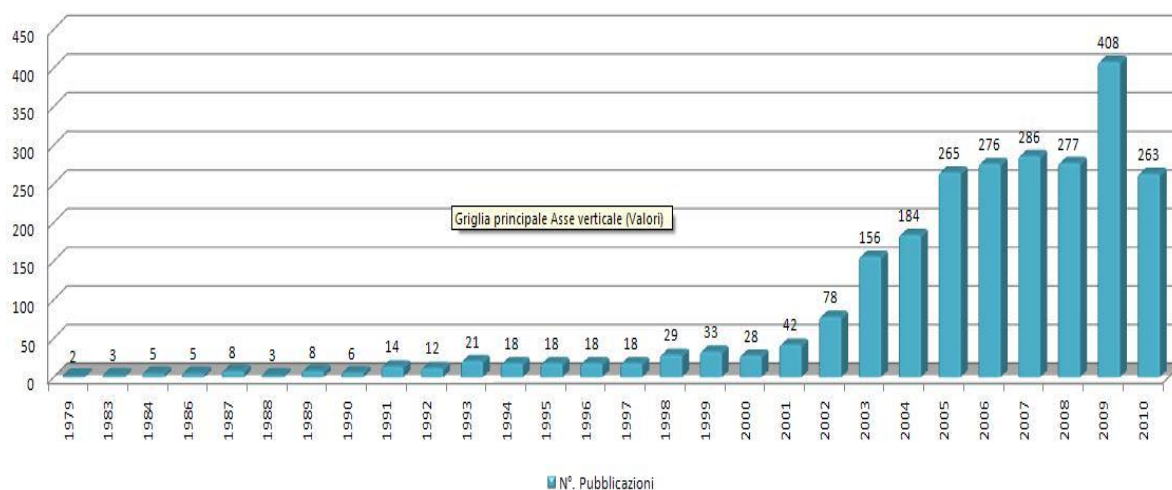
tessuti molli (recontouring gengivale estetico, esposizione di denti ritenuti o parzialmente erotti, rimozione di tessuto ipertrofico o infiammato, frenulectomie). Meno note sono, invece, le applicazioni della cosiddetta *terapia laser a bassa intensità* (Low Level Laser Therapy, LLLT), anche conosciuta come “soft laser therapy” o “fotobiomodulazione”. (Lim Am J Orthod 1995) Sotto il termine di LLLT, ormai accettato a livello internazionale, vengono racchiuse le terapie laser che si avvalgono di potenze talmente basse da non determinare aumenti di temperatura oltre il grado centigrado (1 °C) nei tessuti bersaglio. (Alghamdi Lasers Med Sci 2011; Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni) Tutto ciò in totale contrapposizione alle elevate potenze utilizzate nelle applicazioni chirurgiche ed al conseguente effetto termico che sta alla base della capacità ablativa tissutale della luce laser.

### **Cenni generali**

Per rientrare nell'ambito della LLLT devono essere rispettati i seguenti parametri: (Alghamdi Lasers Med Sci 2011)

- a. lunghezza d'onda compresa tra 600 e 1100 nm;
- b. dose compresa tra 0.04 e 50 J/cm<sup>2</sup>;
- c. potenza in uscita compresa tra 1 e 500 mW.

La LLLT è stata descritta in letteratura a partire dai primi anni '70, (Mester Am J Surg 1971) ma, nonostante l'elevato numero di articoli pubblicati in merito, emerge un'enorme eterogeneità nei parametri di utilizzo proposti (lunghezza d'onda, tempi di applicazione, frequenza, dose, potenza), fatto che rende molto difficile paragonare tra loro i diversi studi ed elaborare delle linee guida univoche che consentano una capillare diffusione della LLLT nella quotidiana pratica clinica ortodontica ( Figura 11).



**Figura 11: Numero di articoli pubblicati per anno.**

Ricerca bibliografica su PubMed dal 1980 al 2010; parola chiave: “Low Level Laser Therapy”; numero totale voci: 2486. A seguito dei primi lavori condotti da Mester, (Mester Am J Surg 1971) il quale dimostrò su ratti gli effetti benefici della LLLT sulla guarigione delle ferite cutanee, essa trovò successivamente ampia diffusione nella prevenzione e nella terapia delle mucositi indotte da chemioterapia e radioterapia in pazienti affetti da tumori della regione testa-collo. (Guzzardella Lasers Med Sci 2002; Almeida-Lopes Lasers Med Sci 2001). Gli effetti positivi della LLLT sono riconducibili proprio alle basse potenze utilizzate, le quali sono in grado di determinare specifici effetti chimici e biologici a livello cellulare e tissutale, senza nessun tipo di effetto termico.

### **Effetti della LLLT**

Le azioni della LLLT sono essenzialmente tre e da esse derivano le sue applicazioni cliniche in Ortodonzia:

- 1- azione biostimolante
- 2- azione antiflogistica
- 3- azione antalgica

L'azione *biostimolante* comprende tutta quella serie di effetti cellulari che sono alla base degli effetti rigenerativi e riparativi tipici della LLLT.

L'azione *antiflogistica* si esplica tramite l'azione della LLLT sul microcircolo, che comporta una diminuzione dell'edema a seguito di un aumentato riassorbimento a livello dei vasi linfatici nei tessuti sede di infiammazione, e tramite la ridotta produzione di alcuni mediatori dell'infiammazione. (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni)

L'azione *antalgica* si esplica sia tramite la riduzione dell'infiammazione (effetto indiretto), sia tramite un'azione diretta sul sistema nervoso (effetto diretto). (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni) Gli effetti benefici della LLLT sul dolore, probabilmente i più conosciuti, possono di utile applicazione in ambito ortodontico come metodo non invasivo e privo di effetti indesiderati nella riduzione del dolore conseguente all'applicazione di dispositivi fissi. (Xiaoting Angle Orthod 2010)

### **LLLT e biostimolazione**

Si definisce *biostimolazione* quell'azione per mezzo della quale vengono promossi, accelerati o resi possibili degli eventi biochimici e cellulari che hanno come fine il ristabilimento delle condizioni di salute dell'organo bersaglio. (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni). Il meccanismo alla base di tale processo è piuttosto complesso, ma è sostanzialmente ascrivibile alla presenza nei tessuti trattati di specifiche molecole o "*cromofori*", ossia fotorecettori quali le porfirine endogene e gli enzimi mitocondriali della catena respiratoria che sono in grado di interagire con specifiche lunghezze d'onda del laser, dando origine alla cascata di eventi alla base dell'azione biostimolante. (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni; Alghamdi Lasers Med Sci 2011)

Dal punto di vista didattico, per capire meglio il meccanismo d'azione della LLLT, è possibile distinguere gli effetti primari da quelli secondari.

### **Effetti primari**

Gli *effetti primari* sono quelli che si verificano in maniera diretta, a livello locale, nel momento in cui la luce laser colpisce il cromoforo presente nel tessuto bersaglio. L'energia assorbita ed accumulata a questo livello viene convertita in energia metabolica attraverso i citocromi della catena respiratoria, con conseguente incremento dell'energia disponibile a livello cellulare per i processi di riparazione tissutale. (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni; Alghamdi Lasers Med Sci 2011) L'azione del laser si esplica principalmente a carico della deidrogenasi per il NADH (nicotinamide adenin dinucleotide ridotto), (Yu Photochem Photobiol 1997) contenente una flavoproteina in grado di interagire con il laser, e del citocromo a/a3, (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni; Alghamdi Lasers Med Sci 2011; Karu Proc SPIE. 1995) contenente un gruppo ferro-protoporfirinico in grado di interagire con il laser. L'aumentata attività della NADH deidrogenasi rende disponibili grandi quantità di ioni idruro che facilmente trovano trasporto nella catena dei citocromi proprio per la velocizzazione realizzata nell'ultimo passaggio ad opera del complesso citocromo a/a3. (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni) Tutto ciò si traduce in un aumentata sintesi di ATP (adenosina trifosfato), favorita anche dalla produzione di piccole quantità di Ossigeno singoletto, un radicale libero in grado appunto di influenzare la produzione di ATP. (Derr Federal Proc. 1965; Kudoh Laser Therapy 1989) Le molecole di ATP generate a seguito di biostimolazione tramite LLLT si presentano quindi in grande quantità ed, anche, in una forma estremamente reattiva rispetto a quelle generate in assenza di attivazione. (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni)

## **Effetti secondari**

Gli effetti secondari si verificano, invece, in maniera indiretta tramite la stimolazione cellulare scatenata dalla liberazione di messaggeri secondari da parte delle cellule attivate in maniera diretta. Si può, inoltre, verificare un'azione a distanza dovuta al trasporto tramite il circolo ematico e/o linfatico di sostanze prodotte a livello locale dalle cellule colpite dalla luce laser. In questa categoria rientrano tutti gli eventi cellulari alla base dei processi riparativi o antalgici indotti dalla biostimolazione (alcuni esempi: aumentata proliferazione, maturazione e differenziazione dei fibroblasti, incrementata sintesi di DNA e RNA, aumentata sintesi proteica, ridotta produzione di mediatori dell'infiammazione). (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni; Alghamdi Lasers Med Sci 2011)

## **La scelta dei parametri**

I laser da biostimolazione devono avere una lunghezza d'onda compresa tra i 600 e i 1100 nm, in virtù del fatto che l'obiettivo è di attraversare i tessuti superficiali, raggiungendo gli strati più profondi. Queste lunghezze d'onda sono tipiche dei laser a diodi che lavorano nel visibile o nel vicino infrarosso (oggi i più largamente utilizzati), dei laser He-Ne che lavorano nel visibile e dei laser Nd:YAG che lavorano nell'infrarosso (1064 nm). (Cap. 16. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni). È consigliabile l'utilizzo di un manipolo defocalizzato da posizionare perpendicolarmente al tessuto da trattare al fine di ridurre al minimo il fenomeno della riflessione del raggio. L'esposizione può essere effettuata in modalità continua o pulsata, ma la potenza non deve mai essere eccessiva ed i valori devono essere compresi tra 1 e 500 mW. La dose energetica rappresenta, senza ombra di dubbio, il parametro più importante al fine di ottenere un effetto biostimolante. Essa non deve essere al di sotto di  $0.04 \text{ J/cm}^2$  e non deve superare i  $50 \text{ J/cm}^2$ , in virtù della cosiddetta "risposta dose-dipendente" della LLLT. (Alghamdi Lasers Med Sci 2011). È stato infatti dimostrato come, a parità di lunghezza d'onda, una bassa dose produca risultati migliori rispetto ad un'alta dose. In particolare, si

verificherebbe un aumento delle attività cellulari e della loro proliferazione in maniera direttamente proporzionale all'aumento della dose, fino al raggiungimento di un picco oltre il quale si determina invece un effetto inibitorio. La dose di 1 Joule corrisponde alla quantità di energia di 1 watt ceduta al tessuto in 1 secondo ( $J=W \times \text{sec}$ ). Risulta inoltre di fondamentale importanza conoscere la quantità di energia somministrata per unità di superficie trattata, sulla base della seguente formula:

$$D \text{ [J/cm}^2\text{]} = \frac{P \text{ [W]} \times t \text{ [sec]}}{A \text{ [cm}^2\text{]}}$$

Da tale formula si può anche calcolare il tempo di esposizione, conoscendo la dose da somministrare:

$$t \text{ [sec]} = \frac{D \text{ [J/cm}^2\text{]} \times A \text{ [cm}^2\text{]}}{P \text{ [W]}}$$

## SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo studio sperimentale è quello di valutare in vitro gli effetti dell'irradiazione laser a bassa intensità, avvalendosi di un laser a diodi 915 nm, sul tasso di proliferazione di fibroblasti gengivali umani (HGF) in condizioni normali ed in condizioni di infiammazione, a diversi livelli e tempi di irradiazione.

## MATERIALI E METODI

### **Colture cellulari**

Sono stati isolati fibroblasti gengivali umani (HGF) provenienti da prelievi di tessuto connettivo gengivale di esseri umani (di entrambi i sessi). I prelievi tissutali sono stati tagliati con un bisturi in piccoli frammenti di circa  $2 \text{ mm}^2$ , e successivamente immersi in una soluzione di Collagenasi di Worthington (80

U/ml), e mantenuti in incubatore per tutta la notte Il giorno successivo, l'azione della collagenasi viene bloccata con un uguale volume di terreno completo, eseguendo un'agitazione meccanica con la pipetta per 5 minuti ("spipettamento"). Le cellule ottenute vengono quindi trasferite su una fiasca da 25 cm<sup>2</sup> e coltivate in DMEM completo fino al raggiungimento della confluenza; tutto questo in incubatore a 37 °C, con una concentrazione di CO<sub>2</sub> al 5% ed una umidità relativa del 90%. I fibroblasti così isolati, possono essere mantenuti in coltura per numerosi passaggi, cambiando loro il terreno ogni 2 giorni (Figg. 3, 4, 5 e 6) e, dividendoli in rapporto 1:3 almeno due volte alla settimana, possono essere congelati (Figg. 7 e 8), oppure usati per allestire matrici simil-dermiche.

I fibroblasti umani utilizzati sono stati sia raccolti su piastre in monostrato che seminati in coltura secondaria su biomateriale. Nel primo caso, dopo aver raggiunto la confluenza, le cellule vengono staccate dalla piastra di coltura mediante trattamento con tripsina. Il terreno viene aspirato, ed il monostrato viene prima lavato con PBS<sup>-</sup> per eliminare i residui di FCS, quindi trattato con una miscela di tripsina 0,05%, EDTA 0,02%. Tale soluzione viene lasciata agire a 37°C per 5 minuti, al termine dei quali l'azione dell'enzima viene bloccata aggiungendo un uguale volume di terreno contenente FCS. Dopo avere scosso delicatamente la fiasca, il suo contenuto viene aspirato, raccolto in una provetta conica e centrifugato a 1200 rpm per 7 minuti. Il surnatante viene poi aspirato, le cellule risospese in terreno di coltura completo, contaminate e riseminate alla densità voluta. I fibroblasti umani in coltura secondaria sono stati seminati su di un biomateriale, nello specifico un biomateriale costituito dall'estere benzilico al 100% dell'acido ialuronico: materiale HYAFF 11<sup>TM</sup>. Tale biomateriale è stato usato sottoforma di non-tessuto (NW), costituito da fibre di 20 µm di spessore con peso specifico di 100 g/m<sup>2</sup>. Le cellule, più precisamente, sono state seminate ad una densità di 10<sup>6</sup> cellule/cm<sup>2</sup> su quadrati di NW11 di 1 cm<sup>2</sup> e coltivate per 15 giorni in DMEMc addizionato di acido ascorbico (50 µg/ml) e di bFGF (10 ng/ml),

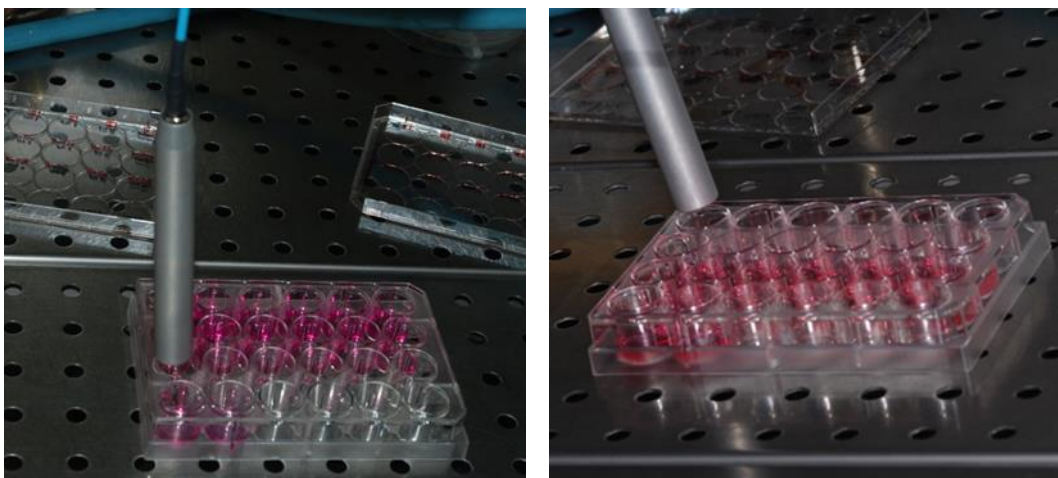


per stimolare la sintesi di matrice extracellulare. I pezzi di biomateriale erano stati precedentemente fissati al fondo della piastra di coltura con un coagulo di fibrina. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni. Dei campioni ottenuti, alcuni sono stati fissati in resina acrilica e colorati con ematossilina-eosina; altri, inclusi in OCT, congelati in azoto liquido (Fig. 9) e utilizzati per le indagini immunostochimiche. Le differenti linee cellulari sono state irradiate con laser per tempi e con impostazioni diverse, come descritto in seguito.

### **Laser e modalità di irradiazione**

Per l'irradiazione delle cellule è stato impiegato un laser a diodi ( Pocket Laser Orotig Med, Orotig srl, Verona, Italia) Al-Ga-As con lunghezza d'onda 915 nm e potenza massima di 6 W alla fibra, collegato nella fattispecie ad una fibra ottica di diametro pari 600  $\mu\text{m}$  e manipolo defocalizzato. Sono stati realizzati per l'occasione dalla ditta produttrice, dei filtri ottici da applicare al manipolo mediante supporto dedicato, allo scopo di ridurre la potenza emessa dal manipolo (secondo percentuali di riduzione calcolate) e di poter così rientrare nell'ambito della LLLT. Il dispositivo è stato tarato e controllato dall'Ingegnere responsabile (Ing. Gabriel Segalla) ogni 2 mesi durante la fase sperimentale. Sono state mantenute costanti l'area del fascio laser ( $315 \pm 10 \text{ mm}^2$  a distanza di 10 mm) e la divergenza del fascio ( 0.04 mRad).

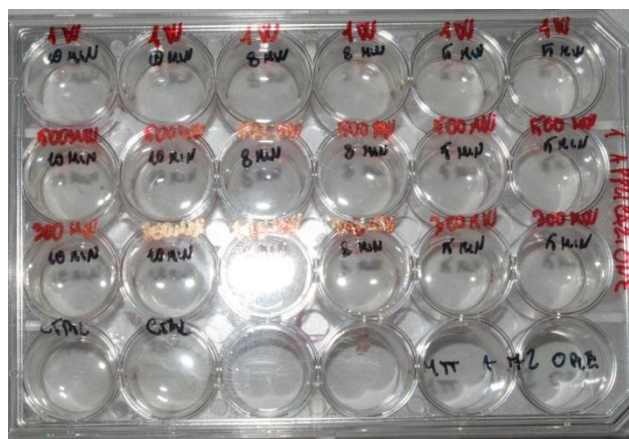
Il manipolo è stato posizionato, tramite un adeguato supporto, sopra le multiwell con il raggio laser perpendicolare rispetto ai pozzetti, a distanza di 10 mm dal fondo del pozzetto e con diametro dello spot laser di 10 mm, corrispondente esattamente al diametro del pozzetto (Figura 12 e 13).



*Figura 12 e 13. Setup sperimentale*

Gli esperimenti sono stati condotti in quattro serie:

1. dapprima è stata eseguita l'irradiazione di cellule in condizioni normali in monostrato con range di potenza e tempi di irradiazione più elevati e variabili tra di loro (1 W, 500 mW e 300 mW; 10 min., 8 min. e 5 min.), con densità energetica (per singola applicazione) massima di  $600 \text{ J/cm}^2$  e minima di  $90 \text{ J/cm}^2$ . E' stata eseguita una singola applicazione su 3 piastre multiwell ed una triplice applicazione in 3 giorni consecutivi su altre 3 piastre multiwell. Sia per la singola applicazione che per la triplice applicazione, combinando i valori di potenza e durata dell'irradiazione, sono risultate nove possibili combinazioni, ad ognuna delle quali sono stati associati 2 pozzetti di una piastra multiwell, per poter eseguire i successivi tests in duplicato. Per una multiwell sono quindi stati impegnati 18 pozzetti più 2 di controllo, all'interno dei quali le cellule non sono state irradiate (Figura 14).



*Figura 14: Piastra multiwell per test*

Come già detto, le multiwell utilizzate, sia per la singola applicazione che per la multipla, sono state 3, la prima controllata a fine giornata, la seconda a 24 h e la terza a 48 h.

2. La seconda serie di esperimenti ha previsto l'irradiazione, mediante singola applicazione, di cellule in condizioni normali in monostrato, con range di potenze e tempi di applicazione decisamente più bassi e più in linea con la letteratura riguardante la LLLT (24 mW, 110 mW e 200 mW; 75 sec., 150 sec. e 300 sec.), raggiungendo una densità di energia massima pari a  $60 \text{ J/cm}^2$  e minima di  $1.8 \text{ J/cm}^2$ .

E' stata eseguita una singola applicazione su 3 piastre multiwell. Combinando i valori di potenza e durata dell'irradiazione, sono risultate nove possibili combinazioni, ad ognuna delle quali sono stati associati 2 pozzetti di una piastra multiwell, per poter eseguire i successivi tests in duplicato. Per una multiwell sono quindi stati impegnati 18 pozzetti più 2 di controllo, all'interno dei quali le cellule non sono state irradiate. La prima piastra multiwell è stata controllata a fine giornata, la seconda a 24 h e la terza a 48 h.

3. La terza serie di esperimenti ha previsto l'irradiazione, mediante applicazione singola, di fibroblasti infiammati seminati in monostrato, con le stesse modalità, in termini di potenze, durata e numero di applicazioni, della seconda serie di esperimenti.

<b>PARAMETRI UTILIZZATI PER GLI ESPERIMENTI</b>			
<i>I SERIE</i>	<i>II SERIE</i>	<i>III SERIE</i>	<i>IV SERIE</i>
<i>1 W-10 min.</i>	<i>24 mW- 75 sec.</i>	<i>24 mW- 75 sec.</i>	<i>24 mW- 150 sec.</i>
<i>1 W- 8 min.</i>	<i>24 mW- 150 sec.</i>	<i>24 mW- 150 sec.</i>	<i>24 mW- 300 sec.</i>
<i>1 W- 5 min.</i>	<i>24 mW- 300 sec.</i>	<i>24 mW- 300 sec.</i>	<i>110 mW-75 sec.</i>
<i>0,5 W- 10 min.</i>	<i>110 mW-75 sec.</i>	<i>110 mW-75 sec.</i>	
<i>0,5 W- 8 min.</i>	<i>110 mW- 150 sec.</i>	<i>110 mW- 150 sec.</i>	
<i>0,5 W- 5 min</i>	<i>110 mW- 300 sec.</i>	<i>110 mW- 300 sec.</i>	
<i>0,3 W- 10 min.</i>	<i>200 mW- 75 sec.</i>	<i>200 mW- 75 sec.</i>	
<i>0,3 W- 8 min.</i>	<i>200 mW- 150 sec.</i>	<i>200 mW- 150 sec.</i>	
<i>0,3 W- 5 min.</i>	<i>200 mW- 300 sec.</i>	<i>200 - 300 sec.</i>	

4. La quarta ed ultima serie di esperimenti ha previsto l'irradiazione di fibroblasti in condizioni normali ed in condizioni di infiammazione non in monostrato, ma seminati su di un biomateriale (NW11); selezionando per questo esperimento i gruppi irradiazione con i risultati più significativi emersi dalle seconda e terza serie di esperimenti. Si è deciso di utilizzare un biomateriale in quanto esso viene usato come scaffold (impalcatura di supporto) ed in tal modo vengono sfruttate sia le caratteristiche meccaniche e strutturali del biomateriale, che mimano in vitro la funzione della matrice extracellulare, sia le capacità biologiche delle cellule e/o delle molecole bioattive, al fine di ottenere sostituti capaci di interagire con l'organismo ospite, vicariando funzioni carenti, o modulando fenomeni biologici come la crescita e la reattività tissutale. I biomateriali dai quali deriva il NW11 utilizzato in questo studio, sono biopolimeri semisintetici, denominati HYAFF; i quali presentano una buona stabilità ed una notevole capacità di interagire con molecole polari. Essi possono essere elaborati secondo varie tecniche di tessitura dando origine a diversi tipi di manufatti quali garze, spugne, microsfeere, granuli, membrane, feltri di tessuto non tessuto (non-woven o NW), ognuno con caratteristiche diverse e con diversa idoneità a seconda delle specifiche esigenze nel settore biomedico.

## **Protocollo di infiammazione**

Per indurre l'infiammazione dei fibroblasti seminati in monostrato e su di un biomateriale si è utilizzato il tumor necrosis factor alfa ( TNF- $\alpha$  ), il quale rappresenta una citochina proinfiammatoria principalmente prodotta dall'attivazione dei monociti e macrofagi in risposta alle infezioni, insulti e tumori. La produzione del TNF- $\alpha$  è dovuta anche ad un altro tipo di cellule coinvolte nel processo infiammatorio come le cellule T, NK e NEUTROFILI. Il TNF- $\alpha$  ha un ampio spettro di attività biologica ed un ruolo centrale nell'infiammazione. Esso è noto per le sue abilità citotossiche e tumoricide inducendo l'apoptosi o la necrosi. Presenta inoltre attività antivirale, modulazione della crescita e induzione della differenziazione cellulare. Il TNF-  $\alpha$  esercita i suoi molteplici effetti attraverso due distinti siti di legame o recettori, uno chiamato recettore di tipo I di 55 KDa e l'altro recettore di tipo II di 75 KDa.

Protocollo: 10  $\mu$ g TNF- $\alpha$  + 100  $\mu$ l PBS, il prodotto ottenuto viene aliquotato in 10 provette da 10  $\mu$ l ciascuna. Il contenuto di ognuna di queste viene versato in un vial contenente 10 ml di DMEM ed i fibroblasti in coltura. Prima di seminare i fibroblasti nelle multiwell, devono trascorrere 2 h affinché la loro infiammazione possa essere indotta.

## **MTT Test**

Gli effetti del laser sulla proliferazione cellulare sono state misurate attraverso il saggio colorimetrico dell'MTT [3 (4,5 dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazolium bromide] per tutte le serie di esperimenti. Esso fornisce indirettamente informazioni sulla vitalità della cellula dal momento che è un indicatore della funzionalità mitocondriale. La molecola di MTT, dopo l'incubazione con cellule vitali, viene tagliata dalle deidrogenasi mitocondriali che convertono il sale tetrazolio MTT idrosolubile di colore giallo (Fig. 13) in un cristallo definito formazano insolubile di colore violetto.

Dopo l'irradiazione laser le cellule sono state incubate per 4, 24 e 48 h a 37°C in atmosfera al 100% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub>. Ciascun esperimento è stato eseguito 2 volte in duplicato. Dopo l'incubazione la multiwell da 96 pozzetti veniva svuotata dal terreno di coltura (Fig. 14). Solo le cellule vitali aderenti rimanevano legate al fondo della piastra. In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 µL di MTT (1 mg/ml) e la piastra era incubata per 3 ore.

Successivamente l'MTT è stato sostituito da 100 µL di DMSO, per consentire la dissoluzione dei cristalli di formazano insolubili formati. La piastra è stata agitata delicatamente e incubata per 15 minuti. La densità ottica dei pozzetti della multiwell da 96 è stata letta attraverso l'uso di uno spettrofotometro (Perkin Elmer, Victor x3 Multilabel Plate Reader) (Fig. 15), con l'uso del software New WorkOut 2.5. La media dei valori della densità ottica dell'MTT Test di ogni campione è rappresentativa dell'attività mitocondriale delle cellule dopo l'irradiazione laser. L'attività mitocondriale della popolazione controllo viene assunta pari al 100%.

### **Reazione polimerasica a catena (PCR)**

Per una valutazione più approfondita della quarta serie di esperimenti ci si è avvalsi inoltre della PCR (Polymerase Chain Reaction). Essa, inventata e messa a punto da Kary Mullis nel 1983, rappresenta un metodo attraverso il quale una sequenza di DNA o cDNA (RNA retroscritto) può essere amplificata esponenzialmente in vitro in modo specifico. Per fare ciò è necessario conoscere con precisione le estremità della sequenza da amplificare per poter sintetizzare i primers e utilizzare un enzima che non si denaturi alle alte temperature per poter fare cicli continui di PCR. L'enzima che si utilizza è denominato DNA Taq polimerasi ed è stato estratto da un batterio, *Thermus Aquaticus*, presente nei geysers del parco nazionale di Yellowstone. La PCR sfrutta i meccanismi cellulari di replicazione del DNA. I vari cicli di amplificazione procedono con andamento esponenziale e avvengono in un thermal cycler. Il ciclo di PCR è composto da:

- denaturazione* per uno o più minuti a 94-96°C per separare il DNA nei suoi due filamenti;

- annealing* per uno o più minuti a temperatura uguale o inferiore a 72°C per permettere l'appaiamento dei primers al DNA;

- estensione* per uno o più minuti a 72°C durante i quali la DNA polimerasi si lega al DNA in corrispondenza dei primers e sintetizza il

filamento corrispondente a partire da ciascun primer.

Provette contenenti il DNA vengono riscaldate a 94-96°C per un tempo che può variare da uno a pochi minuti, al fine di denaturare il DNA, cioè di separarne la struttura a doppia elica nei suoi due filamenti. La temperatura viene ridotta a 50-65°C per uno o più minuti, per consentire l'adesione dei due inneschi alle rispettive sequenze complementari presenti sul DNA, a destra e a sinistra della regione che si desidera amplificare. La temperatura è portata a 72°C per uno o più minuti, per permettere a molecole di enzima Taq polimerasi di raggiungere le estremità degli inneschi e di estendere questi ultimi copiando lo stampo di DNA. Durante il secondo ciclo si formano molecole ibride con un filamento della lunghezza

desiderata. Nel terzo ciclo si ha la formazione delle prime molecole di DNA corrispondenti esattamente alla zona del genoma che si vuole amplificare. Man mano che prosegue la sintesi aumenta la percentuale di molecole di DNA con le caratteristiche desiderate. Alla fine del quarto ciclo, otto molecole su sedici (cioè 50% delle molecole presenti) corrispondono esattamente alla zona bersaglio. Alla fine del quinto ciclo, ventidue molecole su trentadue (cioè quasi 70% delle molecole presenti) corrispondono esattamente alla zona bersaglio.

Utilizzando i software Primers e Amplify si fanno delle prove di PCR e si sceglie la coppia di primers che meglio soddisfa le nostre esigenze, cioè che fornisce un buon amplificato del nostro gene. Nel nostro caso, ci siamo soffermati sulle



differenze nell'espressione genica di *collagene tipo I* e *fibronectina*. Alla fine con il software Blast si verifica la specificità della propria sequenza. Il prodotto di PCR così ottenuto va valutato per la sua lunghezza e specificità attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

La PCR appena descritta è definita "qualitativa" dato che non permette di risalire al numero di copie di DNA o cDNA di partenza, visto che la reazione procede con andamento esponenziale e quantità di DNA di partenza anche molto diverse danno origine a prodotti di amplificazione simili al termine dei 30-40 cicli.

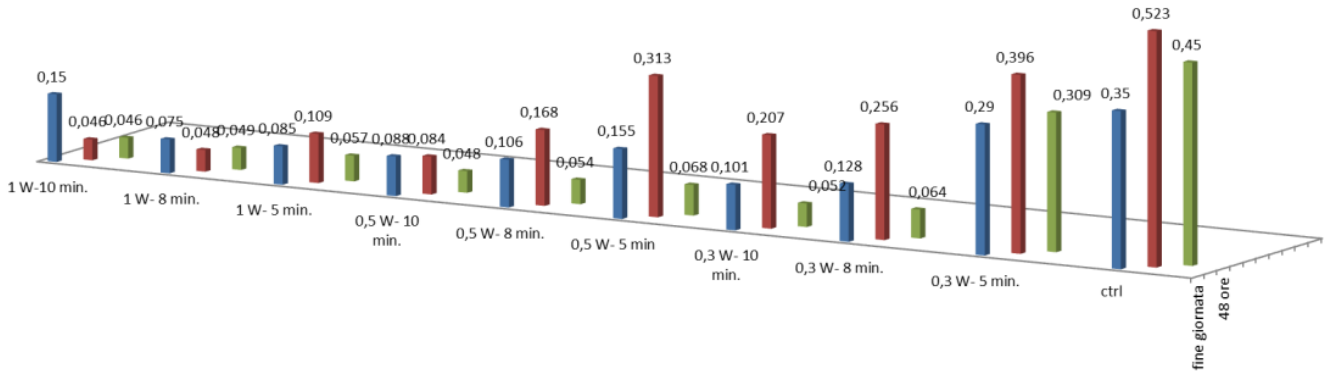
## **RISULTATI**

### **MTT Test**

La proliferazione e l'attività mitocondriale sono state valutate stimolando i fibroblasti con differenti potenze e tempi di irradiazione in tutte e quattro le serie di esperimenti condotte. Per quanto riguarda la prima serie di esperimenti (potenze e tempi di irradiazione elevati), sia per la singola applicazione che per la triplice applicazione, gli MTT test eseguiti a fine giornata, a 24 h e a 48 h hanno evidenziato una diminuzione significativa della proliferazione cellulare per i tutti gruppi irradiati rispetto ai gruppi controllo. Si osserva però una diminuzione significativamente meno marcata e più vicina ai valori dei gruppi controllo per la combinazione 300 mW- 300 sec. (Grafici 1-2)

### MTT TEST, 1 APPLICAZIONE LASER

■ fine giornata ■ 24 ore ■ 48 ore



### MTT TEST, 3 APPLICAZIONI LASER

■ fine giornata ■ 24 ore ■ 48 ore

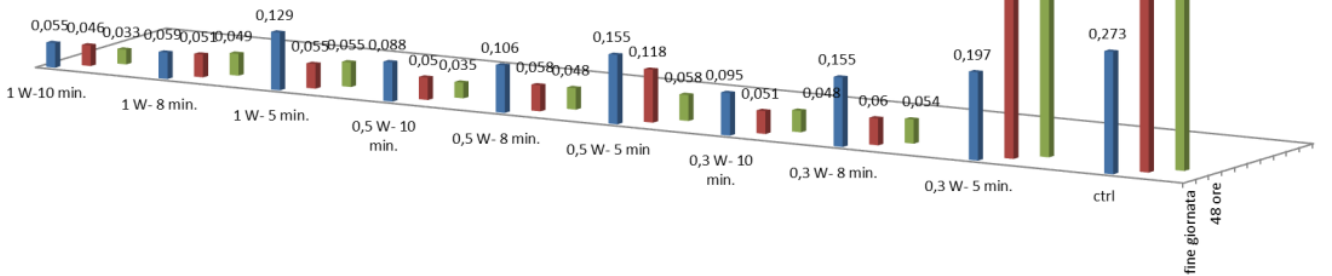
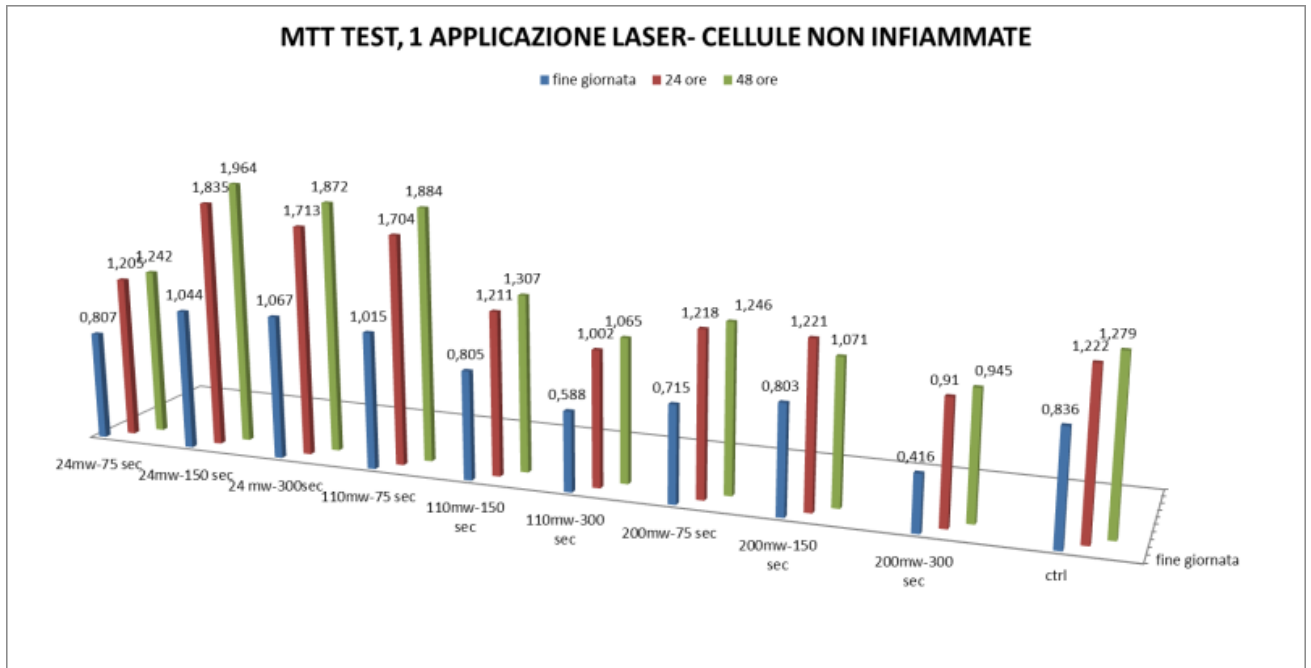


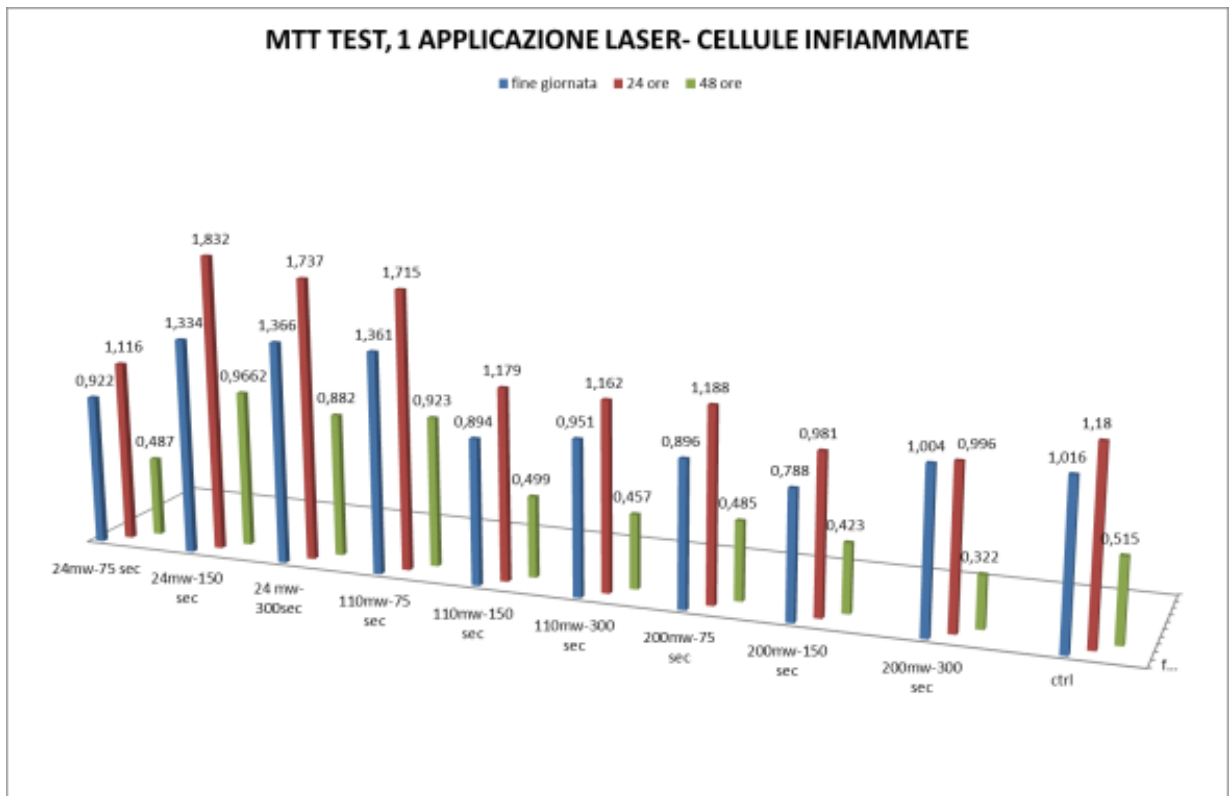
Grafico !-2: MTT test fine giornata, 24h e 48h. Applicazione singola e triplice applicazio

2. Per quanto riguarda la seconda serie di esperimenti (irradiazione, con applicazione singola e con potenze e tempi più bassi, di cellule in condizioni normali seminate in monostrato) i risultati dei tests MTT a fine giornata, a 24 h e a 48h hanno evidenziato un significativo aumento della proliferazione cellulare rispetto ai gruppi controllo, di 3 gruppi in base alle possibili combinazioni potenza-sec. di applicazione ( 24 mW-150 sec.- 3.6 J/cm<sup>2</sup>, 24 mW- 300 sec.- 7.2 J/cm<sup>2</sup> e 110 mW- 75 sec.- 8.25 J/cm<sup>2</sup>). ( Grafico 3)

3. Per quanto riguarda la terza serie di esperimenti condotta con le stesse modalità della seconda serie, ma su fibroblasti infiammati, i risultati dei tests MTT a fine giornata, a 24 h e a 48h hanno evidenziato un significativo aumento della proliferazione cellulare rispetto ai gruppi controllo, sempre per gli stessi 3 gruppi in base alle possibili combinazioni potenza-sec. di applicazione ( 24 mW-150 sec.- 3.6 J/cm<sup>2</sup>, 24 mW- 300 sec.- 7.2 J/cm<sup>2</sup> e 110 mW- 75 sec.- 8.25 J/cm<sup>2</sup>). ( Grafico 4). Nella comparazione dei risultati dei tests su cellule in condizioni normali e di quelli condotti su cellule infiammate si osserva una significativa differenza solo nell'MTT test eseguito a 48h, il quale evidenzia un numero di cellule significativamente minore per la serie di test su cellule infiammate, sia nel gruppo controllo che nei gruppi irradiati, rispetto alla serie di test su cellule in condizioni normali ( Figura 2-3).

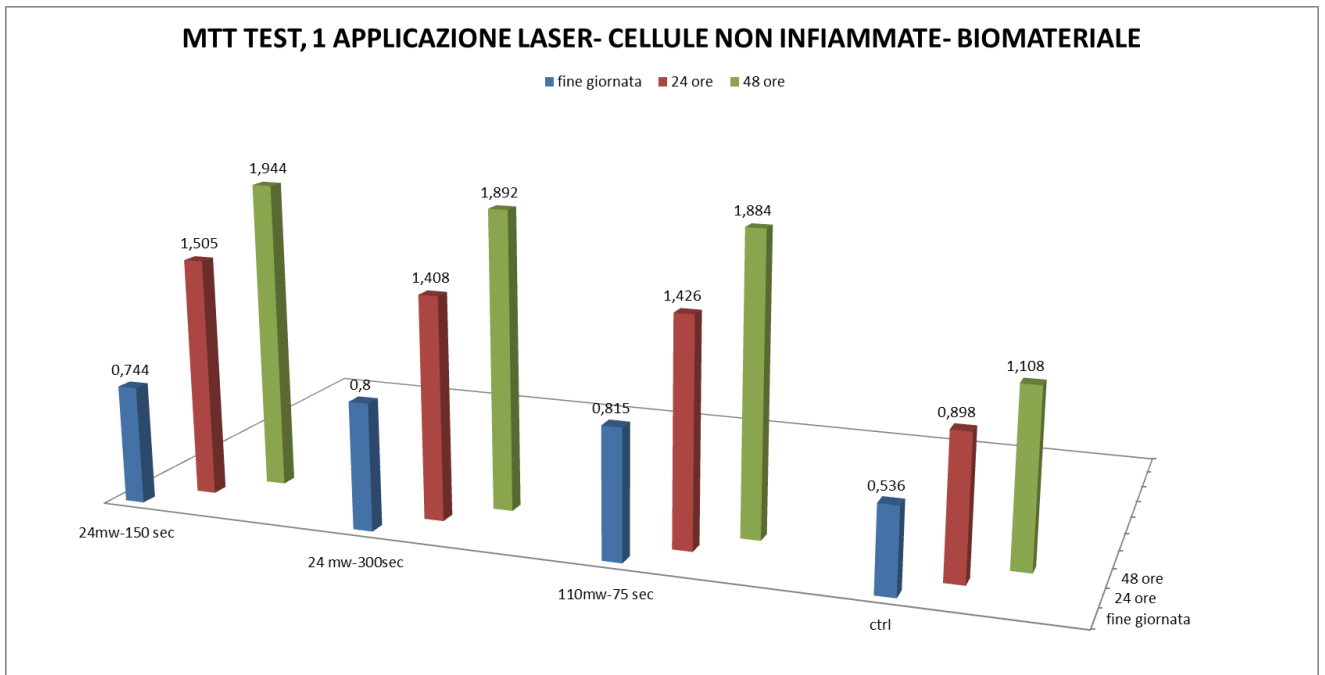


*Grafico 2: MTT test fine giornata, 24h e 48h. 1 applicazione laser cellule non infiammate.*

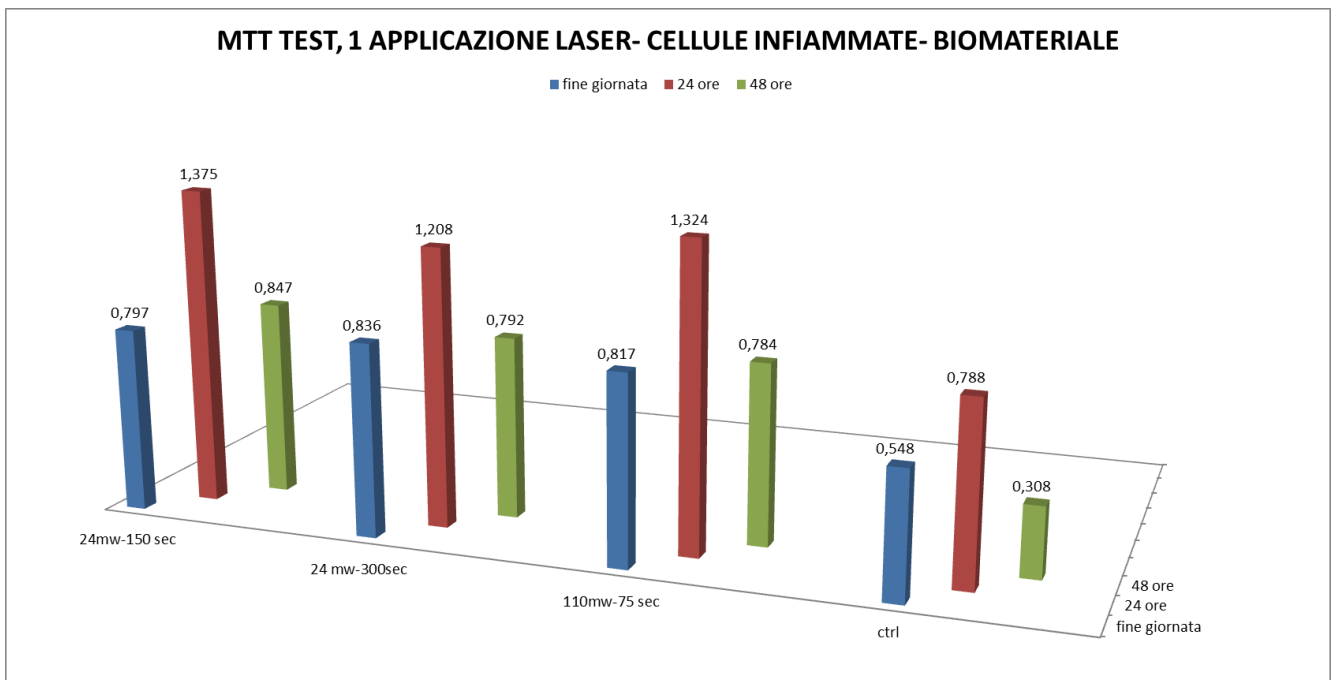


*Grafico 3: MTT test fine giornata, 24h e 48h. 1 applicazione laser cellule infiammate*

Per quanto riguarda la quarta ed ultima serie di esperimenti, condotta su fibroblasti in condizioni normali ed infiammati seminati su di un biomateriale tridimensionale ( NW11), si è fatto riferimento ai 3 gruppi irradiazione con i risultati più significativi emersi dalle seconda e terza serie di esperimenti ( 24 mW- 150 sec.- 3.6 J/cm<sup>2</sup>, 24 mW- 300 sec.- 7.2 J/cm<sup>2</sup> e 110 mW- 75 sec.- 8.25 J/cm<sup>2</sup>). I risultati dei tests MTT a fine giornata, a 24 h e a 48h hanno evidenziato un significativo aumento della proliferazione cellulare rispetto ai gruppi controllo sia per i fibroblasti in condizioni normali che infiammati, in linea con i risultati ottenuti in monostrato. (Grafico 5 e 6). Nella comparazione dei risultati dei tests su cellule in condizioni normali e di quelli condotti su cellule infiammate si osserva anche in questo caso una significativa differenza solo nell'MTT test eseguito a 48h, il quale evidenzia un numero di cellule significativamente minore per la serie di test su cellule infiammate, sia nel gruppo controllo che nei gruppi irradiati, rispetto alla serie di test su cellule in condizioni normali (Grafico 4-5)



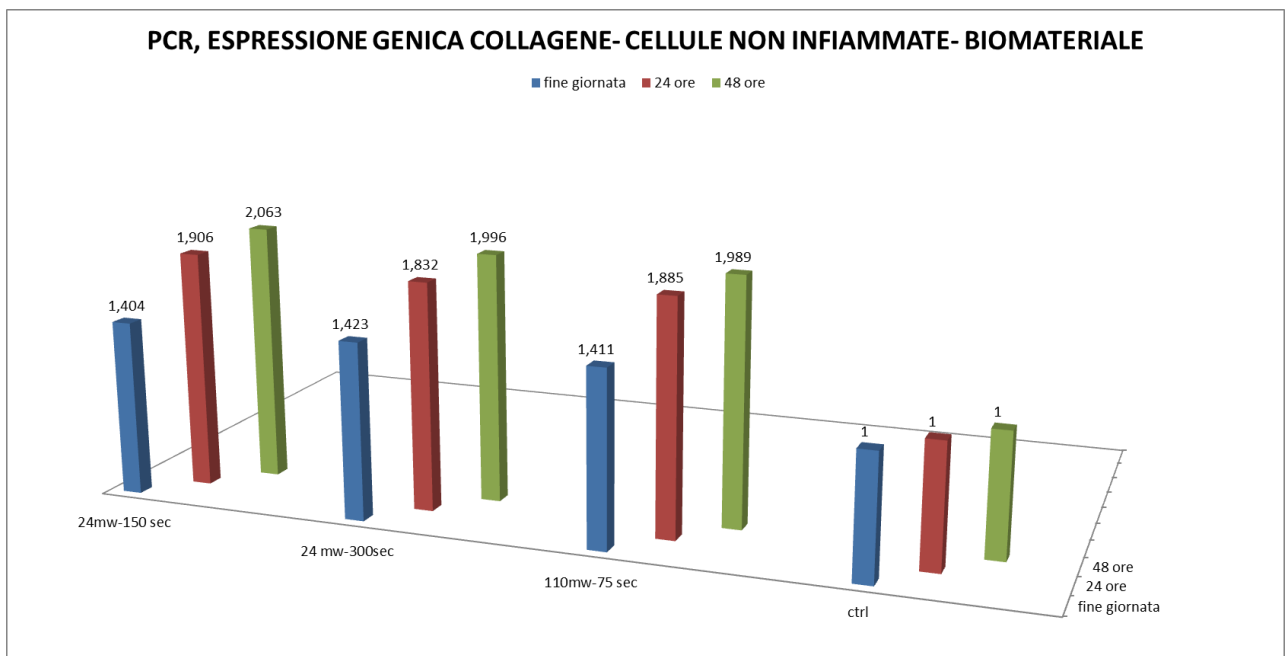
*Grafico 4: MTT test fine giornata, 24h e 48h. 1 applicazione laser, cellule non infiammate, biomateriale*



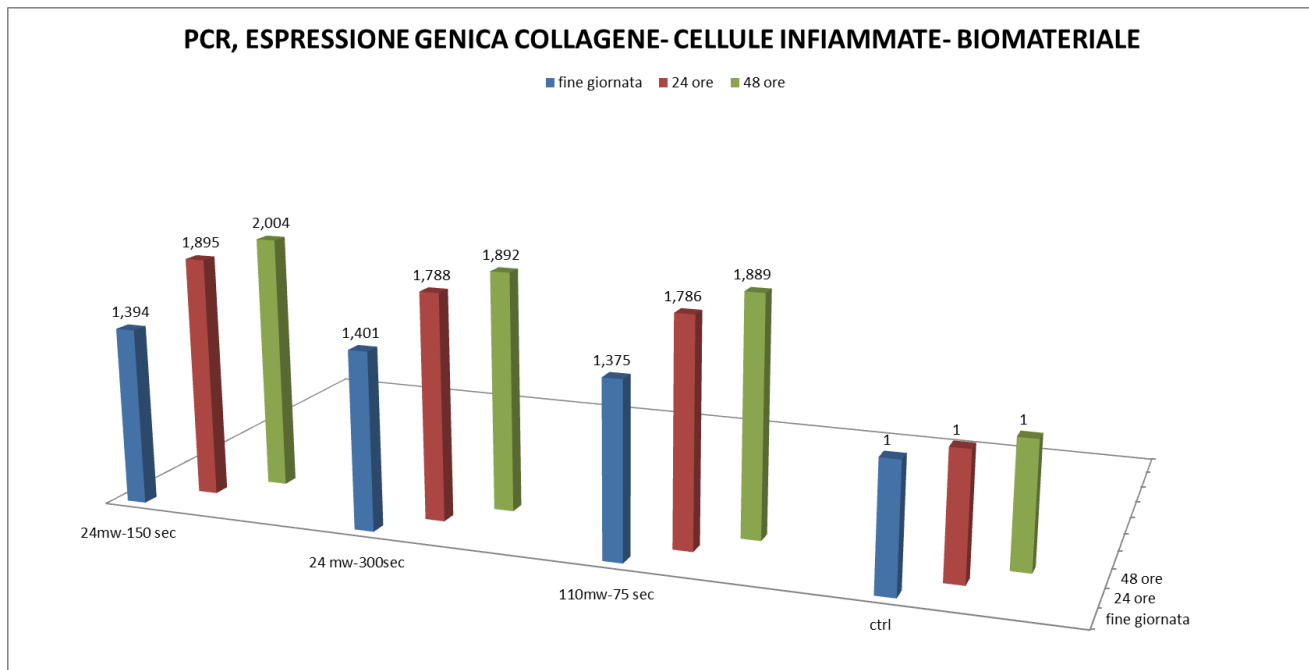
*Grafico 5 MTT test fine giornata, 24h e 48h. 1 applicazione laser, cellule infiammate, biomateriale*

## Reazione polimerasica a catena (PCR)

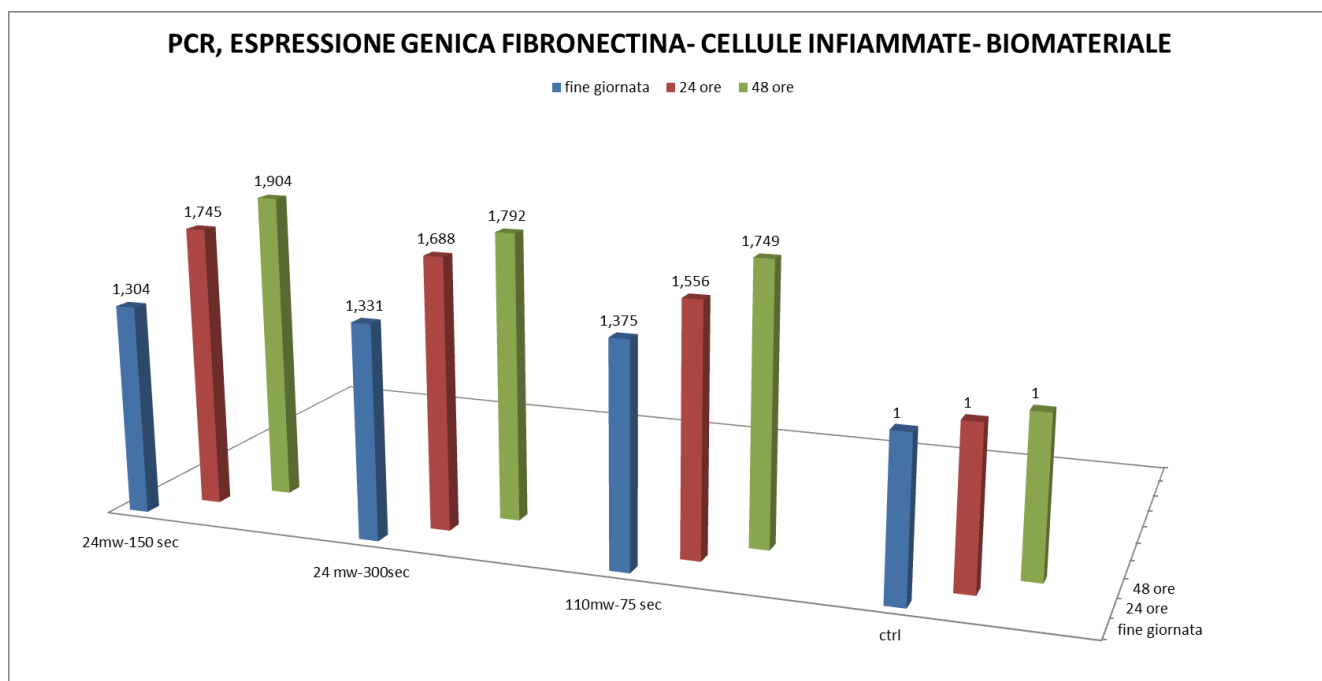
L'obiettivo era quello di valutare le differenze nell'espressione genica di *collagene tipo I* e *fibronectina* (individuati come principali componenti della matrice extracellulare: *collagene* quale proteina di supporto, *fibronectina* quale proteina che media l'adesione cellulare), tra gruppi irradiati e gruppi controllo, per la quarta serie di esperimenti. E' risultata una differenza significativa nell'espressione genica di questi due markers nei gruppi irradiati rispetto a quelli controllo sia per le cellule in condizioni normali che per le cellule infiammate. (Grafici 6-7-8-9).



**Grafico 6: Espressione genica collagene tipo I, cellule non infiammate**

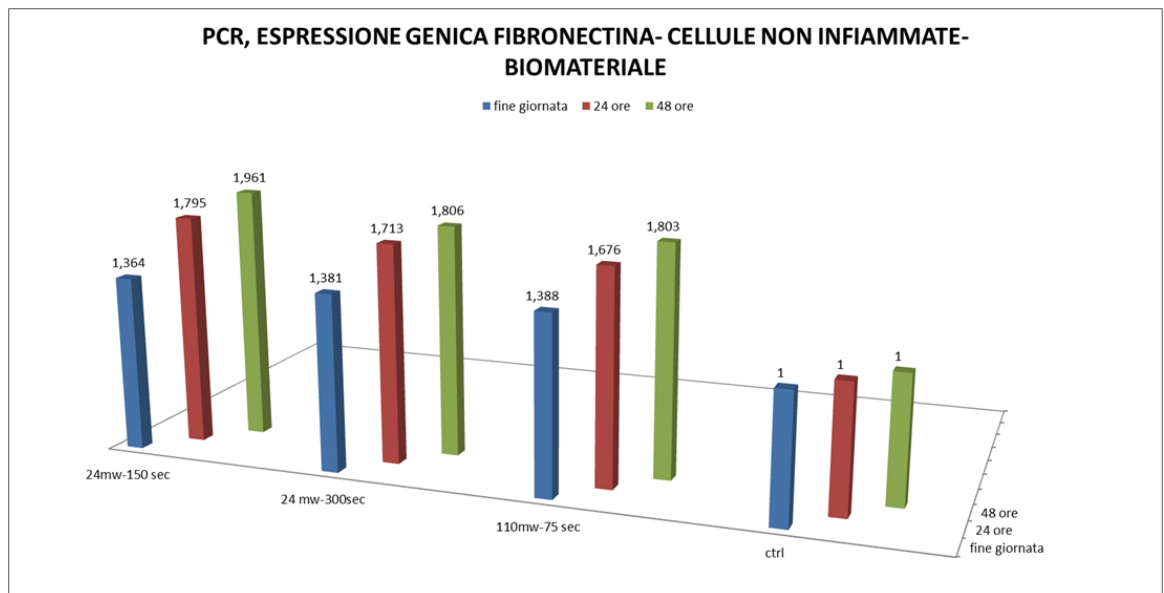


*Grafico 7: Espressione genica collagene tipo I, cellule infiammate*



*Grafico 8: Espressione genica fibronectina, cellule infiammate*





*Grafico 9: Espressione genica fibronectina, cellule infiammate*

## DISCUSSIONE

Nonostante esistano in letteratura diversi studi riguardo gli effetti della terapia laser a bassa intensità su cellule e tessuti, l'esatto meccanismo alla base dell'interazione laser-cellula non è ancora stato chiarito. L'assorbimento a livello molecolare del laser rappresenta il prerequisito per qualsiasi effetto cellulare. E' universalmente riconosciuto che gli effetti del laser sulle cellule dipendano dalla lunghezza d'onda e dalla dose energetica. E' stato descritto come porfirine e citocromi endogeni, così come vari biopolimeri, giocano un ruolo chiave nell'assorbimento della luce laser. E' stato studiato lo spettro di assorbimento di fibroblasti seminati in monostrato e si è visto che, soprattutto le citocromo-ossidasi, assorbono meglio luce laser con lunghezza d'onda tra 800 e 830 nm (Breugel HHFI Surg Med 1992- Lubart R Photobiol 1992). Di conseguenza, la catena respiratoria cellulare è supposta essere il sito iniziale di reazione di qualsiasi effetto fotoindotto da una luce laser vicina al campo degli infrarossi. La reattività di fibroblasti gengivali umani (HGF) alla LLLT in vitro, è stata dimostrata da alcuni autori. Un laser a diodi Al-Ga-As con lunghezza d'onda 830 nm ha inibito la produzione di prostaglandine E2 e IL-1 $\beta$  e

la loro espressione genica in HGF (Sakurai Y Eur J Oral Sci 2000- Nomura K Lasers Med Sci 2001). Takema e collaboratori nel 2000 hanno descritto una inibizione degli attivatori del plasminogeno indotta da un laser diodi 830 nm in HGF (Takema T Lasers Med Sci 2000). Sorprendentemente, dati sugli effetti della LLLT sulla proliferazione di colture cellulari di fibroblasti gengivali umani (HGF) sono scarsamente presenti. Uno studio del 2001 (Luciana Almeida-Lopes Lasers in Surgery and Medicine 2001) ha dimostrato come un laser a diodi 780 nm, utilizzato con potenze di 10 mW e 30 mW e per tempi di applicazione calcolati in modo da raggiungere una fluence di  $2 \text{ J/cm}^2$  (scelta perché ritenuta la dose più corretta da diversi autori (Mester AF Laser Therapy 1986 -89) ,abbia indotto un aumento di proliferazione cellulare di HGF, ma solo per le cellule coltivate in un terreno di coltura deficitario per sostanze nutritive ( 5% fbs anziché 10% fbs); questo a conferma della teoria di alcuni autori (Almeida-Lopes Bol SELMQ 1998 , Nara Y Surg Med Lasers 1991 , Steinlechner CWB Laser Therapy 1993) che sostengono che la LLLT sia in grado di intensificare le funzioni cellulari quando le cellule sono in una condizione di stress. Uno studio del 2002 ha dimostrato come un laser diodi 809 nm abbia portato ad un aumento significativo e notevole della proliferazione cellulare di HGF a 24 h dall'irradiazione; effetto che poi si è affievolito in modalità dose-dipendente alle 48 e 72 h (Matthias Kreisler Lasers Surg Med 2002). In questo studio gli autori hanno deciso di utilizzare una potenza di 10 mW e tempistiche differenti in modo da raggiungere una fluence compresa tra  $1.96$  e  $7.98 \text{ J/cm}^2$  . L'aumento di proliferazione cellulare è stato ottenuto per tutto il range di fluence fino agli  $8 \text{ J/cm}^2$  , a parziale smentita degli autori che sostengono che la fluence ottimale sia di  $2 \text{ J/cm}^2$  ( 7-12) e di altri autori che affermano che una fluence fino a  $4 \text{ J/cm}^2$  porti ad effetti proliferativi mentre una fluence superiore ai  $4 \text{ J/cm}^2$  ad effetti inibitori (Basford JR Lasers Surg Med 1995 - Walsh LJ Austr Dent J 1997). Nel nostro studio abbiamo osservato un aumento significativo della proliferazione di HGF, a fine giornate e ancora di più a 24h e a 48h, utilizzando potenze di 24 mW e 110 mW associate a tempi di irradiazione tali

da raggiungere una fluence tra 3.6 e 8.25 J/cm<sup>2</sup>, risultati in linea quindi con lo studio precedentemente citato del 2002 (Matthias Kreisler Lasers Surg Med 2002). Nel nostro studio abbiamo inoltre testato la LLLT su HGF infiammati in vitro e si è osservato un aumento significativo della loro proliferazione per le stesse potenze e tempi di irradiazione. L'unica differenza significativa rispetto alle colture cellulari di HGF non infiammati si è presentata nella valutazione a 48h, dove il numero di cellule presenti è risultato notevolmente inferiore, seppur con la conferma del trend di significativo aumento della proliferazione nei gruppi irradiati rispetto a quelli controllo. Ulteriore approfondimento del nostro studio è stato quello di seminare gli HGF in condizioni normali ed in condizioni di infiammazione, oltre che in monostrato come negli articoli precedentemente citati, anche su di un biomateriale utilizzato come scaffold (impalcatura di supporto). In tal modo sono state sfruttate sia le caratteristiche meccaniche e strutturali del biomateriale, che mimano in vitro la funzione della matrice extracellulare, sia le capacità biologiche delle cellule. Anche per gli HGF infiammati e non, seminati all'interno del biomateriale, si è riscontrato un aumento significativo della loro proliferazione a fine giornata, a 24h e a 48h; con risultati in linea con quelli ottenuti in monostrato. Altro obiettivo del nostro studio era quello di valutare le differenze nell'espressione genica di collagene tipo I e fibronectina (individuati come principali componenti della matrice extracellulare: collagene quale proteina di supporto, fibronectina quale proteina che media l'adesione cellulare). Ci sono studi in vitro che dimostrano come la LLLT possa accrescere la sintesi di collagene (Yew DT Scanning Microsc 1989, Reddy GK Lasers Surg Med 1998). D'altro canto van Breugel e Dop Bär hanno verificato una riduzione della sintesi di collagene in concomitanza con un aumento della proliferazione cellulare in seguito ad irradiazione laser (Breugel HHFI Lasers Surg Med 1992). Nel nostro studio abbiamo valutato, mediante PCR, la differenza di espressione genica dei due markers nei gruppi di HGF infiammati e non infiammati, seminati su di un biomateriale ed irradiati con le stesse impostazioni che hanno determinato un

aumento della loro proliferazione. Quello che è risultato è un significativo aumento nell'espressione genica di collagene di tipo I e di fibronectina in tutti i gruppi cellulari irradiati rispetto a quelli controllo; in concomitanza con un significativo aumento della loro proliferazione.

## CONCLUSIONI

In conclusione si può affermare che da questo studio emerge un chiaro effetto biostimolante dell'irradiazione laser a basse potenze ( LLLT), che si esplica in un significativo aumento della proliferazione di fibroblasti gengivali in condizioni normali ed in condizioni di infiammazione. Risulta inoltre una capacità della LLLT di determinare un aumento significativo nell'espressione genica di collagene tipo I e fibronectina, i due principali componenti della matrice extracellulare. Tutto ciò ovviamente attenendosi a determinati parametri ed impostazioni del dispositivo laser, in termini di potenza, tempi di applicazione e densità energetica. I risultati sono quindi promettenti, tuttavia sono necessari ulteriori studi di laboratorio per determinare l'esatto meccanismo alla base dell'effetto biostimolante. Sembra che gli effetti della stimolazione laser possano essere limitati nel tempo, con la conseguente necessità di sessioni di trattamento ripetute allo scopo di ottenere un effetto biostimolatorio più duraturo in vitro e probabilmente in vivo. Serve inoltre un protocollo di irradiazione universalmente riconosciuto, permangono infatti controversie sui parametri di utilizzo, soprattutto per quanto riguarda la densità energetica. Il passaggio successivo, una volta risolti questi dubbi, sarà la sperimentazione in vivo, dove comunque le interazioni laser-tessuti sono multiple ed i parametri utilizzati in vitro non possono garantire il medesimo successo.

# Bibliografia

Lim HM, Lew KKK, Tay DKL. A clinical investigation of the efficacy of low level laser therapy in reducing orthodontic postadjustment pain. *Am J Orthod* 1995; 108: 614-22.

Kert J, Rose L. *Clinical laser therapy- low level laser therapy*. Ballerup, Denmark: Scandinavian Medical Laser Technology, 1989.

Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 2011 Jan 28. [Epub ahead of print]

Maggioni, Attanasio, Scarpelli. *I laser in odontoiatria*. Piccin Editore. Utilizzo dei laser a bassa intensità e loro applicazioni. Cap 16; pp 295-307.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser-rays on wound healing. *Am J Surg* 1971; 122: 532-5.

Guzzardella GA, Fini M, Torricelli P, Giavaresi G, Giardino R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers Med Sci* 2002;17:216-20.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Med Sci* 2001; 29: 179-84.

Xiaoting L, Yin T, Yangxi C. Interventions for pain during fixed orthodontic appliance therapy. A systematic review. *Angle Orthod* 2010; 80: 925–32.

Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafarme RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol*. 1997;66:866-71.

Karu T. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. *Proc SPIE*. 1995; 2630: 2-9.

Derr VE et al. Free radical occurrence in some laser-irradiated biologic materials. *Federal Proc*. 1965; 24: 99-103.

Kudoh C et al. Effects of 830 nm Gallium Aluminium Arsenide Diode Laser radiation on rat saphenous nerve sodium-potassium-adenosine-triphosphatase activity: a possible pain attenuation mechanism examined. *Laser Therapy* 1989; 1: 63-7.

Breugel HHHFI, van, Ba'r D. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 1992;12:528-537.

Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulich I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol* 1992;12:305-310.

Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 2000;108:29-34.

Nomura K, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibition of interleukin-1 $\beta$  production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2001; 16:218-233.

Takema T, Yamaguchi M, Abiko Y. Reduction of Plasminogen Activator Activity Stimulated by Lipopolysaccharide from Periodontal Pathogen in Human gingival Fibroblasts by Low-energy Laser Irradiation. *Lasers Med Sci* 2000;15: 35-42.

Luciana Almeida-Lopes, Josepa Rigau, Renato Amaro Za'ngaro, Joa'õ Guidugli-Neto and Ma'rcia Martins Marques Jaeger. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. *Lasers in Surgery and Medicine* 29:179±184 (2001).

Mester AF, Mester A. Wound healing. *Laser Therapy* 1989;1:7.

Bolton P, Young S, Dyson M. Macrophage responsiveness to light therapy with varying power and energy densities. *Laser Therapy* 1991;2:105±111.

Bolton P, Dyson M, Young S. The effect of polarised light on the release of growth factors from the U937 macrophage-like cell line. *Laser Therapy* 1992;4:33±37.

Wei Yu, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* 1994;59:167±170.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Jaeger MMM, Brugnera Jr., A, Ve'lez-Gonz'alez M. Accio'n del la'ser a baja densidad de EFFECTS OF LOW LEVEL LASER THERAPY IN CULTURED GINGIVAL FIBROBLASTS 183 potencia en la proliferacio'n in vitro de fibroblastos de enc'õa humana. *Bol SELMQ* 1998;14:14±18.

Mester AF, Mester A. Mester's method of laser biostimulation. In: Waidelich W, editor. *Laser-Optoelektronik*, 1986: 105±109.

Nara Y, Matono S, Morioka T. Regulatory action of low intensity laser on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin. *Surg Med Lasers* 1991;4:17±20.

Steinlechner CWB, Dyson M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Therapy* 1993;5:65±73.

Matthias Kreisler, Ann B. Christoffers, Haitham Al-Haj, Brita Willershausen, and Bernd d'Hoedt. Low Level 809-nm Diode Laser-Induced In Vitro Stimulation of the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002; 30:365–369.

Basford JR. Low intensity laser therapy: still not a established clinical tool. *Lasers Surg Med* 1995;16:331–342.

Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 1996;23:492–496.

Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Austr Dent J* 1997;42:247–254.

Yew DT, Li WWY, Pang KM, Mok YC, Au C. Stimulation of collagen formation in the intestinal anastomosis by low dose He–Ne laser. *Scanning Microsc* 1989;3(1):379–386.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers Surg Med* 1998;22:187–281.

**ATTIVITÀ COLLAGENASICA DEL VIBRIO ALGINOLYTICUS: STUDIO  
SPERIMENTALE E PROSPETTIVE CLINICHE**

## **INTRODUZIONE**

### **Le collagenasi umane**

Le collagenasi umane sono enzimi appartenenti alla famiglia delle metalloproteinasi di matrice (MMP-1, MMP-2, MMP-13), i cui geni sono situati in cluster nella regione telomerica del braccio lungo del cromosoma 11 [Pendas AM Genomics 1995], e sono le principali endopeptidasi capaci di degradare il collagene della matrice extracellulare. Questi enzimi sono in grado di clivare anche altre proteine appartenenti e non appartenenti alla matrice regolando il metabolismo cellulare. Oltre alle collagenasi, esistono altri enzimi all'interno di questa famiglia capaci di degradare differenti strutture proteiche: tra questi esistono stromalisine, gelatinasi, metalloproteinasi di membrana [Watanabe K Appl Microbiol Biotechnol 2004]. Le collagenasi sono un fattore determinante per il rimodellamento della matrice extracellulare durante l'organogenesi ed il riparo dei tessuti [Ala Aho R Biochimie 2005], ma svolgono anche un ruolo fondamentale nella progressione tumorale, nell'invasione metastatica, nella riparazione delle ferite, nelle infezioni batteriche o in patologie autoimmuni come l'artrite reumatoide [Watanabe K Appl Microbiol Biotechnol 2004]. (Tab. I)



Tab. I. Profili di espressione in vivo delle collagenasi umane. (da Ala-Aho R, Kahari VM:

Collagenases in cancer. Biochimie 2005; 87: 273-286.)

Collagenasi	Espressione	
Collagenasi 1 (MMP-1)	<i>situazioni fisiologiche</i>	organogenesi
		riparazione tissutale
	<i>situazioni patologiche</i>	ulcere cutanee croniche
	<i>tumori maligni</i>	carcinoma della mammella
		carcinoma del colon retto
		carcinoma gastrico
		melanoma
		carcinoma ovarico
		carcinoma esofageo
	adenocarcinoma pancreatico	
Collagenasi 2 (MMP- 8)	<i>situazioni fisiologiche</i>	cartilagine articolare
		maturazione dei neutrofili
	<i>situazioni patologiche</i>	sinovia dell'artrite reumatoide
		bronchite
	<i>tumori maligni</i>	carcinoma ovarico
Collagenasi 3 (MMP-18)	<i>situazioni fisiologiche</i>	osteogenesi
		rimodellamento osseo

		riparazione delle ferite fetali
		riparazione delle ferite gengivali
	<i>situazioni patologiche</i>	osteoartrite
		sinovia dell'artrite reumatoide
		ulcere cutanee croniche
		ulcere intestinali
		periodontite cronica
		aterosclerosi
		aneurismi aortici
	<i>tumori maligni</i>	carcinoma della mammella
		condrosarcoma
		carcinomi squamosi di testa e collo
		carcinoma esofageo
		melanoma
		carcinoma uroteliale
carcinoma squamoso vulvare		

Per questi motivi l'espressione e la regolazione dell'attività delle collagenasi è strettamente controllata: esistono punti di controllo a livello trascrizionale e post-trascrizionale che permettono la sintesi dell'enzima in forma inattiva. La successiva attivazione da parte di enzimi come catepsina b, callicreina e plasmina viene frenata dall'azione di altre metalloproteinasi, le TIMPs, e da altri inibitori non specifici quali proteasi neutre, catepsina collagenolitica, gelatinasi, collagene peptidasi. Le collagenasi vengono prodotte in forma di precursori e, una volta attivate, seguono una precisa sequenza d'azione: legame al collagene, taglio nel sito target, reazione con un inibitore, degradazione da parte di un'altra proteasi. Esistono molte sostanze capaci di modulare l'attività delle collagenasi: la colchicina, la citocalasina B, le linfocine, l'eparina, le PG sono stimolatori; mentre l' $\alpha$ 2 macroglobulina, la  $\beta$ 1 siero proteina, le proteine cationiche della cartilagine, il PF 4 sono inibitori [Harper E Ann Rev Biochem 1980].

### **Struttura**

Le collagenasi hanno una struttura a multidominio costituita di un peptide segnale, un propeptide, un dominio catalitico, una regione cerniera e un dominio hemopexin-like. Il peptide segnale all'estremità N-terminale dirige la neosintetizzata pre-pro-collagenasi alla secrezione e viene successivamente rimosso. Il propeptide contiene una sequenza conservata di Cys che forma un ponte covalente con lo ione Zn del sito catalitico, utile al mantenimento dell'enzima nello stato inattivo [Springman EB Procl Natl Acad Sci USA 1990]. Il dominio catalitico contiene una sequenza conservata contenente Zn essenziale per l'attività proteolitica della MMP. Il dominio hemopexin-like è collegato tramite una regione ricca in Pro alla regione catalitica e possiede un ponte disolfuro tra le due estremità che ne determina la forma ad elica a pale. Questa rappresenta una struttura altamente conservata tra le varie collagenasi e svolge il ruolo di regolazione della specificità per il substrato, regolazione dell'attività proteolitica e legame con gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMPs) [Sanchez- Lopez R. J Biol Chem 1993].

- Collagenasi MMP-1

La MMP-1 è prodotta sotto forma di due proenzimi glicosilati di 52 kDa e 57 kDa che, una volta attivati, generano due enzimi di 42 kDa e 47 kDa. Questa collagenasi è reperita principalmente nei processi embriogenetici, durante i processi riparativi delle ferite, nelle ulcere cutanee croniche e in molti tipi di tumori maligni. Si occupa del taglio di molti tipi di proteine della matrice extracellulare come i collagene I, II, III, VII, VIII, X, l'aggrecano e la  $\alpha 2$  macroglobulina ma non le componenti della membrana basale.(Tab III).

- Collagenasi MMP-8

La MMP-2 è prodotta dai neutrofili durante la loro maturazione nel midollo osseo, viene accumulata in granuli nel citosol e poi rilasciata a seguito di stimoli extracellulari. Si trova inoltre nei condrociti della cartilagine articolare, nelle cellule epiteliali bronchiali e nei monociti durante stati patologici. Presenta sei siti potenziali di N-glicosilazione e ciò comporta un aumento delle dimensioni da 55 kDa a 75 kDa quando passa da una forma all'altra. Il suo substrato preferenziale è il collagene I, ma esercita azione di clivaggio anche su diverse chemochine.(Tab III).

- Collagenasi MMP-13

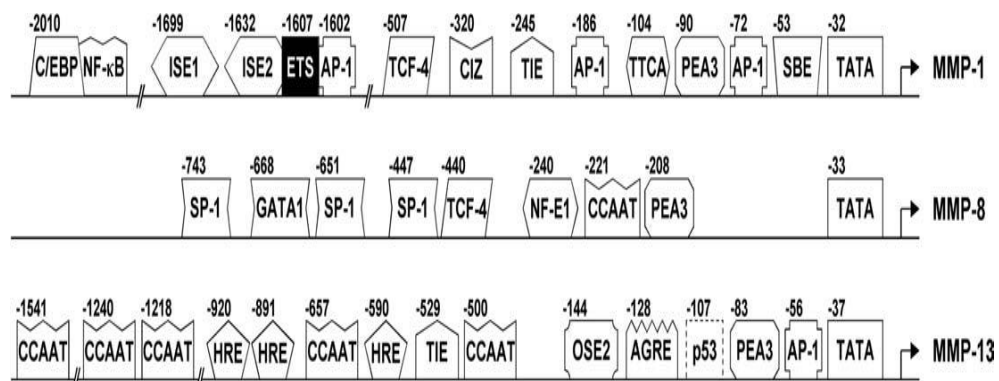
La MMP-13 è prodotta sotto forma di glicoproteina di 70 kDa in forma inattiva; essa diventa attiva dopo il taglio esercitato da plasmina, stromalisina e altre MMP, ottenendo così un peso di 48kDa. Ha una specificità più ampia per i vari tipi di collagene rispetto alle precedenti, clivando il tipo I, IV, IX, X e XIV, oltre ad aggrecano, tenascina, fibrillina, osteonectina e inattivando molte chemochine [Ala Aho R Biochimie 2005]. La sua espressione è limitata a poche situazioni fisiologiche quali lo sviluppo osseo, la riparazione delle ferite cutanee fetali e il rimodellamento osseo postnatale, mentre più numerose sono le condizioni patologiche in cui è espressa, ognuna caratterizzata dalla distruzione della normale architettura della matrice extracellulare. (Tab. II)

**Tab.II. Substrati ed attivatori delle collagenasi umane.**(da Ala-Aho R, Kahari VM: *Collagenases in cancer. Biochimie 2005; 87: 273-286.*)

<b>Collagenasi</b>	<b>Substrati di matrice</b>	<b>Attivate da</b>
Collagenasi 1 (MMP-1)	Aggrecano, collagene I, II, III, VII, VIII, X, XI, fibronectina, gelatina, laminina, perlecano, IGF-binding protein	MMP-3, MMP-7, MMP-10, plasmina, callicreina, chimasi
Collagenasi 2 (MMP-8)	Aggrecano, collagene I, II, III	MMP-3, MMP-10, plasmina
Collagenasi 3 (MMP-13)	Aggrecano, collagene I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatina, fibronectina, laminina, versicano, fibrillina, osteonectina	MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-14, MMP-15, plasmina

## Regolazione dell'attività

Solitamente le collagenasi sono espresse a bassi livelli, ma la loro produzione viene indotta rapidamente da citochine che stimolano l'attivazione di fattori di trascrizione leganti la regione regolatoria al 5' del gene, nel caso sia necessario un rapido rimodellamento tissutale. Fanno eccezione a questo modello i neutrofili e le cellule epiteliali ghiandolari poiché presentano delle forme di accumulo di MMP-8 preformata nel citosol. Esistono molteplici fattori di crescita capaci di attivare la cascata di trasduzione del segnale convergente nell'espressione del complesso di fattori trascrizionali AP-1, che regola anche la lettura di geni coinvolti nella proliferazione, nello sviluppo, nella differenziazione, nella risposta allo stress, nell'infiammazione e nella progressione tumorale delle cellule. I promotori di MMP-1 e MMP-13 contengono un sito di legame per AP1 circa in posizione -70 nucleotidi rispetto al sito di inizio della trascrizione, mentre MMP1 contiene anche un sito di legame nel promotore distale. AP1, accompagnato da sequenze PEA-3, lega fattori di trascrizione della famiglia delle ETS, i quali attivano sinergicamente la lettura dei geni di MMP-1. Il promotore di MMP-8 contiene invece sequenze target per il fattore di trascrizione Sp-1, espresso in molti tessuti e implicato nella regolazione di molti geni housekeeping [Westermarck J Mol Cell Biol 2001 ]. (Fig. 1)



**Figura. 1. Elementi regolatori nella regione del promotore del gene per le collagenasi umane: il sito di legame per i fattori di trascrizione include diversi siti critici per l'espressione genica delle proteine. (da Ala-Aho R, Kahari VM: Collagenases in cancer. Biochimie 2005; 87: 273-286.)**

Al momento della produzione, l'm-RNA deve subire un processo di stabilizzazione per garantire l'espressione dei geni delle MMP: la regione 3' UTR dell'm-RNA di MMP-1 contiene infatti sequenze ricche in AU deputate alla stabilizzazione del messaggio [Vincenti MP Nucleic Acid Res 1994].

Dopo che l'm-RNA è stato tradotto in proteina, le collagenasi vengono secrete in forma di precursori inattivi, condizione che viene mantenuta grazie al ponte tra la Cys al C-terminale e lo Zn del sito catalitico. L'attivazione presuppone la rottura di tale legame da parte dell'azione di proteinasi quali la plasmina, la callicreina, la chimasi, la triptasi, di altre MMPs oppure a causa dell'azione di sostanze come organomercuriali, agenti SH reattivi, specie reattive dell'ossigeno. Tra tutte le collagenasi, la MMP-1 è stata caratterizzata precisamente quanto a modalità di attivazione: dopo la secrezione e la rimozione del peptide segnale, che porta alla diminuzione da 55 e 57 kDa delle forme iniziali a 42 e 47 kDa, una serina proteasi taglia il sito di clivaggio, producendo un intermedio a breve emivita di 46 kDa che viene rapidamente trasformato in una forma stabile di 43 kDa tramite il taglio tra la Val 67 e la Met 68. Per ottenere la massima attività la MMP-1 deve essere nuovamente tagliata tra Gln 80 e Phe 81 da altre MMPs. Una via alternativa è il taglio eseguito da delle chimasi che attivano l'enzima direttamente tramite un clivaggio nel propeptide tra la Leu 83 e Thr 84 [Vincenti MP Nucleic Acid Res 1994].

### **Inibizione delle collagenasi**

L'azione degradativa delle MMPs nella matrice extracellulare è controllata da specifici enzimi inibitori delle metalloproteinasi: le TIMPs. Questa famiglia di proteine consta di quattro elementi (TIMP 1,2,3,4) capaci di regolare negativamente l'azione di tutti i componenti del gruppo delle MMPs. Esse agiscono legando specificamente la sequenza contenente Zn conservata del sito catalitico. La loro struttura varia da 21 kDa a 28 kDa di peso molecolare ed è composta da due domini: uno all'N-terminale, fondamentale per l'inibizione della collagenasi, e un altro al C-terminale responsabile della specificità di legame. L'inibizione di MMP-1 da parte di TIMP 1 è infatti migliore rispetto a quella di

TIMP-2; TIMP-4 agisce preferenzialmente su MMP-8; MMP-13 è inibita indifferentemente da tutte le TIMPs [Stratmann B, FEBS Lett 2001].

### **Relazione enzima-substrato**

Le collagenasi sono endopeptidasi che riconoscono e tagliano il collagene fibrillare di tipo I, II, III, V e IX; l'azione è simile su ogni tipo di collagene. Esse producono un peptide grande chiamato TCa e un peptide piccolo chiamato TCb. La specificità per i siti di taglio è dovuta alla disposizione delle sequenze di idrossiprolina, alla vicinanza di un disaccaride glu-gal a residui di idrossilisina e al fatto che le regioni di collegamento intermolecolari al C-terminale rappresentano una zona di debolezza della fibrilla di collagene [Harper E, . Ann Rev Biochem 1980]. Più in dettaglio, il tipo I viene tagliato tra la Gly775 e la Ile 776 della catena  $\alpha 1$  e tra la Gly775 e la leu 776 della catena  $\alpha 2$ ; i clivaggi esercitati generano due frammenti di rapporto  $\frac{1}{4}$  del totale al C-terminale e di  $\frac{3}{4}$  del totale all' N-terminale. Ciò permette la denaturazione dell'elica mentre l'azione proteolitica di altre proteasi di matrice degrada completamente il collagene [Ala Aho Biochimie 2005]. Le collagenasi hanno una preferenziale specificità d'azione per i diversi tipi di collagene: la MMP-1 agisce sul tipo III, la MMP-8 sul tipo I, la MMP-13 sul tipo II [Overall CM Nat Rev Cancer 2002,] [Egeblad M, Nat Rev Cancer 2002]. (Fig. 2)



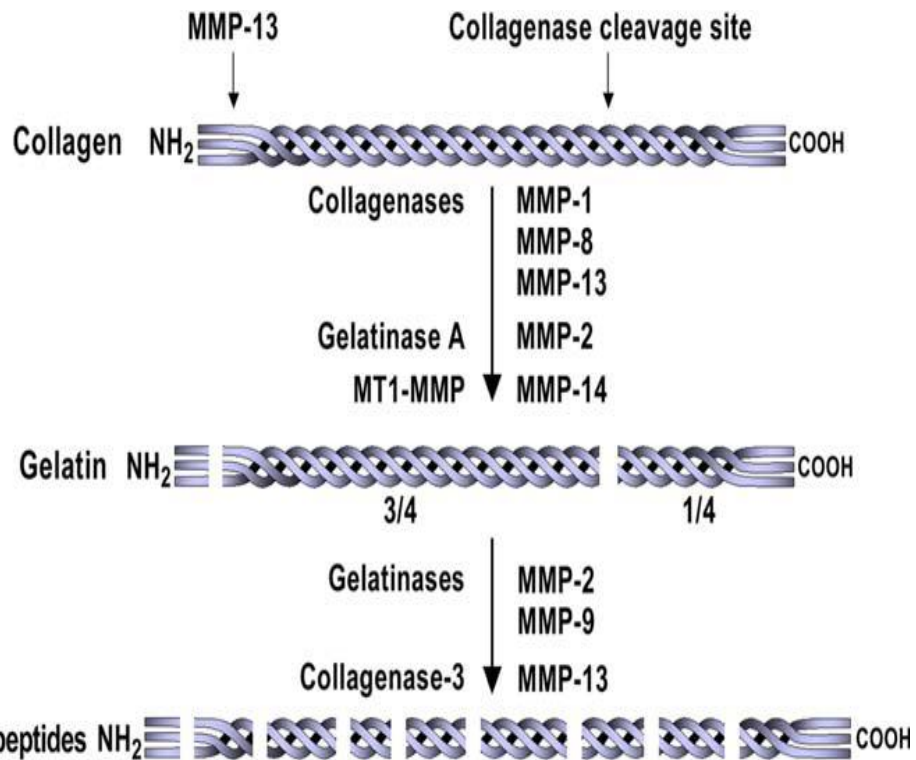


Figura. 2. Degradazione del collagene fibrillare: il collagene fibrillare viene degradato dalle collagenasi MMP-1, MMP-8, MMP-13 tramite l'attacco in siti specifici delle catene  $\alpha$  generando frammenti di 3/4 delle dimensioni originali all'N-term e di 1/4 delle dimensioni originali al C-term che diventano gelatina a temperatura corporea e in seguito vengono degradati ulteriormente dalle gelatinasi MMP-2 ed MMP-9 ma anche dalla collagenasi MMP-13. Quest'ultima inoltre taglia il collagene di tipi I a livello di regioni telopeptidiche non elicoidali. (da Ala-Aho R, Kahari VM:

L'interazione tra collagene e collagenasi è ostacolata da molecole come la fibronectina che, interagendo con dei proteoglicani, lega il sito di clivaggio del collagene e inibisce l'attacco da parte dell'enzima litico.

## **Collagenasi batteriche**

Molte specie batteriche sono produttrici di collagenasi, che vengono utilizzate da questi microorganismi come mezzo d'invasione tissutale negli ospiti colpiti dalla loro infezione. Sono enzimi che somigliano quanto a funzione e finalità a quelli umani, ma differiscono da essi poiché hanno delle caratteristiche particolari rispetto a modalità d'azione e struttura proteica [Watanabe K, Appl Microbiol Biotechnol 2004]. Le collagenasi batteriche sono implicate nella patogenesi di malattie che colpiscono vari apparati, dalla cute alle fasce sottocutanee, dall'occhio al cavo orale. Gli studi sulle collagenasi batteriche sono iniziati alla fine del 1800 con il riconoscimento del ruolo del *Clostridium Histolyticum* nella putrefazione dei tessuti, in particolar modo di una sua collagenasi capace di degradare le strutture tendinee [Mac Lennan JD, J Clin Invest 1953]. In anni successivi sono state identificate altre collagenasi, ma fino a tempi recenti si consideravano capaci della loro produzione solo poche specie batteriche [Lim DV, J Microbiol Methods 1993]: oltre al *Clostridium* anche il *Vibrio Alginolyticus*- isolato da pellicce di animali- e poche altre specie. Negli ultimi tre decenni è stato scoperto però un numero crescente di microorganismi che producono enzimi in grado di degradare il collagene; si sono così evidenziati molti aspetti della capacità infettante e della virulenza di varie specie batteriche. Il preciso contributo di collagenasi batteriche nell'eziologia di molte malattie non è però ancora stato completamente delineato, poiché è risaputo che anche le cellule dell'immunità e della matrice extracellulare come fibroblasti e neutrofilo producono collagenasi durante gli stati infiammatori di un tessuto, collaborando così alla distruzione delle aree infettate [Matrisian LM ]. A questo proposito è stato anche postulato che le collagenasi batteriche possano fungere da attivatrici per le collagenasi dell'organismo ospite, accelerando la distruzione tissutale e quindi la progressione dell'infezione [Robertson PB, J Peridontal Res 1974;] [Sorsa T, . Infect Immun 1992] [Uitto VJ, J Dent Res 1978]. Tra gli enzimi capaci di degradare il collagene esistono classi di proteine abili nella degradazione di collagene non fibrillari o almeno non

totalmente fibrillari che contribuiscono in maniera del tutto simile alle collagenasi vere e proprie (che agiscono sul collagene fibrillare) alla patogenesi delle malattie e alla loro progressione [Harrington DJ, Infection and Immunity 1996].

### **Struttura delle principali collagenasi batteriche**

Le collagenasi batteriche più studiate sono senza dubbio quelle prodotte dal *Vibrio Alginolyticus* e dal *Clostridium Histolyticum*, in special modo ColH e ColB [Matsushita O, J Biol Chem 1998]. Le collagenasi del *Clostridium Histolyticum* sono metalloproteinasi dotate di un dominio contenente Zn al centro del sito attivo [Gonzales T Microbiol Rev 1996,]; l'idrolisi esercitata dall'enzima avviene tra il residuo X e la Gly-Pro [Harrington DJ, Infection and Immunity 1996] [Van Wart HE, Anal Biochem 1981,]. La sequenza proteica delle regioni catalitiche delle collagenasi batteriche è simile tra quelle del *Clostridium* e del *Vibrio* [Takeuchi H Biochem 1992 ], ma è del tutto differente da quella dei mammiferi [Yoshihara K, J Bacteriol 1994]. Il sito di legame col collagene è però differente sia da quello della collagenasi del *Vibrio* che da quello dell'omologa umana: la collagenasi del *Clostridium* contiene un dominio tandem di legame per il collagene che ne lega molti tipi senza specificità per il diametro delle fibre, mentre quella dei mammiferi esprime alta affinità solo per differenti tipo di collagene [Ravanti L, Int J Mol Met 2000].

- Collagenasi del *Clostridium Histolyticum*. *Clostridium Histolyticum* è un batterio patogeno anaerobio che causa la gangrena gassosa oltre ad altre patologie come le cheratiti batteriche [Bond MD, Biochemistry 1984]. Tutti i ceppi di questo batterio producono collagenasi utilizzate come mezzo di invasione e di ottenimento di sostanze proteiche a fini metabolici [Supran CT, Med Res Rev 2002,]. Esistono almeno sette isoenzimi isolati con peso molecolare compreso tra 68 e 130 kDa purificati dalle colture [34]; essi sono classificati in classe I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ) e classe II ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\xi$ ) in base alle loro attività degradative verso i vari tipi di collagene [Bond MD, Biochemistry 1984,]. Questi enzimi sono noti come tra i più efficienti sistemi di degradazione della matrice connettivale poiché clivano la

tripla elica del collagene quando esposti a condizioni fisiologiche assieme a molte altre proteine di matrice. Gli eventi proteolitici, in particolar modo verso il collagene I, II e III sono stati delineati con buona chiarezza: l'enzima lega il collagene nel sito reattivo localizzato sui legami Yaa-Gly all'interno della sequenza ripetuta Gly-Xaa-Yaa. La reattività di questi siti è legata alla conformazione del ripiegamento del collagene più che alla sua sequenza; la collagenasi, in contrasto con gli enzimi omologhi dei mammiferi, degrada il collagene in piccoli peptidi [Jung W, Clin Drug Invest 1998]. (Fig. 8)

- Collagenasi del *Vibrio Alginolyticus*. *Vibrio Alginolyticus* è un batterio non patogeno isolato da pellicce di animali capace di degradare il collagene in condizioni aerobiche in maniera più rapida di ogni collagenasi dei mammiferi. La collagenasi responsabile di quest'azione è un enzima di 82 kDa contenente un sito attivo Zn dipendente ed agisce inizialmente come le MMPs, attaccando il collagene a tre quarti della sua lunghezza partendo dall'N-terminale, ma il sito di clivaggio è differente poiché la collagenasi del *Vibrio* lega e taglia la proteina a livello di Xaa- Gly mentre le MMPs clivano tra Gly-Ile o Gly-Leu. (Fig. 3). L'uso della collagenasi ottenuta da *Vibrio* è simile a quello della collagenasi da *Clostridium*, poiché possono essere utilizzate con applicazioni cliniche nel debridement delle ferite e delle ulcere grazie alla forte specificità nei confronti del collagene tissutale [Harding KG, Clin Drug Invest 1996] e alla capacità di stimolare la chemotassi e la proliferazione di macrofagi, fibroblasti e cheratinociti.

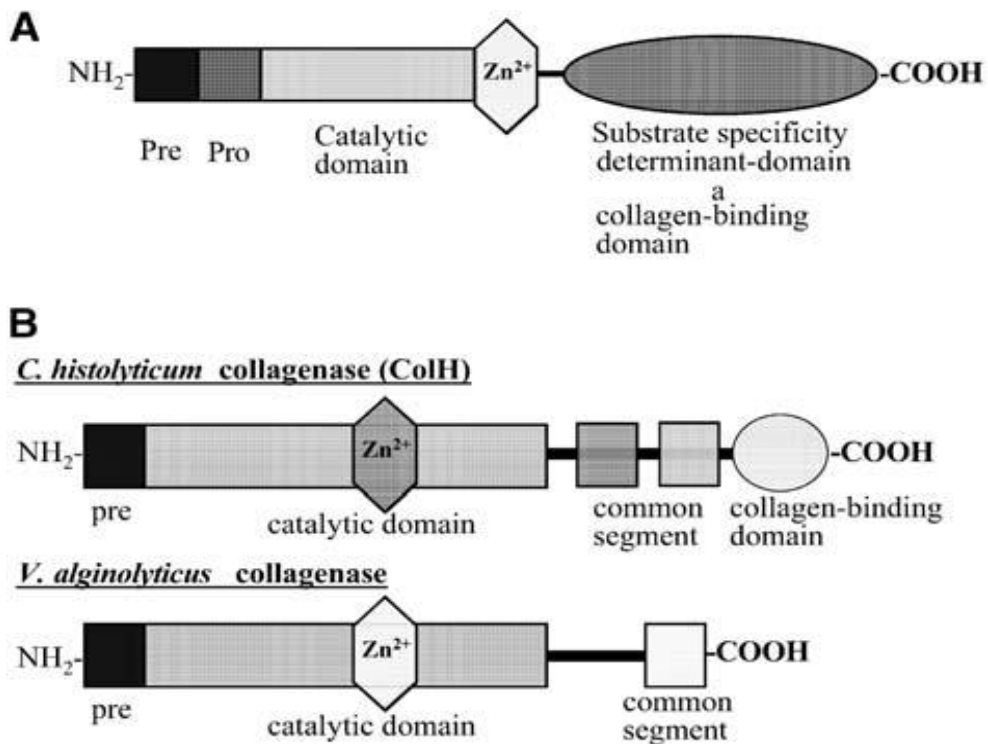


Figura. 3. Tipica struttura delle collagenasi dei mammiferi (A) e dei batteri *Clostridium Histolyticum* e *Vibrio Alginolyticus* (B). (da Watanabe K: *Collagenolytic proteases from bacteria. Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 63: 520-526.)

### Malattie fibroproliferative delle fasce

Le malattie fibroproliferative delle fasce (malattia di Dupuytren, malattia di La Peyronie, malattia di Ledderhose) appartengono ad un gruppo omogeneo per fattori di rischio e fisiopatologia. Sono caratterizzate dall'ispessimento fibrotico di una fascia causato dalla deposizione di matrice extracellulare ricca in collagene I e III da parte di fibroblasti modificati chiamati miofibroblasti, dotati della capacità contrattile che causa la retrazione della stessa fascia esitando in deformità della mano, del pene o del piede. Verrà analizzata in maniera più completa rispetto alle altre due e considerata come paradigma fisiopatologico la malattia di Dupuytren, della quale verranno illustrate approfonditamente patogenesi, aspetti clinici e terapie disponibili.

## **Malattia di Dupuytren**

La malattia di Dupuytren è una malattia fibroproliferativa progressiva della fascia palmare superficiale della mano. Dal 1614, anno in cui Plater scrisse il primo rapporto chirurgico su questa patologia, furono postulate teorie secondo le quali le entità anatomiche substrato della patogenesi erano i tendini flessori delle dita, ma nel corso del 1800 Dupuytren e Sanson dimostrarono il coinvolgimento principale dell'aponevrosi palmare superficiale [Badalamante MA, . J Hand Surg 2007] [Shaw RB Jr, Plast Reconstr Surg 2007]. Nonostante questa patologia sia nota e studiata da almeno quattro secoli, l'eziologia e la patogenesi non sono ancora ben chiare. Ciò che è certo è che la deposizione anomala di collagene in questa sede conduce ad una limitazione funzionale viziosa delle dita della mano che vengono a flettersi verso il palmo, causando deficit nella capacità di estensione. La progressione della malattia non è prevedibile e non è simile in tutti i casi, ma assume diverse forme a seconda che venga interessata solo la regione palmare oppure siano coinvolte anche le dita; in alcuni casi si riscontrano solo noduli sottocutanei in corrispondenza della fascia palmare, in altri invece la flessione coatta delle dita è massima (Fig. 4). Ciò comporta quindi un rischio di grave invalidità nello svolgimento delle normali attività quotidiane, con una limitazione funzionale che rende molte azioni impossibili da realizzare.



*Figura 4:Retrazioni fibrose delle dita nella malattia di Dupuytren.*

## Epidemiologia

La malattia di Dupuytren colpisce popolazioni appartenenti a tutte le etnie, ma presenta un picco di incidenza negli uomini del Nord-Est Europa [Brown JJ, Tissue Antigens 2008] ed una minor prevalenza nella razza nera. Si ritiene che sia una patologia genetica a trasmissione autosomica dominante con penetranza estremamente variabile originatasi tra le popolazioni celtiche del nord-est Europa e successivamente disseminatasi a causa delle migrazioni (Figura. 5). Colpisce maggiormente gli uomini delle donne (rapporto di 6 a 1) tra i 50 e 70 anni, anche se durante la nona decade l'incidenza viene ad equilibrarsi. La gran parte dei pazienti affetti presenta una familiarità per la ricorrenza della malattia e si identificano come Diatesi di Dupuytren i casi in cui si evidenzia una forte predisposizione allo sviluppo delle contratture [84].



*Figura 5. Evoluzione epidemiologica della malattia di Dupuytren*



## **Fisiopatologia**

L'origine e la progressione della patologia sono dovute alla deposizione di collagene di tipo I e soprattutto III da parte di fibroblasti modificati chiamati miofibroblasti, dotati di un'attività contrattile che conduce alla progressiva retrazione della fascia palmare. Il miofibroblasto è una cellula altamente differenziata; la sua contrattilità è dovuta allo scorrimento reciproco di ponti di actina intracellulari, associati tramite ponti transmembrana alla matrice extracellulare, tipici anche di altre specie cellulari come cellule muscolari lisce e fibroblasti [Desmoulière A, Cell Biol Int 1995] e si distingue per l'espressione di proteine contrattili come l' $\alpha$  SMA. Esistono collegamenti tra i miofibroblasti tissutali realizzati da gap junction e tra essi e la matrice attraverso strutture di ancoraggio denominate fibronexus, che permettono il collegamento tra fibrille di actina intracellulare con fibre di fibronectina di matrice [Desmoulière A, Wound Repair Regen 2005]. Tali cellule costituiscono la quasi totalità delle cellule presenti nella prima fase di malattia e durante l'evoluzione del nodulo verso la retrazione fibrosa si allineano lungo linee di forza longitudinali: in questo momento viene a diminuire il loro numero ma aumenta notevolmente la componente proteica extracellulare (soprattutto la quantità di collagene III) [Brickey-Parsons D, J Bone Joint Surg 1981]. L'eziologia e la causa della proliferazione fibroblastica sono tutt'ora sconosciute ma si ritiene che il traumatismo, l'attività lavorativa manuale, la predisposizione genetica, il fumo di sigaretta, l'abuso alcolico, l'epilessia, alcune patologie metaboliche come il diabete mellito siano fattori predisponenti, agenti mediante la rottura cronica di fibrille collagene dell'aponevrosi, fenomeno che ne induce la risintesi e il rimodellamento. E' dimostrato che esiste una up-regulation genetica nelle cellule mesenchimali delle corde fibrose riguardante soprattutto i geni di fibronectina, tenascina C, TGF beta,2, collagene III, IV, VI: sono tutti geni implicati nel rimodellamento e nell'organizzazione della matrice extracellulare.

## Presentazione clinica

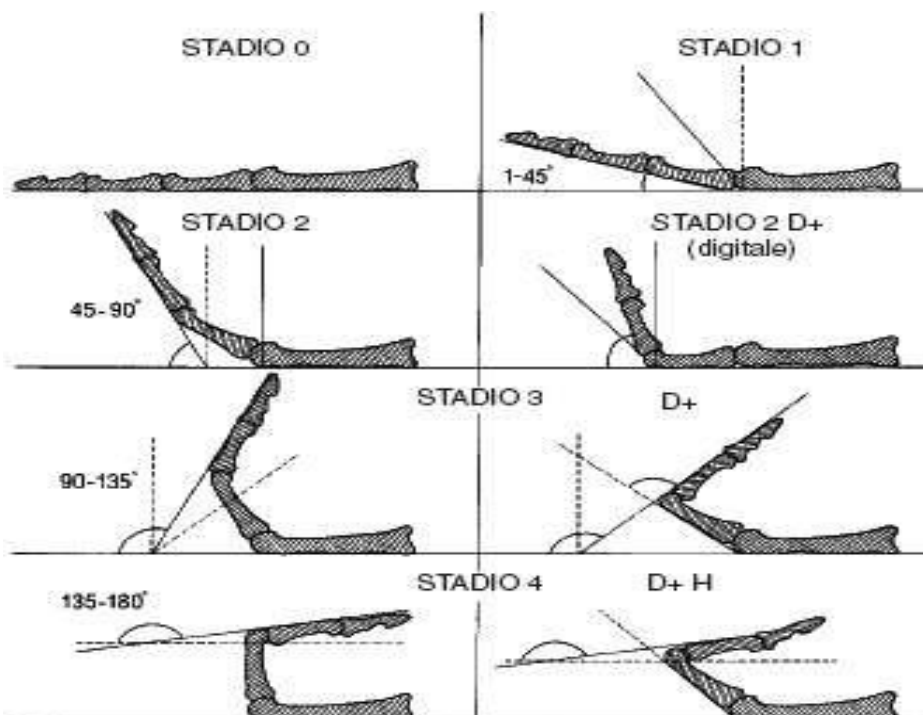
La malattia di Dupuytren è una patologia deformante fibroproliferativa della fascia palmare caratterizzata da differenti stadi clinici:

- Fase precoce. Si evidenziano cambiamenti della morfologia cutanea con perdita della normale architettura tissutale, tensione, rugosità, ombelicate. Successivamente avviene la formazione di uno o più noduli sottocutanei fissi, tondeggianti, originanti dalle componenti superficiali della fascia palmare o digitale, spesso a livello della piega palmare traversa distale in asse longitudinale con il corrispondente dito [Mawhinney I, In The Hand, Suanders WB, 1999]. Tali noduli sono solitamente indolori ma possono arrecare sintomatologia algica se sottoposti a pressione [Leclercq C, Martin Dunitz Ltd, London, 2000]; sono inoltre particolarmente ricchi di miofibroblasti e collagene e possiedono un buon apporto vascolare.
- Fase intermedia. I noduli tendono a regredire spontaneamente lasciando spazio alla formazione di una corda fibrosa tesa sotto la superficie cutanea; in alcuni casi tuttavia la corda può svilupparsi senza associarsi alla regressione dei noduli.
- Fase matura. La corda contiene radi miofibroblasti, ma molte fibre collagene di tipo I e III e si localizza al palmo, nell'area palmo-digitale o nella regione digitale ed è facilmente palpabile. Durante questa fase si realizza una flessione coatta delle articolazioni metacarpofalangea e interfalangea prossimale, con una secondaria contrazione delle strutture capsulo-ligamentose dovuta alla trazione della corda stessa che assume, in questa fase, la denominazione di pseudo tendine [91].

La malattia di Dupuytren si classifica secondo Tubiana (Figura. 6) in base al grado di flessione raggiunto dal raggio digitale interessato:

- grado 0 quando esiste solamente il nodulo palmare e non la corda
- grado 1 quando la flessione del dito si attesta tra  $0^\circ$  e  $45^\circ$
- grado 2 quando la flessione del dito si attesta tra  $45^\circ$  e  $90^\circ$
- grado 3 quando la flessione del dito si attesta tra  $90^\circ$  e  $135^\circ$
- grado 4 quando la flessione del dito si attesta tra  $135^\circ$  e  $180^\circ$ .

*Figura 6. Classificazione clinica di Tubiana della malattia di Dupuytren*



## Terapia

La terapia della malattia di Dupuytren è duplice: da un lato esiste il classico approccio chirurgico, dall'altro le nuove applicazioni incruente consistenti nell'uso delle collagenasi. Il trattamento non è però sempre curativo poiché sono molto frequenti le recidive e le neoformazioni di corde in sedi differenti della stessa mano o dell'omologa controlaterale.

- **Chirurgica**

La terapia chirurgica mira ad ottenere risultati in termini di correzione della deformità e miglioramento della funzionalità della mano, a diminuire i tassi di complicanze tipiche dell'intervento, ad abbreviare il recupero postoperatorio e a garantire una buona profilassi per le recidive. (Figura. 7)

*La fascectomia regionale è la metodica più diffusa [Hueston JT. Plast Reconstr Surg 1961,] e prevede l'esecuzione di un'incisione longitudinale, con escissione delle fibre longitudinali retratte della fascia palmare il più prossimalmente possibile. (Figura. 7)*

*Figura 7. Corda di Dupuytren durante intervento di aponevrectomia regionale*

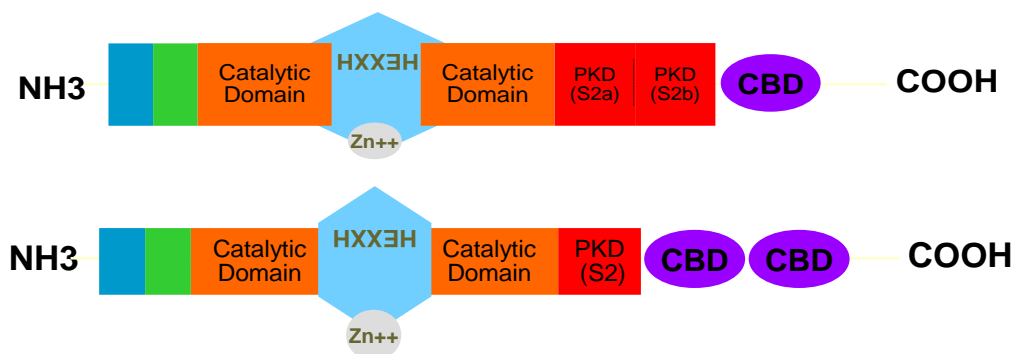


## **Enzimatica**

La terapia enzimatica della malattia di Dupuytren rappresenta una valida alternativa all'approccio chirurgico, poiché presenta molteplici vantaggi. Innanzitutto permette di evitare l'intervento chirurgico che, in questi pazienti, rappresenta un'eventualità molto invasiva; ha la caratteristica di poter essere ripetuta senza provocare eccessivo disagio al paziente e garantisce infine di poter trattare anche pazienti che, per scelte personali o problematiche dovute a comorbidità, non possono accedere alle liste operatorie.

### ***Tipo di collagenasi***

Attualmente viene utilizzata una miscela di due enzimi appartenenti alla famiglia delle metalloproteinasi, codificate da due geni distinti (ColG e Col H), ottenuta da terreni di coltura di *Clostridium Histolyticum* [26] [28] (AA4500): AUX-I (*Clostridium collagenasi* tipo I) di circa 1000 aminoacidi con peso 114 kDa e AUX II (*Clostridium collagenasi* tipo II) di circa 1000 aminoacidi con peso di 113 kDa. Differiscono l'una dall'altra per struttura, affinità per il substrato, efficienza catalitica e sito preferenziale di clivaggio mostrando il pattern di attività tipico delle classi di collagenasi I e II rispettivamente. (Figura.8).



**Figura 8: Struttura delle collagenasi AUX I e AUX II**

Non sono stati riscontrati effetti locali a livello di vasi, nervi o strutture epiteliali o mesenchimali adiacenti alla corda fibrosa; queste collagenasi non appaiono immunologicamente reattive, non hanno un assorbimento sistemico significativo e presentano un'azione sinergica quando sono utilizzate in associazione rispetto all'uso singolo. L'attività catalitica delle collagenasi necessita della presenza di un enzima intatto nella miscela, dotato di entrambi i siti di legame e catalitico, nonché di un'adeguata presenza di cofattori metallici come Zn e Ca: il primo è fondamentale per l'attività catalitica della collagenasi, il secondo permette di mantenere i siti di legame per il collagene fibrillare in forma attiva [Matsushita O, . J Biol Chem 1998] [Wilson JJ, EMBO J 2003].

### ***Farmacologia***

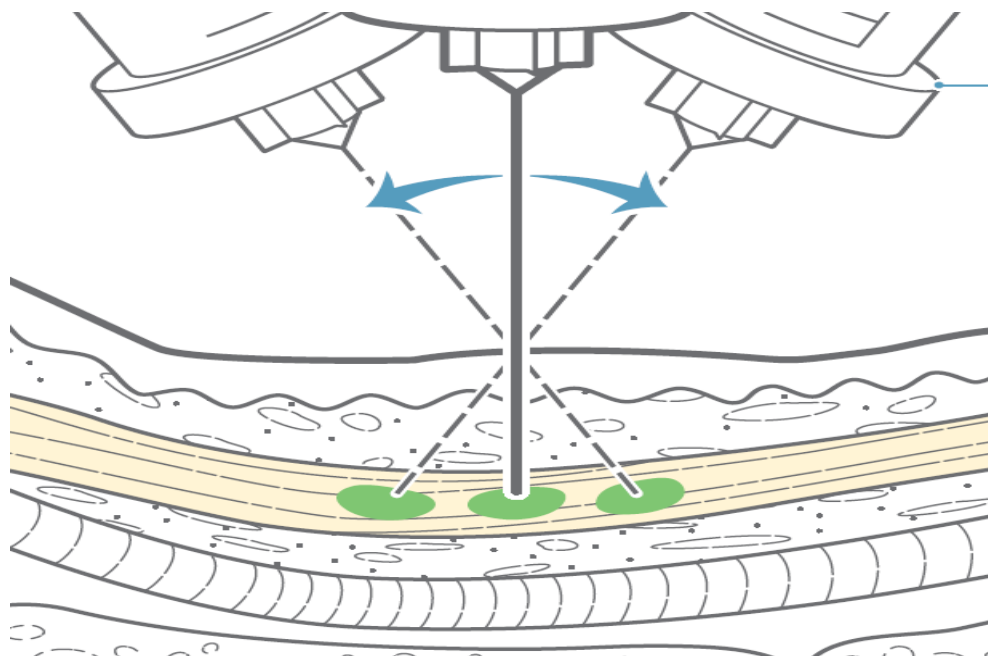
AA4500 non subisce assorbimento sistemico significativo dopo l'iniezione locale, non presenta interazioni con altri farmaci per la mancanza di metabolismo epatico e non è soggetta a meccanismi particolari di escrezione poiché non è significativamente rilevabile nel circolo ematico [Hurst LC, Engl J Med 2009]. È stato però dimostrato che nel caso sia assorbita, seppur in minima quantità, viene concentrata efficacemente nelle urine. La forma attiva della miscela di collagenasi è quella nativa somministrata, per cui non è necessaria un taglio proteolitico attivatorio dopo la sua iniezione.

### ***Benefici***

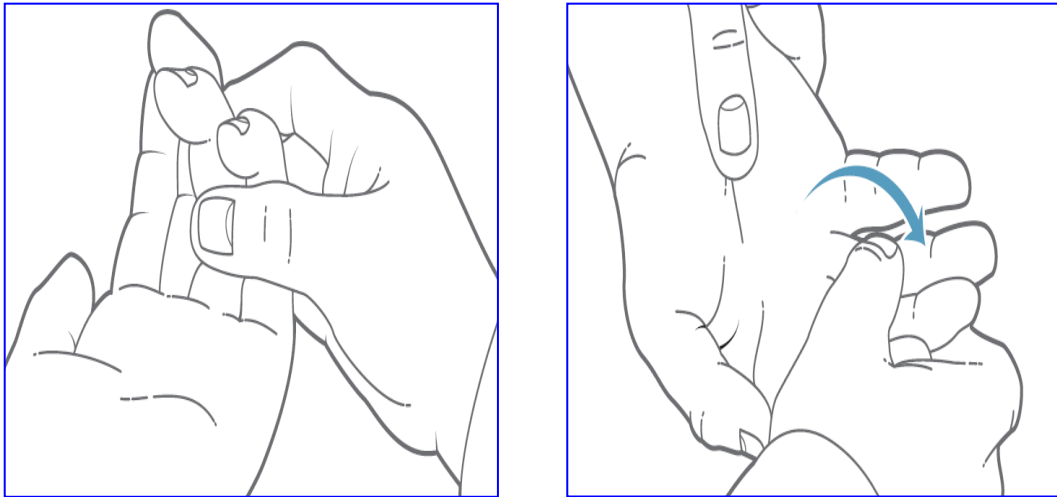
L'utilizzo di AA4500 ha permesso di ottenere un'ottima riduzione delle contratture iniziali, un aumento della ROM senza un impatto negativo sulla forza e una riduzione del tempo necessario per evidenziare gli esiti positivi della correzione. Considerato il fatto che la ricorrenza post chirurgica di malattia arriva anche al 60% dei casi, l'uso di tecniche enzimatiche permette la ripetibilità del trattamento senza dover esporre il paziente ai rischi e alle conseguenze dell'intervento chirurgico [Rodrigo JJ, Bone Joint Surg; 1976]. Questo metodo è quindi sicuro, efficace, meno invasivo rispetto alla chirurgia, possiede miglior rapporto costo/beneficio e ha un alto grado di soddisfazione tra i pazienti.

### ***Modalità di utilizzo***

AA4500 viene somministrata tramite iniezione nella corda fibrosa della fascia palmare (Figura 9); dopo 24 ore dalla somministrazione viene eseguita una manipolazione estensoria del dito al fine di facilitare la rottura della fascia palmare retratta nei soggetti in cui non si sia verificata spontaneamente (Figura 10).



***Figura 9. Modalità dell'iniezione della collagenasi nel contesto della corda fibrosa.***



**Figura 10. Manipolazione estensoria del dito a 24 ore dall'iniezione.**

Nel caso in cui dopo 4 settimane non si sia evidenziata la risposta alla collagenasi, è possibile reiniettare il prodotto nella corda ed effettuare la conseguente manipolazione dopo 24 ore.

### ***Effetti collaterali***

Gli effetti avversi della terapia enzimatica consistono essenzialmente in reazioni locali causate dall'azione del farmaco e dal trauma dell'iniezione quali edema, dolore, ecchimosi ed occasionalmente linfadenopatia ascellare o cubitale [McFarlane R, Churchill Livingstone 1990]. Vengono tutti risolti in breve tempo e sono ben tollerati dai pazienti. Non sono state ritrovate reazioni allergiche dovute all'iniezione della collagenasi, ma nella gran parte dei pazienti son ritrovati anticorpi contro AUX-1 e AUX-2 anche se non di tipo IgE.



## **SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo di questo lavoro di tesi è rappresentato dallo studio in vitro e su campioni biologici dell'attività della collagenasi ottenuta da colture di *Vibrio Alginolyticus* e dalla successiva valutazione delle prospettive cliniche di tale prodotto nella terapia delle malattie fibroproliferative delle fasce, in particolar modo in chirurgia della mano per la malattia di Dupuytren. Si desidera analizzare l'efficacia di questa collagenasi nell'esercitare una digestione dei collagene tipo I e III dapprima in vitro, poi in campioni biologici attraverso la sua iniezione nel tessuto della corda fibrosa della malattia di Dupuytren prelevata in sala operatoria. Tutti i campioni verranno sottoposti a indagine istologica per valutarne le peculiarità microscopiche e l'effetto degradativo dell'enzima. Saranno valutate le eventuali applicazioni cliniche della collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* nel campo delle malattie fibroproliferative delle fasce, tenendo presente in particolar modo lo stato dell'arte in chirurgia della mano nella terapia della malattia di Dupuytren.

## **MATERIALI E METODI**

Il lavoro sperimentale della tesi è stato suddiviso in due tempi: la prima parte dello studio è consistita nel produrre la collagenasi valutandone la purezza, nel verificare in vitro la degradazione del collagene da parte dell'enzima e nel misurare la grandezza dei frammenti. Nella seconda parte ci si è occupati della sperimentazione in campioni biologici iniettando la collagenasi nel tessuto della corda fibrosa tipica della malattia di Dupuytren dapprima senza applicare altri trattamenti, successivamente sottoponendola a due tipi di stress meccanico o a contemporanea iniezione con EDTA.

## Tipo di Collagenasi utilizzata

La collagenasi utilizzata proviene da colture di *Vibrio Alginolyticus*; la sua sequenza di DNA ha numero d'accesso X62635 presso NCBI Genbank e la sua sequenza proteica ha numero d'accesso AAZ06360 presso NCBI Protein.

## Studio su campioni biologici

### Prelievo delle corde fibrose

In sede di intervento sono state prelevate le corde fibrosa dalle mani di pazienti affetti da malattia di Dupuytren destra sottoposti a intervento di aponevrectomia (Figura 11).



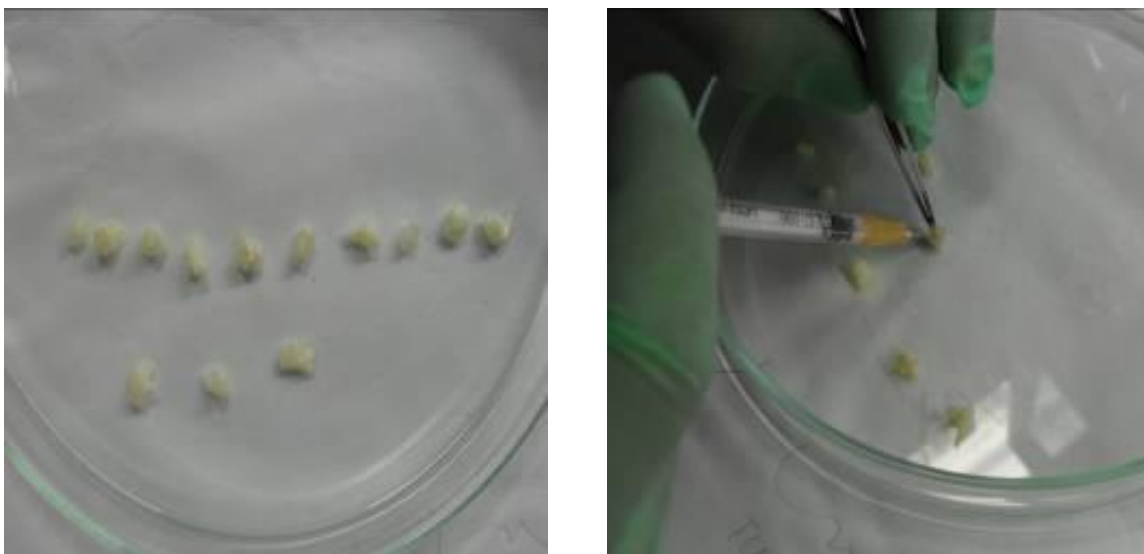
*Figura 11. Prelievo della corda fibrosa durante un intervento di aponevrectomia in un paziente con malattia di Dupuytren e inserimento in provetta con soluzione fisiologica*

Il primo campione è stato diviso in due parti, una inserita in una provetta contenente soluzione fisiologica e l'altra inserita in una provetta contenente formalina, mentre i campioni raccolti durante gli interventi successivi sono stati inseriti in provette contenenti soluzione fisiologica; in tutte le occasioni, si sono iniziate le procedure di lavorazione in laboratorio un'ora dopo l'intervento.

### **Preparazione del campione ed iniezione della collagenasi**

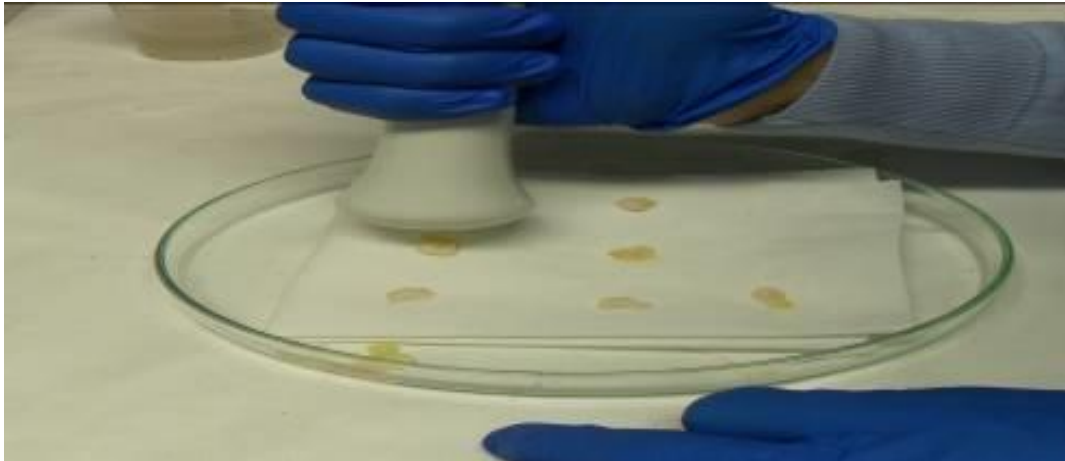
I campioni di corda fibrosa conservati in soluzione fisiologica sono stati tagliati inizialmente in pezzi di 5 mm e quindi sono stati iniettati, utilizzando una siringa da insulina, 20  $\mu$ l di collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* per ogni pezzo (Figura 12).

*Figura 12. Campioni di 5 mm tagliati sulla piastra Petri e loro iniezione con 20  $\mu$ l di collagenasi.*



Altri pezzi sono stati tagliati, ma sono stati sottoposti a un procedimento differente: le loro dimensioni erano di 5 mm e su di essi è stata effettuata una moderata azione traumatizzante verticale con un pestello da laboratorio; successivamente sono stati iniettati anche in essi 20  $\mu$ l di collagenasi derivata da *Vibrio Alginolyticus* (Figura 13).

*Figura 13. Azione traumatizzante verticale con pestello sui campioni di 5 mm di corda fibrosa prima dell'iniezione della collagenasi*



Altri campioni di 5 mm sono stati tagliati da altre corde fibrose e sottoposti a un diverso processo traumatizzante, imprimendo una forza compressiva-distensiva longitudinale con il manico di un pestello da laboratorio; al termine sono stati iniettati anche in essi 20 $\mu$ l di collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* (Figura 14).



*Figura 14: Azione traumatizzante con manico di pestello sulle corde fibrose in modo da provocare uno stress meccanico distensivo longitudinale.*

Altri campioni di 5mm sono stati tagliati da corde fibrose e in essi sono stati iniettati 20 $\mu$ l di EDTA o 20 $\mu$ l di EDTA + 20 $\mu$ l di collagenasi da *Vibrio Alginolyticus*. I campioni così ottenuti sono stati posti singolarmente in contenitori e sono stati inseriti in formalina a gruppi di tre dopo 3, 6, 12, 24 e 30 ore, in modo da bloccare l'azione enzimatica della collagenasi. Il campione inizialmente inserito in formalina è stato tagliato e sottoposto al processo di inclusione per il successivo confronto istologico, fungendo da controllo nei confronti dei campioni trattati con collagenasi.

### **Fissazione, inclusione e colorazione dei campioni.**

I contenitori con i campioni di corda fibrosa solo iniettati e quelli sottoposti ai due tipi di stress meccanico o all'iniezione con EDTA sono stati inviati al processo di preparazione per l'esame istologico; i campioni sono stati posti a bagni progressivi in: formalina 10% per 2-4 ore (fino a 12 ore), etanolo 70% per 1 ora, etanolo 80% per 45 minuti, etanolo 95% per 45 minuti, etanolo 100% per 45 minuti, xilolo 45 minuti, xilolo in stufa a 60°C per 45 minuti, xilolo + paraffina 1:1 in stufa a 60 °C per 1 ora, paraffina pura liquida 1 ora e riposo in frigo per 24 ore. Successivamente i campioni di corda di Dupuytren sono stati tagliati al microtomo e preparati per la colorazione. Si è proceduto alla sparaffinatura al fine di permettere le colorazioni Azan Mallory, immunoistochimica per collagene I, III inserendo i campioni in: xilolo per 3-4 minuti, alcool 100% per 4 minuti, alcool 95% per 2 minuti, alcool 80% per 2 minuti e infine in acqua per 5 minuti. I campioni sono stati quindi sottoposti a colorazione Azan-Mallory eseguita tramite i seguenti passaggi: dopo riscaldamento a 60° del colorante azocarminio si è acidificato con acido acetico 1%, si sono inseriti i vetrini per 10 minuti valutandone la colorazione al microscopio ottico, si è lavato quindi con acqua distillata, eseguito passaggio in olio di anilina 0.1 % e alcool 95% per 30 secondi e controllo microscopico. Effettuato un passaggio in alcool acidulato 95% + acido acetico 1%, i campioni sono stati immersi in acido fosfotungstico al 5% per 30 minuti e quindi sono stati lavati con acqua distillata. Aggiunta la miscela del colorante Mallory, dopo dieci minuti sono stati lavati con acqua distillata ed è stata controllata la

colorazione          previa          differenziazione          in          alcool          95.

I campioni sono stati disidratati con alcool 100% cinque minuti per due volte e quindi inseriti in xilolo cinque minuti per due volte; infine i vetrini sono stati fissati con balsamo e coperti con vetrino copri oggetti. Altri campioni sono stati sottoposti a colorazione immunoistochimica volta ad evidenziare il collagene di tipo I e di tipo III eseguita tramite i seguenti passaggi: le sezioni paraffinate sono state stese sui vetrini e circondate con PAP PEN, quindi si è proceduto ad incubare in camera umida il siero di rabbit per 20 minuti (diluito 1:20 in PBS-phosphatase buffered saline) e successivamente si è tolto il siero e incubato l'Ab I isolato in mouse per 1 ora. Si sono lavati i vetrini con PBS e incubati con Ig rabbit anti mouse per 30 minuti (diluite 1:25 in PBS) e quindi lavati nuovamente con PBS. Sono stati incubati con APAAP per 30 minuti e lavati delicatamente con PBS, quindi incubato il substrato FAST RED per 20 minuti e lavati con acqua distillata. Si sono colorati i nuclei delle sezione con Ematossilina per pochi minuti ed è stato rimosso l'eccesso di colorante con acqua distillata, quindi si è fissato con acqua di fonte e montato il vetrino con montante acquoso (Glycergel). Dopo aver visionato i vetrini ottenuti con le precedenti colorazioni, si è proceduto alla colorazione immunoistochimica per l'osteopontina, eseguita tramite i seguenti passaggi: le sezioni sparaffinate sono state inserite in acqua distillata per 5 minuti, identificate e circondate con PAP PEN, lavate con PBS per 5 minuti e incubate per 20 minuti con blocking normal serum goat diluito 1:50 nella camera umida. Successivamente è stato eliminato l'eccesso di siero e incubate le sezioni con anticorpo I rabbit per 1 ora quindi lavati i vetrini per 5 minuti con PBS e incubate le sezioni per 30 minuti con anticorpo II biotinilato goat antirabbit diluito 1:200 in blocking normal serum goat diluito. In seguito si è lavato per 5 minuti e incubato per 30 minuti con ABC reagent dopo aver diluito il reagente A e il B 1:50 in PBS, si è incubato con il substrato sigma DAB tablets e infine lavato i vetrini con acqua distillata. Sono stati colorati i nuclei immergendo i vetrini in ematossilina per pochi secondi e si è lavato l'eccesso di colorante con acqua distillata fissando poi con acqua di fonte. Infine si sono montati i vetrini utilizzando un montante acquoso (Glycergel).

A seguito della visione dei vetrini colorati con tale metodica, si è provveduto alla colorazione in immunofluorescenza per l'evidenziazione dell'osteopontina, realizzata tramite i seguenti passaggi: le sezioni paraffinate sono state poste in formaldeide al 4x per 20 minuti, quindi inserite in quenching solution per 10 minuti a 0.0075 g/ml. Successivamente i vetrini sono stati posti in soluzione blocco (BSA) per 30 minuti a 1g/50ml, quindi è stato aggiunto l'anticorpo I in BSA per 1 ora e poi l'anticorpo II per 1 ora. Infine si è incubato con Hoest per 10 minuti, quindi si sono montati i vetrini utilizzando un montante acquoso (Glycergel).

### **Analisi del segnale cromatico del collagene III con software ImageJ**

Le immagini istologiche ottenute dall'osservazione al microscopio ad ingrandimenti di 5x, 10x, 20x e 40x sono state tutte fotografate e, per quanto riguarda le sezioni colorate con tecnica immunoistochimica per il collagene III, si è analizzata in modo informatico semiquantitativo la variazione del collagene contenuto nei campioni. Sono stati considerati dieci vetrini contenenti quattro sezioni ciascuno per ogni intervallo orario (controlli, 3 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 30 ore) sottoposti a tale colorazione e per ogni vetrino sono stati esaminati 5 quadrati di 250  $\mu\text{m}$  di lato. La densità cromatica della colorazione immunoistochimica per collagene III è stata misurata con il software ImageJ in modo da ottenere una misura semiquantitativa della variazione del contenuto di collagene nelle sezioni in rapporto alla durata di esposizione alla collagenasi. Questo programma permette di visualizzare, salvare, analizzare e stampare immagini in differenti formati misurando parametri reimpostati dall'operatore realizzando grafici e tabelle.

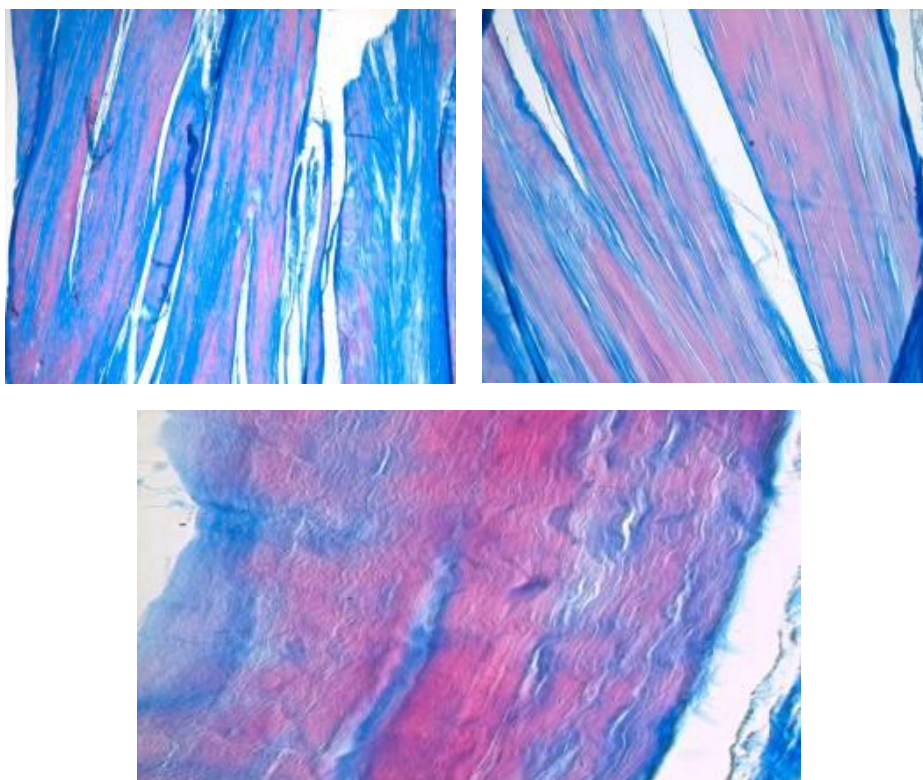
# RISULTATI

## Studio su campioni biologici

L'osservazione dei vetrini contenenti le sezioni sottoposte a colorazione ha evidenziato risultati interessanti per quanto riguarda l'efficacia degradativa della collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* e alcune particolarità istologiche della corda di Dupuytren. Le immagini istologiche dei controlli e dei campioni trattati con le differenti modalità a 3 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore e 30 ore sono state fotografate con ingrandimento di 2.5x, 5x, 10x, 20x e 40x. Di seguito sono riportate le immagini dei controlli e dei campioni a 24 ore dal trattamento ad ingrandimenti 5x, 20x e 40x.

## Iniezione di collagenasi da *Vibrio Alginolyticus*

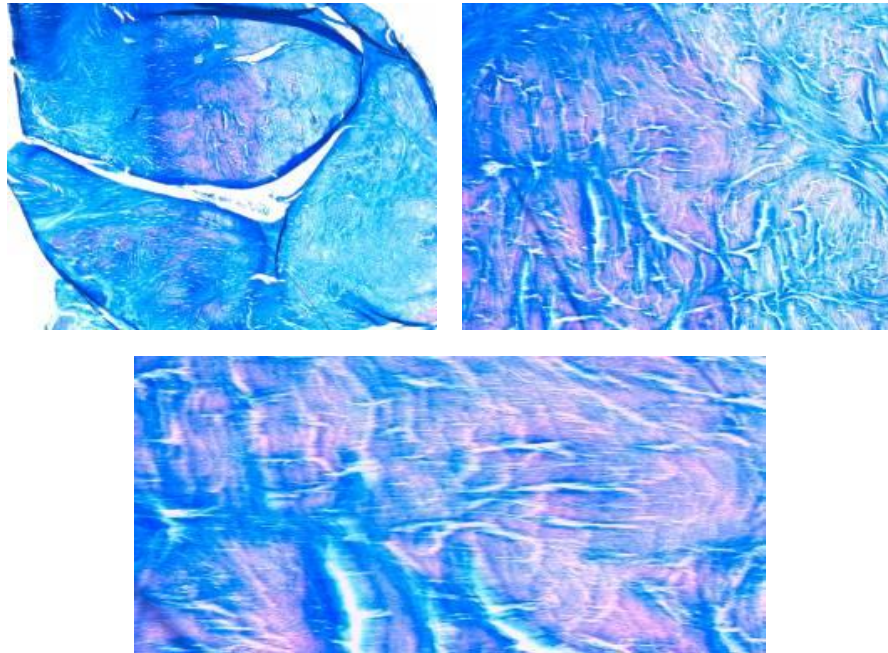
*Colorazione Azan Mallory*



*Figura 15: Corda di Dupuytren non trattata. Colorazione Azan Mallory. Immagini a 5x, 20x,*

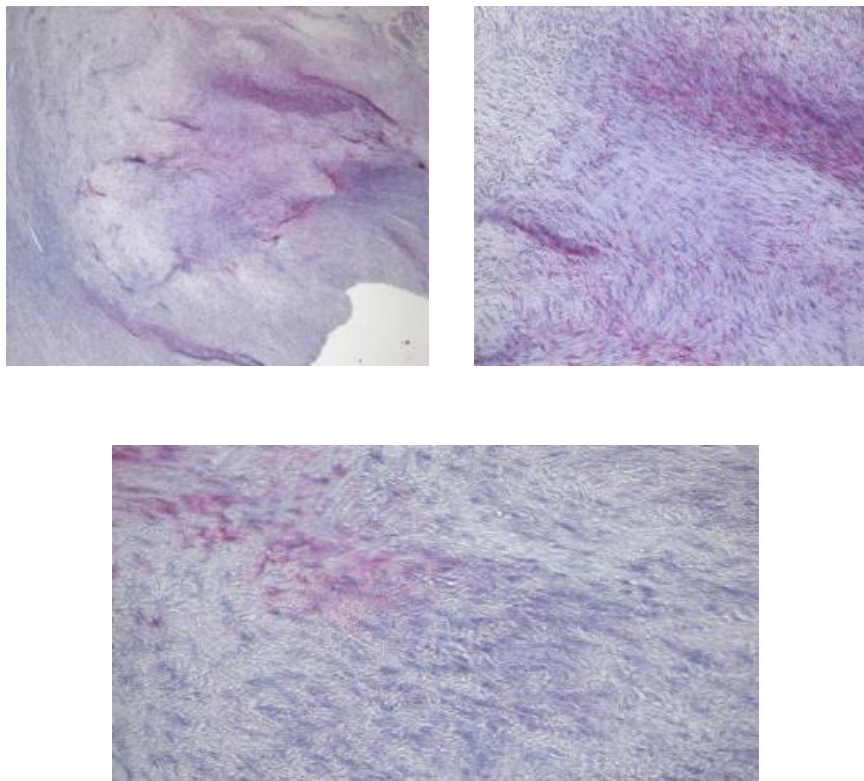
*40x.*





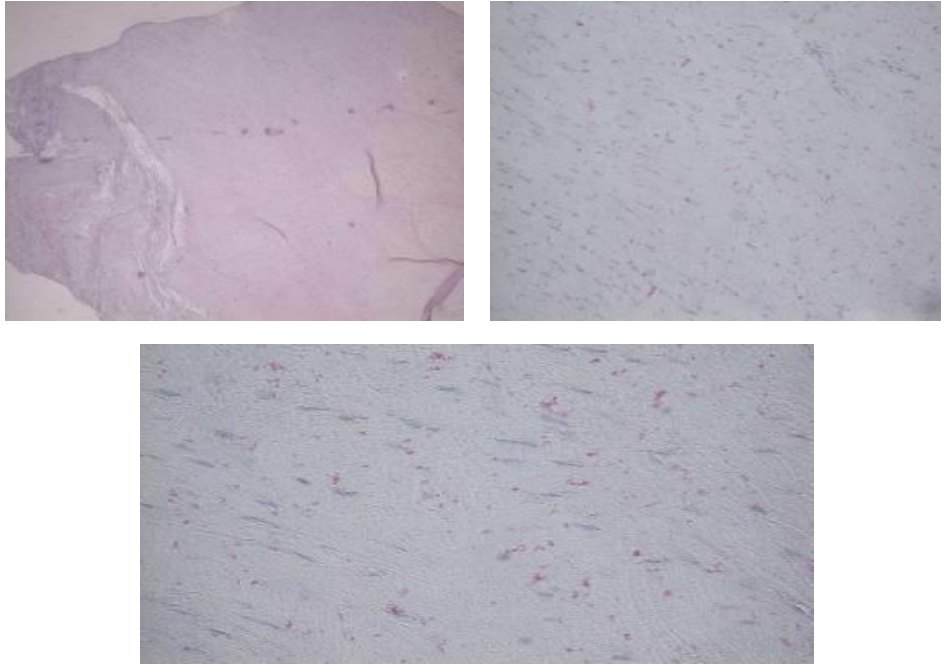
**Figura 16:** Corda di Dupuytren trattata con collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* a 24 ore dall'iniezione. Colorazione Azan Mallory. Immagini a 5x, 20x, 40x.

*Immunoistochimica per collagene*



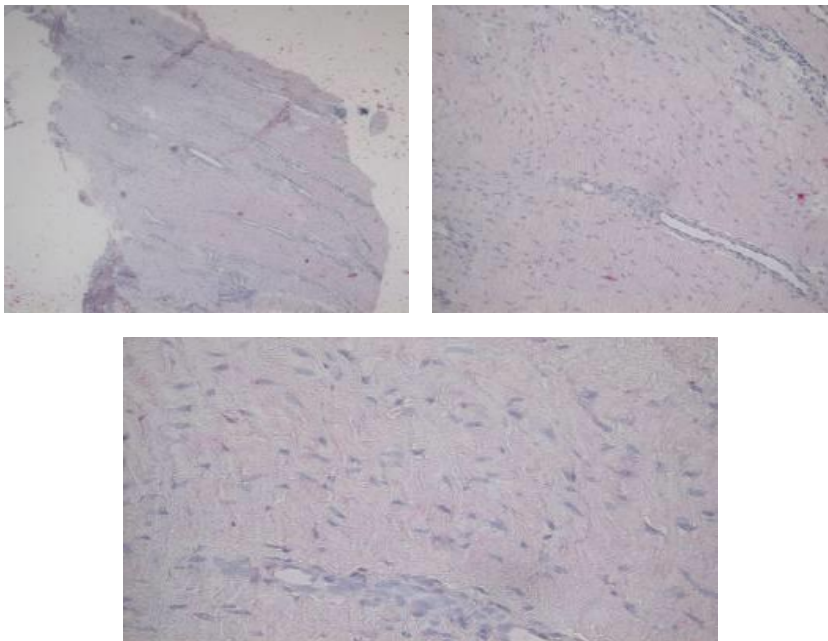
**Figura 17.** Corda di Dupuytren non trattata con collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* .

**Colorazione immunoistochimica per collagene I. Immagini a 5x, 20x, 40x.**



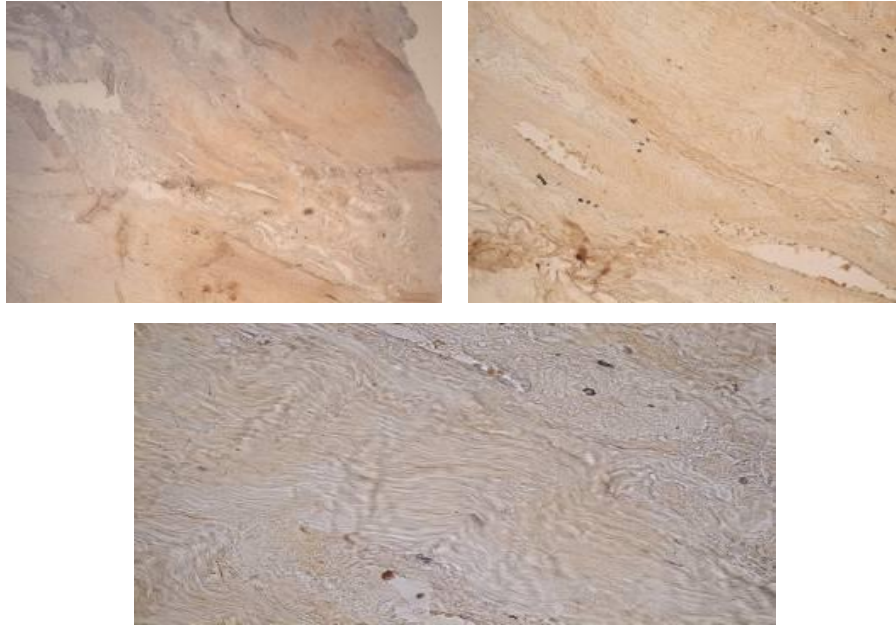
*Figura 18. Corda di Dupuytren trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione. Colorazione immunoistochimica per collagene I. Immagini a 5x, 20x, 40x.*

*Colorazione immunoistochimica per collagene III*

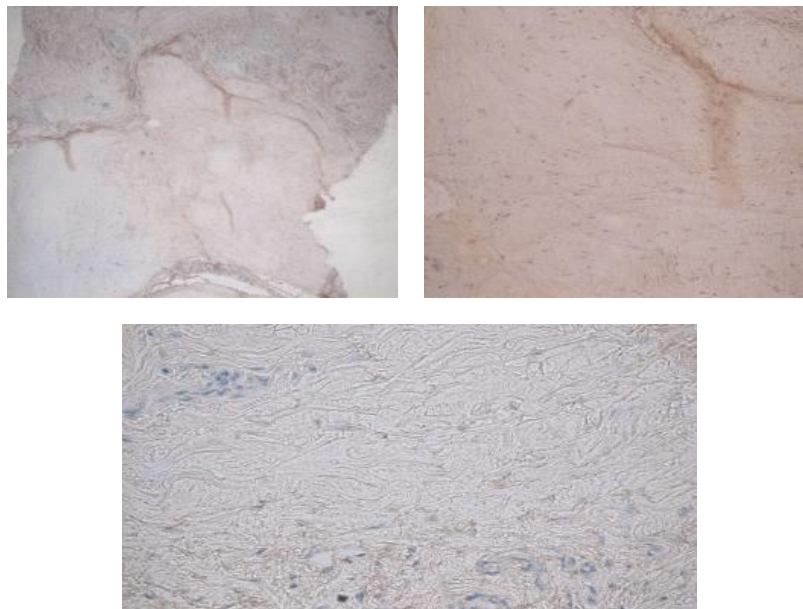


*Figura 19. Corda di Dupuytren non trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus.*

*Colorazione immunoistochimica per collagene III. Immagini a 5x, 20x, 40x*

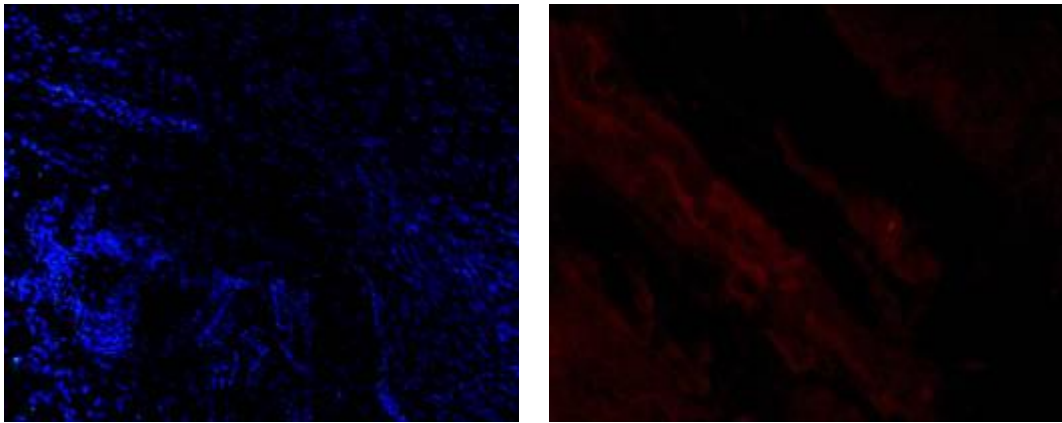


*Figura 20. Corda di Dupuytren trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione. Colorazione immunoistochimica per collagene III. Immagini a 5x, 20x, 40x*  
*Colorazione immunoistochimica per osteopontina*



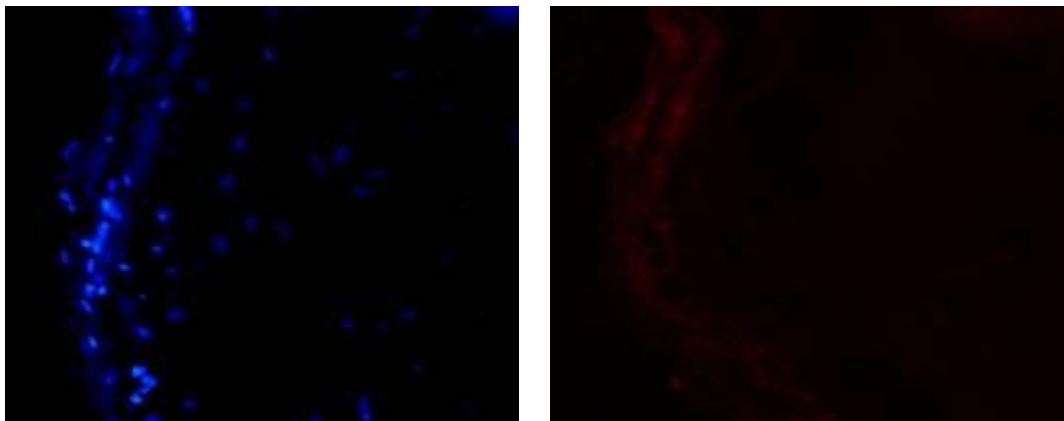
*Figura 21. Corda di Dupuytren non trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus .*  
*Colorazione immunoistochimica per osteopontina. Immagini a 5x, 20x, 40x*

*Immunofluorescenza per osteopontina*



*Figura 22. Corda di Dupuytren non trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus. Immunofluorescenza per osteopontina. Visione con spettro per nuclei e per osteopontina.*

*Immagini a 20x.*

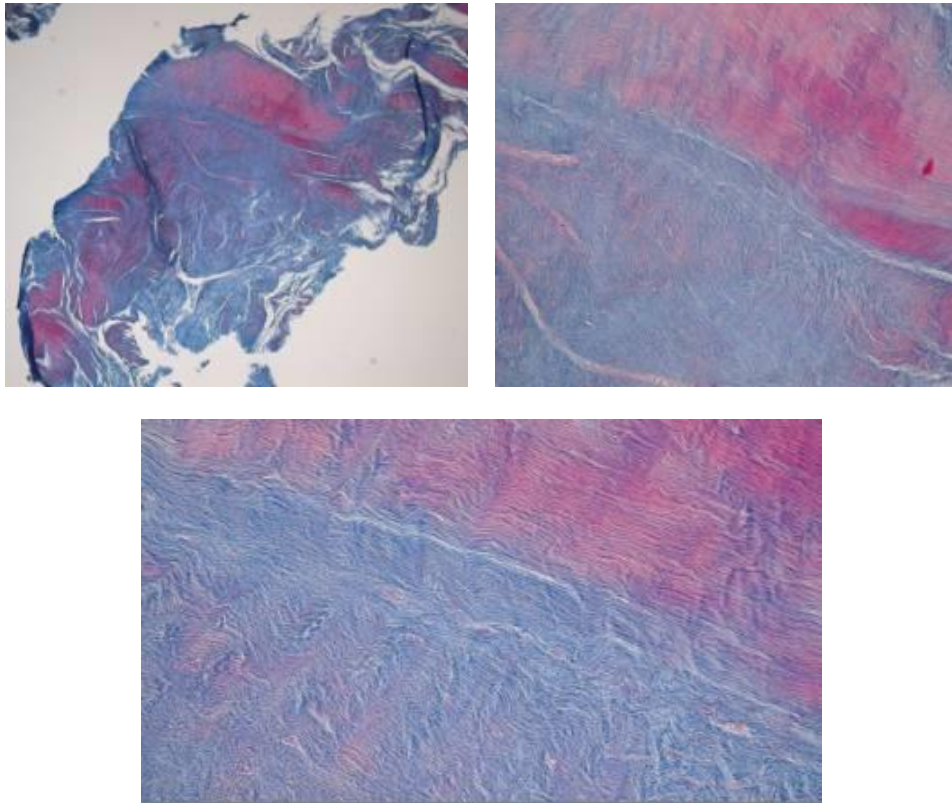


*Figura 23. Corda di Dupuytren trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione. Immunofluorescenza per osteopontina. Visione con spettro per nuclei e per osteopontina. Immagini a 20x*

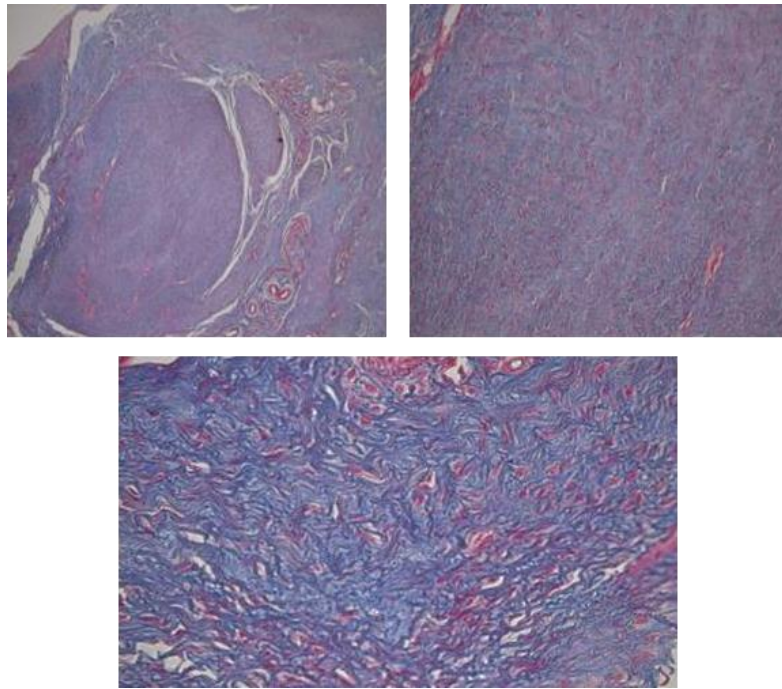
## Compressione verticale intermittente e iniezione di collagenasi da

### **Vibrio Alginolyticus**

*Colorazione Azan Mallory*

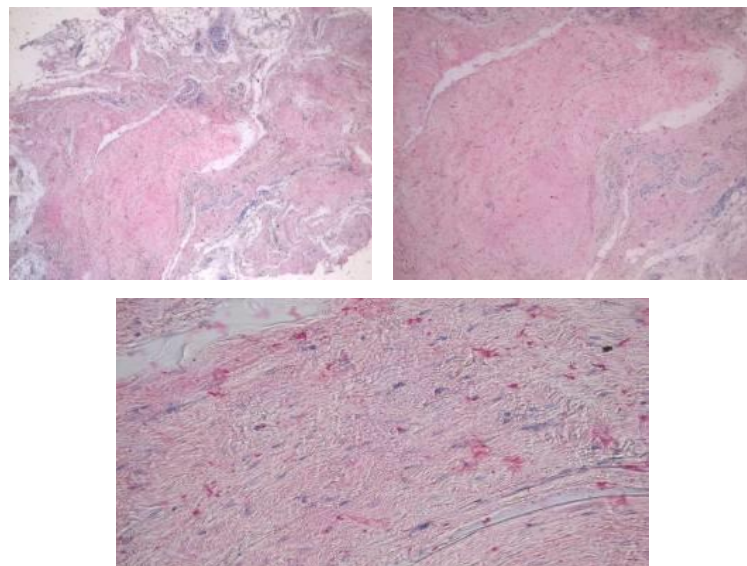


*Figura 24. Corda di Dupuytren compressa in modo intermittente non trattata con collagenasi. Colorazione Azan Mallory. Immagini a 5x, 20x, 40x*

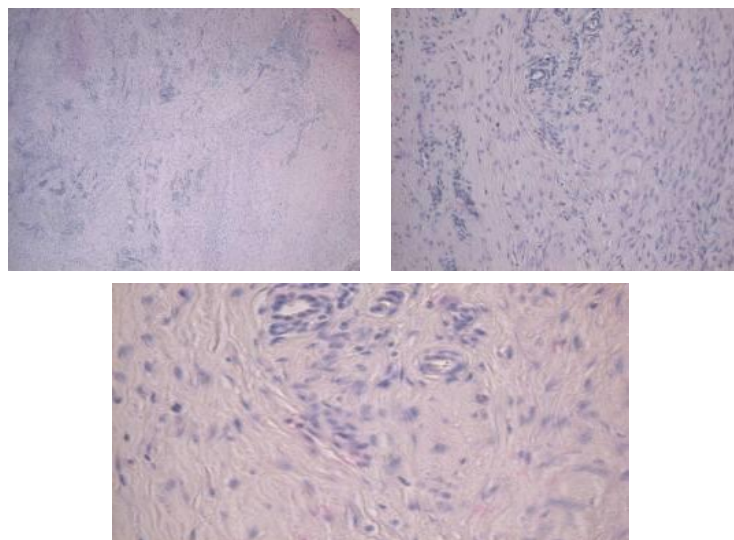


*Figura 25. Corda di Dupuytren compressa in modo intermittente e trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione. Colorazione Azan Mallory. Immagini a 5x, 20x, 40x*

*Colorazione immunohistochimica collagene I*

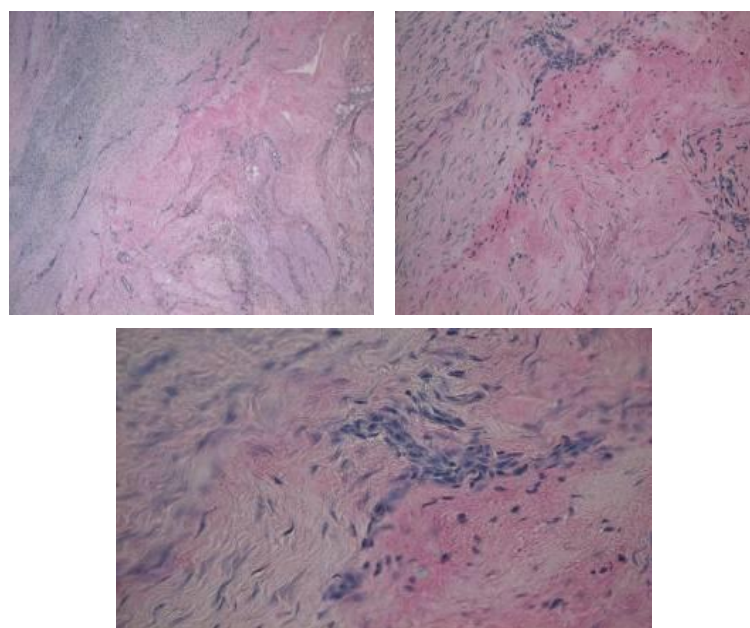


*Figura 26. Corda di Dupuytren compressa in modo intermittente non trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus . Colorazione immunohistochimica per collagene I. Immagini a 5x, 20x, 40x.*

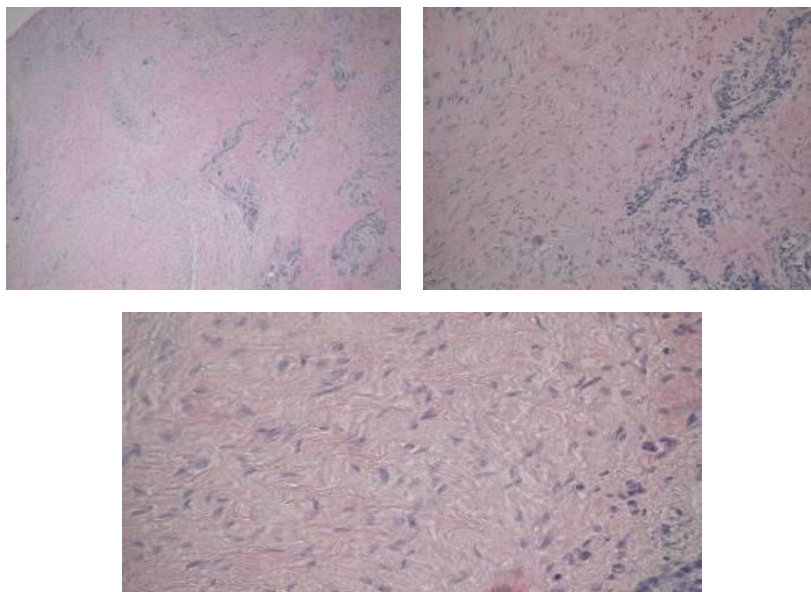


**Figura 27. Corda di Dupuytren compressa trattata con collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* a 24 ore dall'iniezione. Colorazione immunoistochimica per collagene I. Immagini a 5x, 20x, 40x**

*Colorazione immunoistochimica per collagene III*



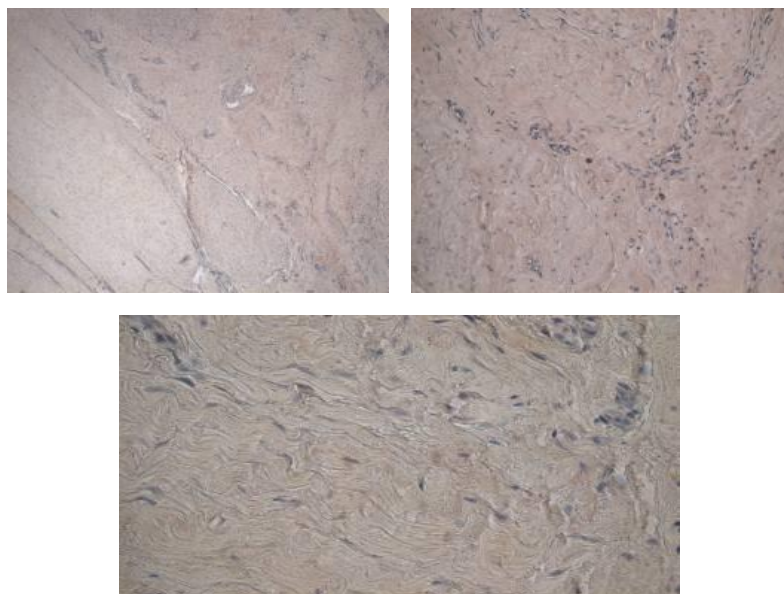
**Figura 28. Corda di Dupuytren compressa non trattata con collagenasi da *Vibrio Alginolyticus*. Colorazione immunoistochimica per collagene III. Immagini a 5x, 20x, 40x.**



***Figura 30. Corda di Dupuytren compressa trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione . Colorazione immunoistochimica per collagene***

***III. Immagini a 5x, 20x, 40x.***

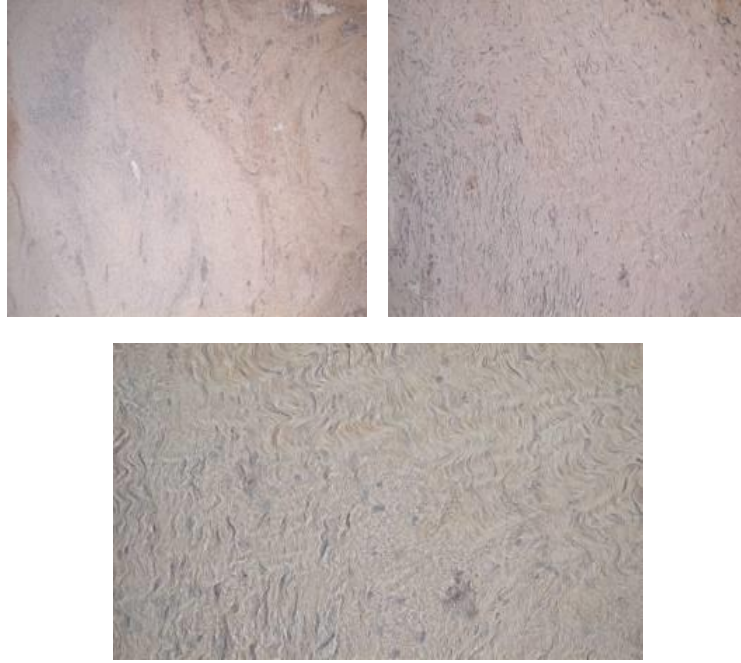
*Colorazione immunoistochimica per osteopontina*



***Figura 31. Corda di Dupuytren compressa non trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus .***

***Colorazione immunoistochimica per osteopontina. Immagini a 5x, 20x, 40x***



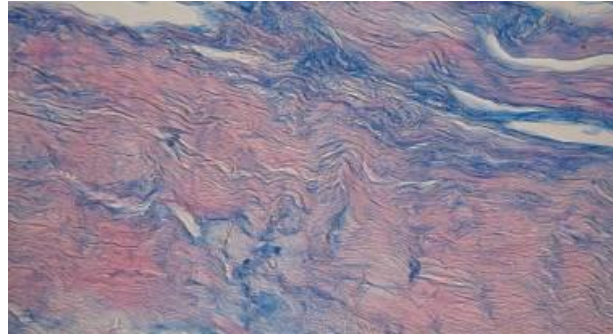


*Figura 32. Corda di Dupuytren compressa trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione . Colorazione immunostochimica per osteopontina. Immagini a 5x, 20x, 40x.*

## **Distensione longitudinale e iniezione di collagenasi da *Vibrio***

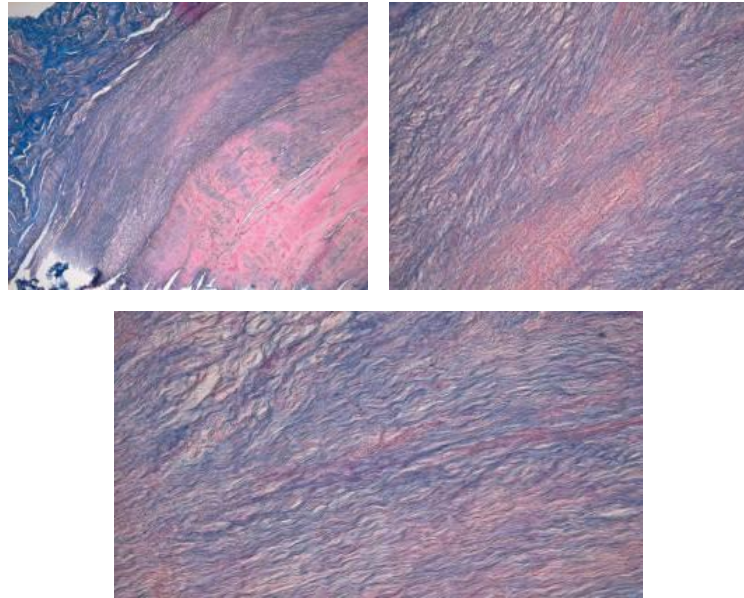
### **Alginolyticus**

*Colorazione Azan Mallory*



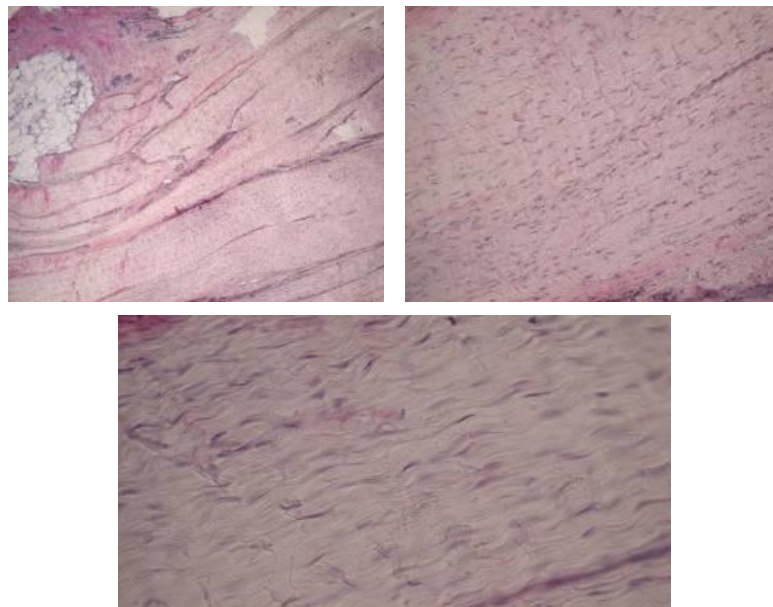
*Figura 33. Corda di Dupuytren distesa non trattata con collagenasi. Colorazione Azan Mallory.*

*Immagini a 20x*



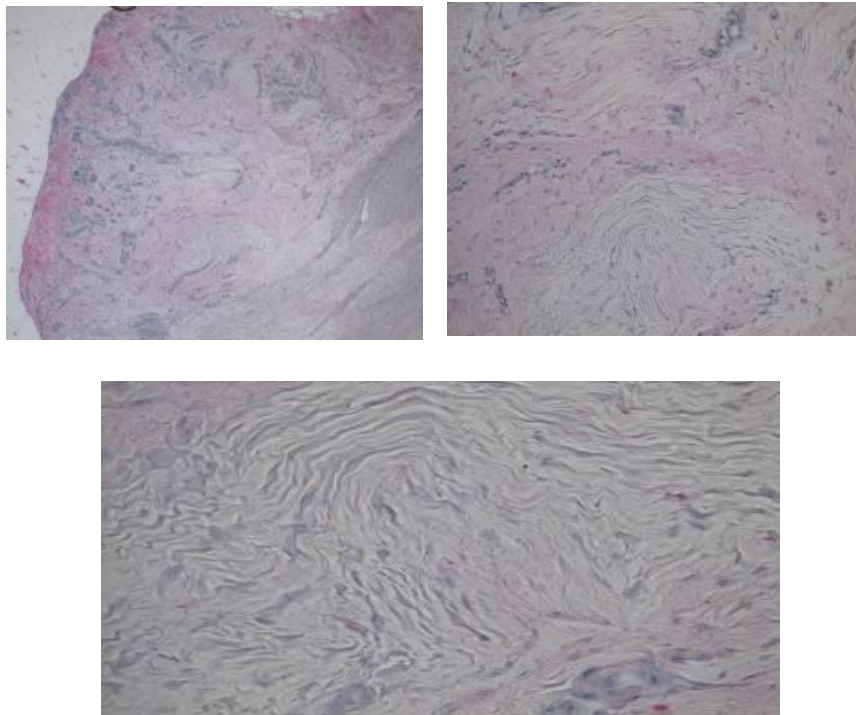
**Figura 34. Corda di Dupuytren distesa e trattata con collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* a 24 ore dall'iniezione. Colorazione Azan Mallory. Immagini a 5x, 20x, 40x.**

*Colorazione immunoistochimica per collagene I*



**Figura 35. Corda di Dupuytren distesa non trattata con collagenasi da *Vibrio Alginolyticus*. Colorazione immunoistochimica per collagene I. Immagini a 5x, 20x, 40x.**

*Colorazione immunohistochimica per collagene III*



**Figura 36. Corda di Dupuytren distesa non trattata con collagenasi da *Vibrio Alginolyticus*. Colorazione immunohistochimica per collagene III. Immagini a 5x, 20x,40x.**

Colorazione immunohistochimica per osteopontina



*Figura 37. Corda di Dupuytren distesa non trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus.*

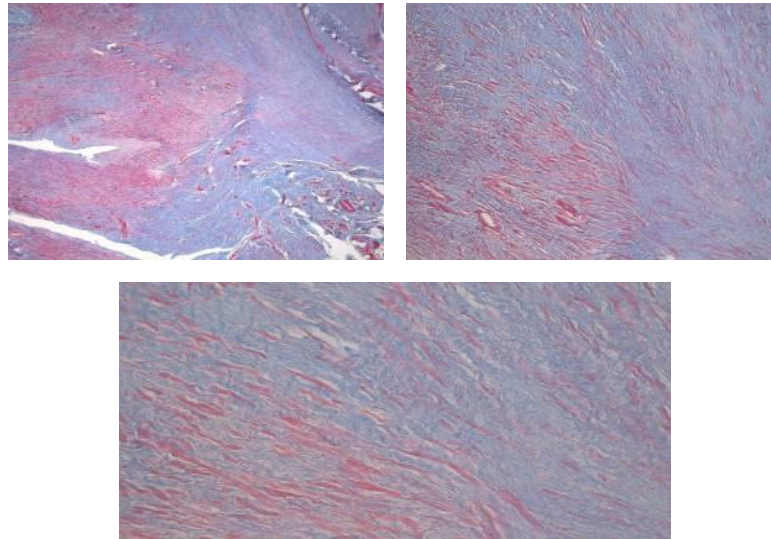
*Colorazione immunohistochimica per osteopontina. Immagini a 5x, 20x, 40x.*



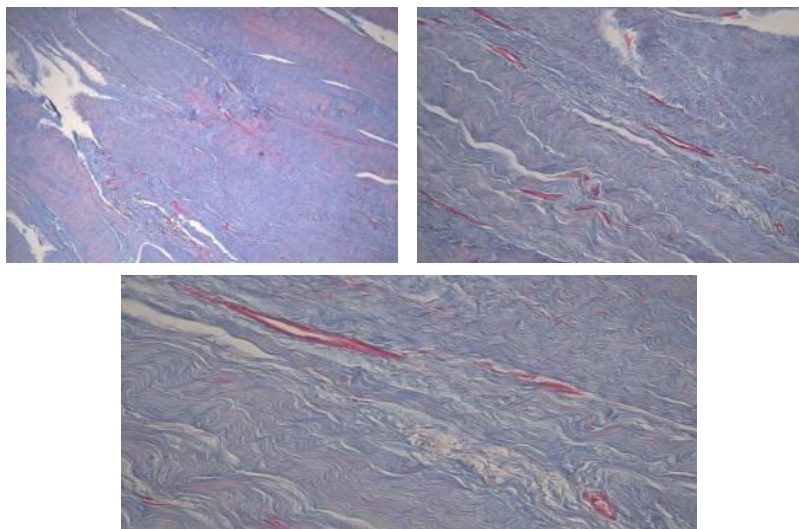
*Figura 38. Corda di Dupuytren distesa trattata con collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione . Colorazione immunohistochimica per osteopontina. Immagini a 5x, 20x, 40x.*

## Iniezione con EDTA e collagenasi da *Vibrio Alginolyticus*

*Colorazione Azan Mallory*

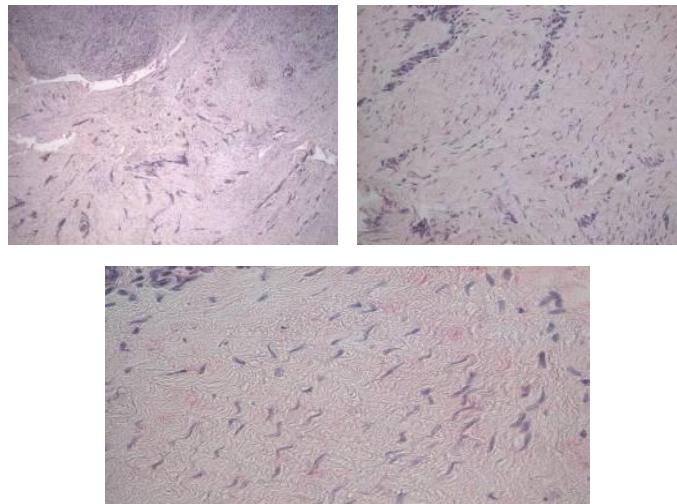


**Figura 39.** Corda di Dupuytren iniettata con EDTA non trattata con collagenasi. Colorazione Azan Mallory. Immagini a 5x, 20x, 40x.



**Figura 40.** Corda di Dupuytren trattata con EDTA e collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* a 24 ore dall'iniezione. Colorazione Azan Mallory. Immagini a 5x, 20x, 40x.

*Immunoistochimica per collagene I*

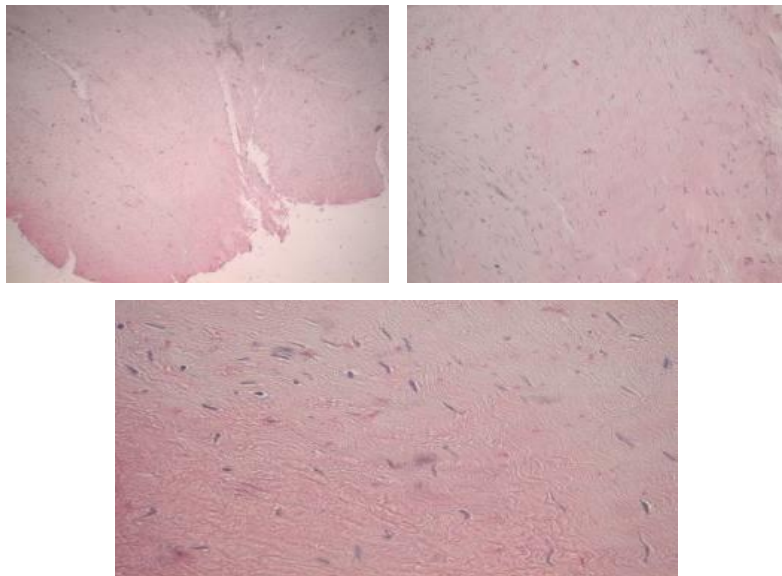


***Fiura 41. Corda di Dupuytren iniettata con EDTA non trattata con collagenasi. Colorazione immunoistochimica per collagene I. Immagini a 5x, 20x, 40x.***

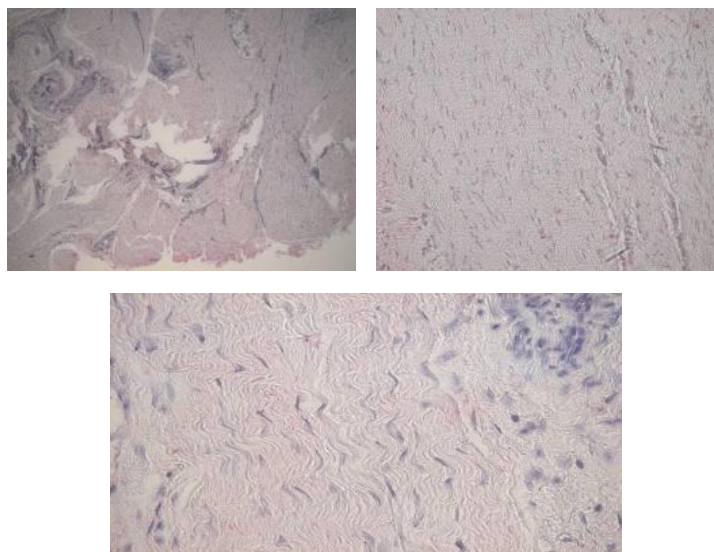


***Figura 42 Corda di Dupuytren trattata con EDTA e collagenasi da Vibrio Alginolyticus a 24 ore dall'iniezione. Colorazione immunoistochimica per collagene I Immagini a 5x, 20x, 40x***

*Immunoistochimica per collagene III*



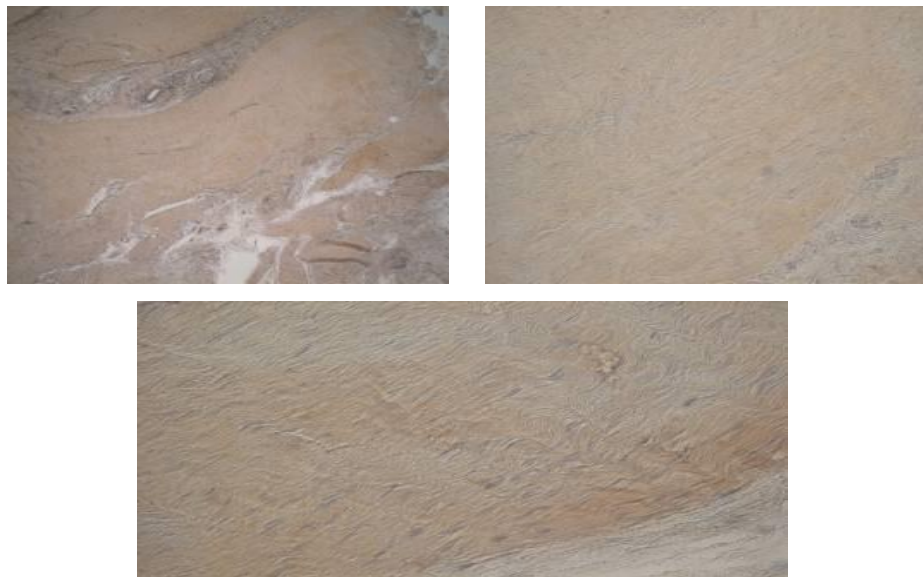
**Figura 43. Corda di Dupuytren iniettata con EDTA non trattata con collagenasi. Colorazione immunoistochimica per collagene III. Immagini a 5x, 20x, 40x.**



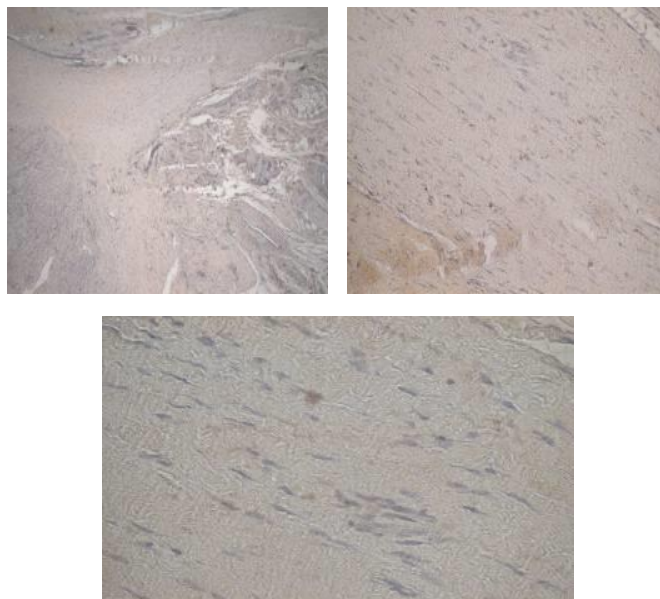
**Figura 44. Corda di Dupuytren trattata con EDTA e collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* a 24 ore dall'iniezione. Colorazione immunoistochimica per collagene III Immagini a 5x, 20x, 40x.**



*Immunoistochimica per osteopontina*



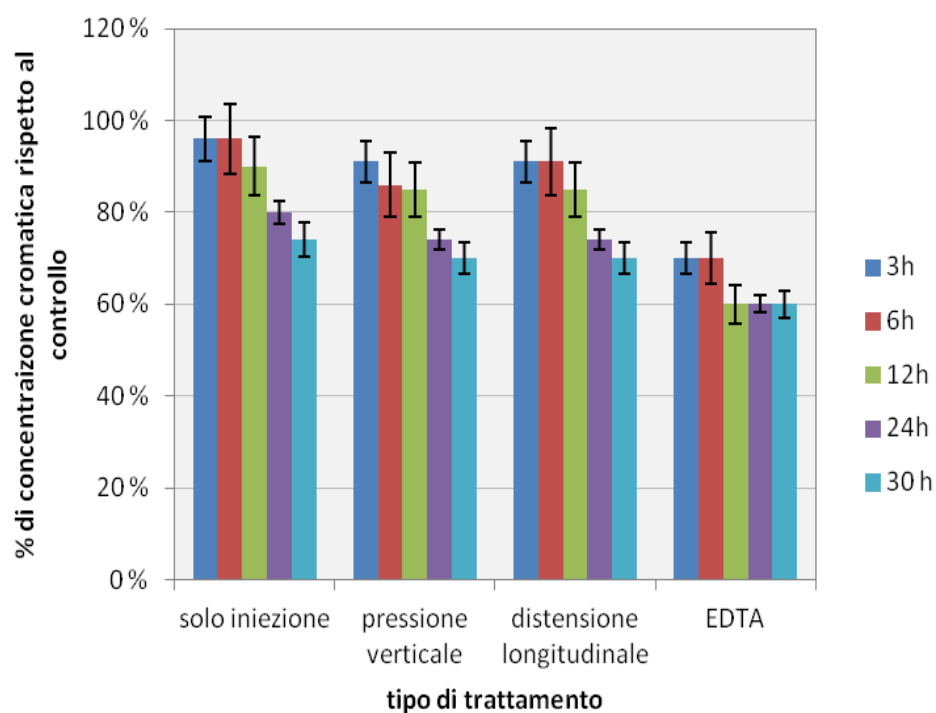
**Figura 45.** Corda di Dupuytren iniettata con EDTA non trattata con collagenasi. Colorazione immunoistochimica per osteopontina. Immagini a 5x, 20x, 40x.



**Figura 46.** Corda di Dupuytren trattata con EDTA e collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* a 24 ore dall'iniezione. Colorazione immunoistochimica per osteopontina Immagini a 5x, 20x, 40x.

## Analisi semiquantitativa con software ImageJ

L'analisi semiquantitativa eseguita con il software ImageJ della variazione cromatica del segnale per collagene III ottenuto con colorazione immunostochimica ha permesso di costruire questo grafico, che evidenzia la diminuzione progressiva di tale collagene nei campioni trattati con collagenasi per intervalli temporali crescenti. Considerato come valore 100 la concentrazione cromatica del campione non trattato, sono valutate le concentrazioni degli altri campioni. (Figura 47)



**Figura 47. Diminuzione del contenuto di collagene nei campioni sottoposti a diverso trattamento a crescenti tempi di esposizione alla collagenasi.  $p < 0.05$ .**

# DISCUSSIONE

Secondo i risultati ottenuti appare evidente che la collagenasi ottenuta da colture di *Vibrio Alginolyticus*, contenendo una bassissima percentuale di contaminazioni proteiche, è una metalloproteasi pura e molto efficiente nell'esercitare la degradazione delle molecole di collagene. L'osservazione microscopica dei vetrini contenenti le sezioni di corda di Dupuytren colorata con le differenti tecniche istologiche ha permesso di notare alcuni sorprendenti elementi: in primo luogo la collagenasi da *Vibrio Alginolyticus* possiede un'attività degradativa di buon livello contro il collagene, sia di tipo I che di tipo III. Questo rilievo è supportato dall'analisi semiquantitativa precedentemente illustrata eseguita con il software ImageJ, che ha evidenziato la diminuzione della concentrazione del segnale cromatico per il collagene III, peraltro il più rappresentativo nella patologia. In secondo luogo la colorazione Azan Mallory ha consentito di notare costanti strutture rosso-rosate che testimoniano la presenza di nuclei di calcificazione nel contesto della corda fibrosa. La successiva analisi con colorazioni specifiche quali immunistochemica per osteopontina e immunofluorescenza per osteopontina ha confermato la presenza di tali elementi che potrebbero essere alla base, assieme alla fitta presenza di collagene, della solidità e della robustezza delle strutture fibrose della corda di Dupuytren. La collagenasi ottenuta dal *Vibrio Alginolyticus* ha dimostrato in definitiva un funzionamento dose e tempo dipendente quando iniettata nella corda fibrosa della malattia di Dupuytren; il suo funzionamento è inoltre favorito dalla rottura meccanica delle fibre collagene e dallo scioglimento dei nuclei di calcificazione presenti nella corda tramite iniezione di EDTA. Nei pazienti affetti da malattie fibroproliferative delle fasce, unitamente alla somministrazione iniettiva della collagenasi, si potrebbe applicare una forza tensile al tessuto in modo da associare l'azione litica dell'enzima alla trazione meccanica sulle zone fibrose per favorire la degradazione dei fasci di collagene anomalamamente depositi.

## CONCLUSIONI

La collagenasi da *Vibrio Alginolyticus*, potrebbe rappresentare un'opzione nella terapia non chirurgica della malattia di Dupuytren e delle altre malattie fibroproliferative delle fasce (morbo di La Peyronie e morbo di Ledderhose) soprattutto nei casi facilmente risolvibili, evitando i rischi di un intervento chirurgico a pazienti giovani e fisicamente attivi. Lo studio sperimentale ha dimostrato la sua efficacia nella degradazione dei collagene I e III tipici della patogenesi di tali malattie ed essendo dotata di un alto profilo di sicurezza (non viene prodotta da una specie patogena per l'uomo e presenta un livello di contaminazioni proteiche molto basso) dovrebbe essere considerata per ulteriori approfondimenti clinici e sperimentali per tali prospettive.

# Bibliografia

## 7 BIBLIOGRAFIA

Ala Aho , Kähäri R VM: Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005; 87: 273-286.

Albers B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Biologia molecolare della cellula*, Zanichelli 4<sup>a</sup> ed :1172-1177.

Ayad, Boot-Handford R, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth A: *The extracellular matrix: facts book*. 1994; Academic Press, London.

Badalamante MA, Lawrence CH: Efficacy and safety of injectable mixed collagenase subtypes in the treatment of Dupuytren's contracture. *J Hand Surg* 2007; 32A: 767-774.

Bond MD, Van Wart HE: Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* 1984; 23: 3085-3091.

Bond MD, Van Wart HE: Purification and separation of individual collagenases of *Clostridium histolyticum* using red dye ligand chromatography. *Biochemistry* 1984, 23: 3077-3085.

Brickey-Parsons D, Glimcher MJ, Smith RJ: Biochemical changes in the collagen of the palmar fascia in patient with Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg* 1981; 63: 787-797.

Brown JJ, Ollier W, Thomson W, Bayat A: Positive association of HLA-DRB1\*15 with Dupuytren's disease in caucasians. *Tissue Antigens* 2008; 2 (2): 166-170.

Camp JR, Liles M, Beale J, Saeidi N, Flynn BP, Moore E, Murthy SK, Ruberti JW: Molecular mechanochemistry: low force switch slows enzymatic cleavage of type I collagen monomer. *J Am Chem Soc* 2011; 133: 4073-4078.

De Souza SJ, Brentani RR: On the structure-function relationship of polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem* 1994; 300:605-615.

Desmoulière A, Chaponniere C, Gabbiani G: Tissue repair, contraction and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005; 13 (1): 7-12.

Desmoulière A: Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int* 1995; 19 (5): 471-476.

Durr HR, Krodel A, Trouillier H, Lienemann A: Fibromatosis of the plantar fascia: diagnosis indications for surgical treatment. *Foot Ankle Int* 1999; 20 (1): 13-17.

Egeblad M, Werb Z: New function for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174.

- Gonzales T, Robert-Baudouy J: Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol Rev* 1996; 18 (4): 319-344.
- Harding KG, Bale S, Llewellyn M, Baggot J, Robbins K: A pilot study of Clostridium collagenase ointment in the debridement of dermal ulcers. *Clin Drug Invest* 1996; 11: 139-144.
- Harper E: Collagenases. *Ann Rev Biochem* 1980; 49: 1063-1078.
- Harrington DJ: Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infection and Immunity* 1996; June: 1885-1891.
- Hurst LC, Badalamante MA, Hentz VR, Hotchkiss RN, Kaplan TDK, Meals RA, Smith TM, Rodzvilla J: Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N Engl J Med* 2009; 361: 968-979.
- Jung W, Winter H: Considerations for the use of clostridial collagenase in clinical practise. *Clin Drug Invest* 1998; 15: 245-252.
- Lim DV, Jackson 1993; RJ, Pull-VonGruenigen CM: Purification and assay of bacterial collagenases. *J Microbiol Methods* 18:241-253.
- Mac Lennan JD, Mandl I, Howes EL: Bacterial digestion of collagen. *J Clin Invest* 1953; 32: 1317-1322.
- Matrisian LM: The matrix-degrading metalloproteinases *Bioessays* 1992.; 14:455-463.
- Matsushita O, Jung CM, Minami J, Katayama S, Nishi N, Okabe A: A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa Clostridium histolyticum collagenase. *J Biol Chem* 1998; 273 (6): 3643-3648.
- Mawhinney I, De Frenne H, Tubiana R: Historical, anatomic and clinical aspects of Dupuytren's disease. In *The Hand*, Suanders WB, 1999: 451-483.
- Mc Indoe A, Beare RL: The surgical management of Dupuytren's contracture. *Am J Surg* 1958; 31: 197-203
- Overall CM, Lopez-Otin C: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovation for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657-672.
- Pendas AM, Matilla T, Estivill X, Lopez Otin C: The human collagenase-3 (CLG3) gene is located on chromosome 11q22.3 clustered to other members of the matrix metalloproteinase gene family. *Genomics* 1995; 26: 615-618.
- Ramachandran GN: Stereochemistry of collagen. *Int J Pept Protein Res* 1988; 31: 1-16.
- Ravanti L, Kahari VM: matrix metalloproteinases in wound repair. *Int J Mol Med* 2000; 6 (4): 391-407.
- Robertson PB, Cobb CM, Taylor RE, Fullmer HM: activation of latent collagenase by microbial plaque. *J Periodontal Res* 1974; 9:81-83.
- Rosati P, Colombo R: I tessuti, *Ediermes* 2003:103-114.

Rowley DI, Couch M, Chesney RB: Assessment of percutaneous fasciotomy in the management of Dupuytren's contracture. *J Hand Surg* 1984; 9: 163-164.

Sanchez- Lopez R, Alexander CM, Behrendtsen O, Brathnach R, Werb Z: Role of zinc-binding -and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J Biol Chem* 1993; 268: 7238-7347.

Schnierer S, Kleine T, Gote T, Hillemann A, Knauper V, Tschesche H: The recombinant catalytic domain of human neutrophil collagenase lacks type I collagen substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 319-326

Shaw RB Jr, Chong AKS, Zhang A, Hentz V, Chang J: Dupuytren's disease: history, diagnosis and treatment. *Plast Reconstr Surg* 2007; 120: 44-54.

Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Kontinen YT, Lindy O, Saari H, Uitto VJ: Identification of proteasis from periodontopathogenic bacteria as activator of latent human neutrophil and fibroblastic-type interstitial collagenases. *Infect Immun* 1992; 60: 4491-4495.

Springman EB, Angleton EL, Birkedal- Hansen H, Van Wart HE: Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 364-368.

Stratmann B, Farr M, Tschesche H: MMP-TIMP interaction depends on residue 2 in TIMP-4. *FEBS Lett* 2001; 507 (3): 285-287.

Supran CT, Scozzafava A, Clare BW: Bacterial protease inhibitors. *Med Res Rev* 2002; 22 (4) 329-372.

Takeuchi H, Shibano Y, Morihara K, Fukushima J, Inami S, Keil B, Gilles AM, Kawamoto S, Okuda K: Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. *Biochem* 1992; 281: 703-708.

Uitto VJ, Raeste AM: Activation of latent collagenase of human leukocytes and gingival fluid by bacterial plaque. *J Dent Res* 1978; 57:844-851.

Van Wart HE, Steinbrink DR. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal Biochem* 1981; 113 (2) :356-365.

Vincenti MP, Coon CI, Lee O, Brinckerhoff CE: Regulation of collagenase gene expression by IL-1 $\beta$  requires transcriptional and post-transcriptional mechanism. *Nucleic Acid Res* 1994; 22: 4818-4827.

Watanabe K: Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 63: 520-526.

Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Kahari VM, Han J: Mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2373-2383.

Wilson JJ, Matsushita O, Okabe A, Sakon J: A bacterial collagen- binding domain with novel calcium-binding motifs controls domain orientation. *EMBO J* 2003; 22 (8): 1743-1752.

Yoshihara K, Matsushita O, Minami J and Okabe A: Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase. *J Bacteriol* 1994; 176: 6489–6496.