



il medico

Spedizione in A.P. - 45%
art. 2 comma 20/B legge 662/96 - Milano

Anno 13 - Numero 3/4 - 2014

SPORTIVO



Periodico di aggiornamento scientifico e professionale

Staminali & ortopedia

A. Pantalone, V. Salini, I. Antonucci, M. GB Guelfi, M. Guelfi, S. Massimi, L. Stuppia, D. Vanni

L'osso è uno dei pochi tessuti che mantiene potenziale rigenerativo nella vita adulta, in grado di portare a guarigione fratture o difetti ossei. Infatti, durante i processi di riparazione, viene ripetuto il pathway del normale sviluppo embrionale in coordinazione con alcuni tipi di cellule.

Tutti contribuiscono al processo di guarigione, ma la percentuale di implicazione è variabile.

Continua a pagina 2

Pagina 6
Cellule staminali mesenchimali (MSCS)

Pagina 11
Cellule staminali in ortopedia

Pagina 14
**Utilizzo delle cellule staminali
in chirurgia vertebrale**

Pagina 15
Bibliografia



Direttore responsabile

Massimo Padula
padula@ilmedicosportivo.it

Direttore editoriale

Giorgio Maggiani
direttore.editoriale@ilmedicosportivo.it

Comitato scientifico

R. Agricola (TO), E. Alicicco (BS),
M. Benazzi (MI), G. Bianchi (GE),
A. Branca (SO), G. L. Bruno (TO),
A. Campi (RM), R. Campini (TO),
E. Castellacci (LU), G. Cerulli (PG),
G. Coari (LU), F. Colautti (PG),
F. Combi (MI), R. Corsetti (BO),
B. Costantino (PC), A. De Nicola (BA),
R. D'Onofrio (LT), M. Di Piero (GE),
M. Di Stefano (TO), A. Ferretti (RM),
F. Festa (CH), R. Filippini (VR),
C. Faletti (TO), G. Fiorini (MI),
G. Francavilla (PA), G. Galanti (FI),
P. Gatto (GE), P. L. Gatto (GE),
E. Luna (MI), M. Manzuoli (PO),
M. Marcacci (BO), P. P. Mariani (RM),
F. Martino (BA), G. Martelli (SI),
L. Miori (PV), O. Moreschini (RM),
D. Munaro (TV), M. Muratore (LE),
A. Nardi (RO), G. Odaglia (GE),
G. Palaia (LE), L. Pederzini (MO),
F. Priano (GE), S. Respizzi (MI),
G. Rizzardini (MI), G. Rocca (AL),
S. G. Roi (BO), D. Rosa (NA),
P. Rossi (TO), P. Tamburrino (LT),
A. Tucciarone (LT), V. Valerio (BR),
G. Vassallo (GE), L. Ventura (MN),
F. Versace (SV), P. Volpi (MI),
R. Zaffanelli (MI), U. Zoppi (TE)

Progetto grafico

Dynamicom Srl

Art Director

Giovanna Nicoli
giovanna.nicoli@ilmedicosportivo.it

Impaginazione

Massimo Di Leo
massimo.dileo@ilmedicosportivo.it

Registrazione del Tribunale di Milano

n. 742 del 26 novembre 1999

Stampa

Grafismi

Direzione, redazione e amministrazione

Dynamicom Srl
Via San Gregorio, 12 - 20124 Milano
Tel. +39.02.89.69.37.51 - Fax +39.02.20.11.76

Sito internet

www.ilmedicosportivo.it
www.ilmedicosportivo.com

Nessuna parte di questa pubblicazione può essere fotocopiata o riprodotta anche parzialmente senza l'autorizzazione dell'editore.

Norme per gli Autori. La rivista pubblica contributi (articoli originali, di aggiornamento, casi clinici, ecc.) relativi alla medicina sportiva. Gli Autori dei contributi sono responsabili del loro contenuto e della riproduzione nelle immagini allegate. L'accettazione dei contributi è comunque subordinata alla revisione del comitato scientifico, all'esecuzione di eventuali modifiche dettate da esigenze redazionali ed al parere definitivo del direttore responsabile.

Norme generali Il testo dovrà essere composto in lingua italiana, dattiloscritto in duplice copia con pagine numerate e dovrà essere corredato da: 1. Titolo 2. Nomi per esteso degli autori e istituto di appartenenza, indirizzo e recapito telefonico dell'Autore cui è destinata la corrispondenza 3. Bibliografia essenziale 4. A discrezione degli Autori è gradita la memorizzazione del testo e di eventuali immagini su supporto magnetico (dischetto da 3.5") per PC DOS o Apple Macintosh.

Il materiale da pubblicare va indirizzato a:

Il Medico Sportivo - Via San Gregorio, 12
20124 Milano



Questo periodico è associato
all'Unione Stampa Periodica Italiana



Segue da pagina 1

A livello molecolare tre costituenti vitali hanno assunto una grande importanza nel processo di guarigione del tessuto osseo:

a Fattori di crescita.

Tra questi rientrano le citochine pro infiammatorie, la famiglia dei TGF- β , metallo proteinasi e fattori angiogenetici. Vengono ritrovati in quantità abbondante all'interno dell'ematoma di frattura e sono prodotti da numerosi tipi di cellule, come quelle endoteliali, piastrine, macrofagi, monociti e cellule staminali mesenchimali.

b Cellule osteoprogenitrici.

Costituiscono il secondo elemento per un ottimale processo riparativo. Le cellule staminali mesenchimali vengono reclutate nel sito di danno dalla circolazione sanguigna

c Matrice extracellulare.

Funziona come scaffold naturale per tutti gli eventi e le interazioni cellulari.

Bisogna poi aggiungere un quarto elemento ai tre appena riportati: la stabilità meccanica del sito di frattura. Infatti, è impossibile che si determini una corretta rigenerazione del tessuto osseo se i due monconi non sono ben sintetizzati. Per questo già da alcuni anni, si parla di "Diamond Concept" per esprimere i fattori che influenzano la guarigione di un osso lesionato. (Figura 1)

Come evidente in figura i quattro lati del diamante sono costituiti dai concetti espressi precedentemente. In figura sono anche presenti la vascolarizzazione, pre requisito fondamentale per una corretta osteogenesi, e l'ospite, inteso come presenza di comorbidità che non devono essere ignorate. Il centro dell'area delimitata dal diamante rappresenta il sito di frattura o di difetto osseo e costituisce l'area dove avvengono tutti i processi di riparazione e dove avviene la più alta attività biologica.

Per tale ragione è chiamata la "camera biologica". Affinché la camera biologica possa funzionare adeguatamente c'è bisogno di una buona vascolarizzazione che garantisca l'apporto di nutrimenti, ossi-

geno, fattori di crescita e cellule osteoprogenitrici. La camera biologica può operare come unità chiusa, parzialmente aperta o completamente aperta in relazione ai tessuti circostanti.

Una camera chiusa, quindi non in relazione con l'ambiente esterno, permette di incrementare la concentrazione di elementi cellulari, fattori di crescita o altro che il chirurgo può aver impiantato. D'altra parte, se la camera è chiusa, l'unica fonte di cellule osteoprogenitrici e di rilascio di mediatori è il canale midollare. Per questa ragione il concetto della "camera biologica" ha focalizzato l'attenzione sull'importanza di un'adeguata presenza di cellule progenitrici e fattori di crescita all'interno del sito di guarigione. Le biotecnologie a nostra disposizione per la realizzazione di questo concetto possono essere identificate in: fattori di crescita sintetici (GFs) come le proteine morfogenetiche ossee ricombinanti umane (rh-BMPs), fattori di crescita autologhi (AGFs) contenute nel plasma arricchito di piastrine (PRP), scaffold e soprattutto cellule staminali mesenchimali (MSCs). Lo studio e l'utilizzo di questi elementi sono in continuo divenire soprattutto nella gestione dei difetti ossei, delle lesioni osteocondrali e delle pseudoartrosi. Da qui il sempre crescente interesse per le cellule staminali mesenchimali (MSCs), il loro studio e utilizzo nella pratica Ortopedica.

Cellule staminali

La cellula staminale (dal greco $\sigma\tau\alpha\mu\iota\varsigma$ "trave"; dal latino stamen "stame, filo della vita") è una cellula non differenziata caratterizzata da:

- Possibilità di divisione illimitata;
- Possibilità di originare almeno un tipo di progenie di cellule altamente differenziate.

Il differenziamento cellulare è un processo di graduale specializzazione e restringimento di potenzialità. Dalla formazione dello zigote (fecondazione) fino a 4-5 giorni un embrione consiste di cellule identiche (da quattro a otto) che sono definite cellule staminali totipotenti in quanto non sono specializzate ed hanno quindi la potenzialità di differenziarsi in tutte le linee cellulari necessarie a formare l'embrione, comprese quelle che daranno

luogo alla placenta e alle membrane che lo circondano. Al quarto o quinto giorno dopo la fecondazione (stadio di morula) l'embrione è ancora formato da cellule embrionali identiche che però non possono più formare un embrione.

Dal quinto al settimo giorno dopo la fecondazione (stadio di blastocisti) nella morula si forma una cavità sferica dalla cui massa cellulare esterna incominciano a differenziarsi le cellule che costituiranno la placenta e le membrane intorno all'embrione e dalla cui massa cellulare interna (20-30 cellule) incominciano a differenziarsi le cellule che formeranno l'embrione vero e proprio.

Queste ultime sono chiamate *cellule staminali pluripotenti*, in grado di produrre le cellule che derivano dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma) e hanno la potenzialità di differenziarsi in qualsiasi cellula di un animale adulto ma, a differenza delle cellule totipotenti, non possono dare origine a un embrione.

L'ectoderma (strato più esterno) darà origine all'epidermide con i suoi annessi (capelli, peli, unghie, ghiandole sebacee e sudoripare), ad alcune mucose, al sistema nervoso (cervello e midollo spinale), all'occhio e all'orecchio. Dal mesoderma (strato intermedio) si formeranno il tessuto connettivo, i muscoli, lo scheletro, il cuore, il sangue, i vasi sanguigni e linfatici, i reni, le ghiandole sessuali e le vie genitali, etc. Lo strato più interno o endoderma produrrà l'intestino, i polmoni e parte delle vie urinarie.

Le *cellule multipotenti*, identificate nei feti e in numero ristretto anche nell'uomo adulto, sono così definite per la possibilità di moltiplicarsi e mantenersi in coltura ma non hanno come le cellule staminali totipotenti la capacità di rinnovarsi in modo illimitato.

Infine il termine unipotente indica cellule che sono capaci di differenziarsi solo lungo una determinata linea. Nell'ultimo decennio le potenzialità delle cellule pluripotenti e multipotenti sono state largamente dimostrate e sperimentate in modelli animali, soprattutto nel topo: le cellule pluripotenti, anche definite ES (Embrionali Staminali), ottenute da blastocisti di topo, hanno dimostrato di essere in grado di originare, dopo opportuna induzione in vitro, tutti i tipi cellulari in modo stabile e funzionale. ■

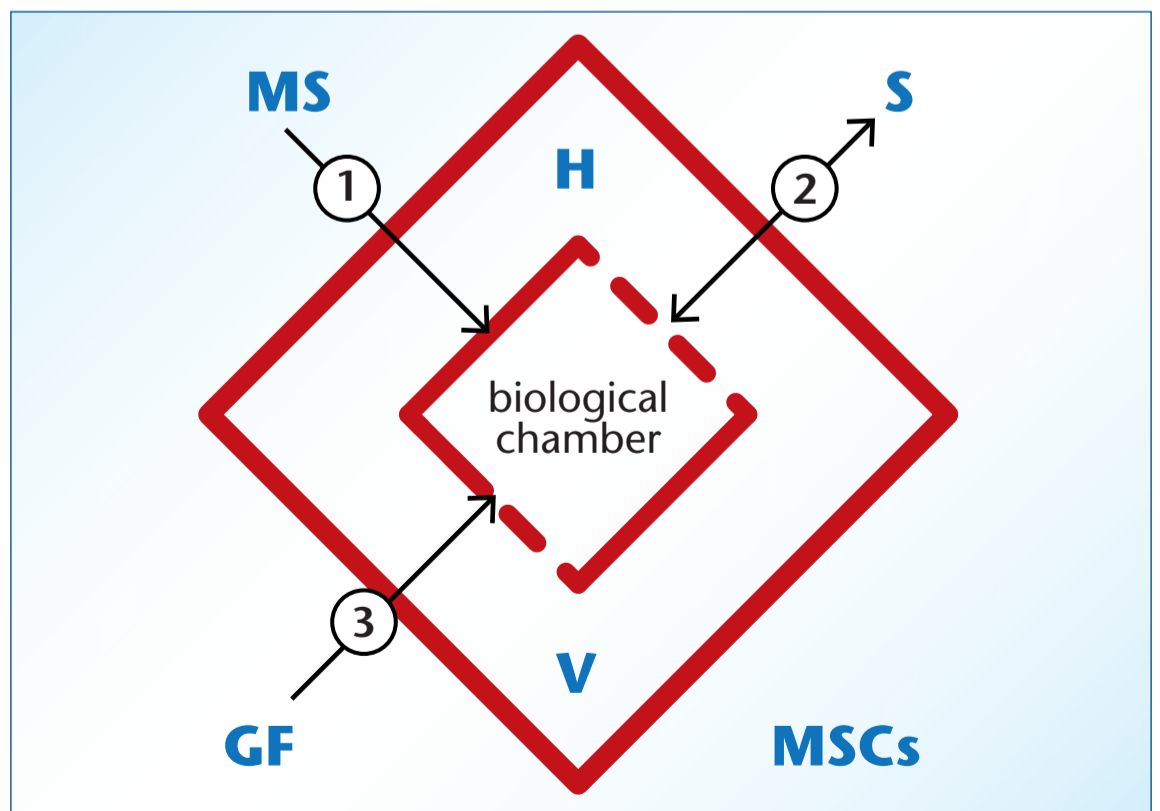


Figura 1 - Concetto diamante e la camera biologica. V=Vascolarizzazione; H=Ospite; MS=Stabilità meccanica; MSC=Cellule osteoprogenitrici; S=Scaffold; GF=Fattori di crescita; 1=Camera chiusa; 2=Camera aperta; 3=Camera parzialmente chiusa.

 **Airtal**[®]
M01AB16
aceclofenac

**Efficace in Sicurezza
nell'osteoartrite, artrite reumatoide
e lombosciatalgia¹**

“I feel good”



1. Dooley M. et al. *Drugs* 2001; 61(9): 1351-1378 (Adis Drug Evaluation)

MedDra SOC	Comuni (>1/100, <1/10)	Non comuni (> 1/1.000, <1/100)	Rare (>10.000, <1/1.000)	Molto rare / segnalazioni isolate (<1/10.000)
Patologie del sistema emolinfopoietico			Anemia	Depressione del midollo osseo Granulocitopenia Trombocitopenia Anemia emolitica
Disturbi del sistema immunitario			Reazione anafilattica (incluso shock) Ipersensibilità	
Disturbi psichiatrici				Depressione Sogni anomali Insonnia
Patologie del sistema nervoso	Capogiri			Parestesia Sonnolenza Mal di testa Alterazioni del gusto
Patologie dell'occhio			Disturbi visivi	
Patologie dell'orecchio e del labirinto				Vertigini
Patologie cardiache			Scopenso cardiaco	Palpitazioni
Patologie vascolari			Iperensione	Rossore Vampate
Patologie respiratorie, toraciche e mediastiniche			Dispnea	Broncospasmo
Patologie gastrointestinali	Dispepsia Dolore addominale Nausea Diarrea	Flatulenza Gastrite Costipazione Vomito Ulcere boccali	Melena Ematemesi	Stomatite Emorragia gastrointestinale Perforazione intestinale Aggravamento di Crohn e della Colite ulcerosa Pancreatite
Patologie della cute e del tessuto sottocutaneo		Prurito Rash Dermatite Orticaria	Edema del viso	Porpora, Esantema Gravi reazioni mucocutanee Dermatite bollosa Sindrome di Stevens-Johnson Necrosi tossica epidermica
Alterazioni renali e delle vie urinarie				Sindrome nefrosica Insufficienza renale
Patologie epatobiliari				Lesioni epatiche (inclusa epatite)
Patologie sistemiche e condizioni relative alla sede di somministrazione				Edema Affaticamento
Esami diagnostici	Incremento enzimi epatici	Incremento dell'urea nel sangue Incremento della creatinina sierica		Incremento della fosfatasi alcalina ematica Aumento di peso

Fertilità

Vedere paragrafo 4.4

4.7 Effetti sulla capacità di guidare veicoli e sull'uso di macchinari

Come avviene per altri FANS ed in pazienti particolarmente predisposti, la somministrazione di aceclofenac potrebbe dar luogo a capogiri, vertigini o ad altri disturbi nervosi centrali: di questo dovrebbero essere informati coloro che sono impegnati a guidare un veicolo o a utilizzare macchinari che richiedono integrità del grado di vigilanza.

4.8 Effetti indesiderati

Gli effetti collaterali più comunemente segnalati sono i disturbi gastrointestinali. Possono verificarsi ulcere peptiche, perforazione o emorragia gastrointestinale, a volte fatale, in particolare negli anziani (vedere paragrafo 4.4). Dopo somministrazione di aceclofenac sono stati riportati: nausea, vomito, diarrea, flatulenza, costipazione, dispepsia, dolore addominale, melena, ematemesi, stomatiti ulcerative, esacerbazione di colite e morbo di Crohn (vedere paragrafo 4.4). Meno frequentemente sono state osservate gastriti. Sono stati segnalati disturbi dermatologici, inclusi prurito e rash, reazioni bollose includenti Sindrome di Stevens-Johnson e necrosi tossica epidermica (molto raramente). Sono stati segnalati anomali livelli degli enzimi epatici; raramente è stato riportato innalzamento dei livelli di creatinina sierica. Edema, ipertensione e insufficienza cardiaca sono state riportate in associazione al trattamento con FANS. Studi clinici e dati epidemiologici suggeriscono che l'uso di alcuni FANS (specialmente ad alti dosaggi e per trattamenti di lunga durata) può essere associato a un modesto aumento del rischio di eventi trombotici arteriosi (per es. infarto del miocardio o ictus) (vedere paragrafo 4.4). Nella seguente tabella le reazioni avverse segnalate durante gli studi clinici e nell'esperienza post-registrativa con AIRTAL sono riportate e raggruppate secondo la classificazione sistemica e d'organo (SOC) e per frequenza. Vedere paragrafi 4.4 e 4.5

4.9 Sovradosaggio

Attualmente non sono disponibili informazioni relative al quadro clinico derivante da sovradosaggio con AIRTAL. Pertanto le misure terapeutiche da adottare sono quelle comunemente impiegate in caso di avvelenamento acuto da FANS: - l'assorbimento deve essere impedito non appena possibile per mezzo di lavanda gastrica e trattamento con carbone attivo; - trattamenti di sostegno e sintomatici dovrebbero essere adottati in caso di complicazioni (ipotensione, insufficienza renale, convulsioni, irritazione gastrointestinale e depressione respiratoria); - terapie specifiche, come diuresi forzata, dialisi o emoperfusioni, non permettono di eliminare gli antinfiammatori non steroidei, a causa del loro elevato legame alle proteine plasmatiche e del loro notevole metabolismo.

5. PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE

5.1 Proprietà Farmacodinamiche

Categoria farmacoterapeutica

Farmaco antinfiammatorio non-steroido e antireumatico, codice ATC M01AB16. Aceclofenac è un antinfiammatorio non-steroido, appartenente alla classe degli analoghi dell'acido fenilacetico. Negli studi condotti su differenti specie animali, aceclofenac ha mostrato in modelli sperimentali di infiammazione acuta e cronica un'attività analgesica ed antinfiammatoria, in termini sia terapeutici sia di profilassi, simile a quella di indometacina e diclofenac. Il potere analgesico valutato su stati dolorosi indotti sperimentalmente da stimoli di diverso tipo è risultato confrontabile a quello di indometacina e diclofenac. Aceclofenac, nei modelli sperimentali utilizzati, è altresì risultato dotato di attività antipiretica. Non sono state riscontrate alterazioni funzionali a livello del sistema cardiovascolare, respiratorio e del sistema nervoso centrale. Gli effetti a livello renale sono paragonabili a quelli indotti da altri FANS.

Meccanismo d'azione

Aceclofenac è risultato un potente inibitore della cicloossigenasi, enzima che catalizza la conversione di acido arachidonico nei precursori delle prostaglandine e del trombossano.

5.2 Proprietà Farmacocinetiche

Assorbimento

Studi di farmacocinetica condotti in diverse specie animali (ratto, cane e scimmia) dimostrano che aceclofenac somministrato per via orale ed intramuscolare è rapidamente assorbito sotto forma di farmaco immodificato.

Distribuzione

Il picco plasmatico (Cmax) viene raggiunto approssimativamente 2 ore (tmax) dopo l'assunzione orale del farmaco. La biodisponibilità è vicina al 100%. L'emivita plasmatica è di 4 ore. Dopo somministrazione ripetuta non è stato osservato accumulo a livello del compartimento plasmatico. Aceclofenac penetra elettivamente nel liquido sinoviale, dove le concentrazioni raggiungono circa il 57% dei livelli plasmatici.

Metabolismo

Aceclofenac e i suoi metaboliti hanno un'elevata affinità per le proteine plasmatiche (>99%). Aceclofenac è presente in circolo principalmente come farmaco immodificato.

Eliminazione

Circa i due terzi della dose somministrata vengono eliminati per via urinaria, principalmente sotto forma di idrossimetaboliti. Il profilo farmacocinetico di aceclofenac è sovrapponibile nell'adulto e nell'anziano.

5.3 Dati preclinici di sicurezza

I risultati degli studi preclinici condotti con aceclofenac sono consistenti con quelli dei FANS. L'organo target principale è il tratto gastrointestinale. La tossicità di aceclofenac è stata valutata in differenti specie animali (topo, ratto, scimmia) usando diverse vie di somministrazione e adottando schemi di trattamento singolo e ripetuto. Tossicità acuta (DL50): topo e.v. 149-169 mg/kg, p.o. 211 mg/kg; ratto e.v. 94-137 mg/kg (maschi-femmine). Tossicità dopo somministrazione ripetuta (p.o.): ratto 4 settimane: assenza di tossicità fino a 3 mg/kg/die. Dopo trattamento ripetuto sono state riscontrate evidenze di tossicità gastrointestinale solo alle dosi più alte, che sono risultate nel ratto 3-6 volte, nella scimmia 5-10 volte superiori alla dose terapeutica nell'uomo. Tali effetti tossici sono risultati reversibili in entrambe le specie. Aceclofenac non ha mostrato attività mutagenica né cancerogena. Non vi sono ulteriori informazioni su dati preclinici degli inibitori della sintesi delle prostaglandine oltre a quelle già riportate in altre parti di questo RCP (vedere paragrafo 4.6).

6. INFORMAZIONI FARMACEUTICHE

6.1 Elenco degli eccipienti

Compresse rivestite - Cellulosa microcristallina, croscarmellosa sodica, gliceril palmitostearato, povidone, ipromellosa, poliossietilene (40) stearato, titanio diossido.

Polvere per sospensione orale - sorbitolo (E420), saccarina sodica, aroma caramello, aroma panna, aroma latte, silice colloidale anidra, aspartame (E951), ipromellosa, titanio diossido (E171).

6.2 Incompatibilità

Nessuna.

6.3 Periodo di validità

Compresse rivestite - 3 anni.

Polvere per sospensione orale - 4 anni.

6.4 Precauzioni particolari per la conservazione

Compresse rivestite - Conservare a temperatura non superiore ai 30 °C.

Polvere per sospensione orale - Questo medicinale non richiede alcuna condizione particolare di conservazione.

6.5 Natura e contenuto del contenitore

AIRTAL 100 mg compresse rivestite - 40 compresse: blister Al/Al

AIRTAL 100 mg compresse rivestite - 10 compresse: blister Al/Al

AIRTAL 100 mg polvere per sospensione orale - 30 bustine: bustine di carta alluminio/polietilene.

6.6 Precauzioni particolari per lo smaltimento e la manipolazione

Nessuna istruzione particolare.

7. TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO

Almirall S.p.A.

Via Messina, 38 - Torre C

20154 Milano

8. NUMERI DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO

40 compresse rivestite 100 mg AIC n° 032773020

10 compresse rivestite 100 mg AIC n° 032773069

30 bustine polvere per sospensione orale 100 mg AIC n° 032773032

9. DATA DELLA PRIMA AUTORIZZAZIONE/RINNOVO DELL'AUTORIZZAZIONE

26 Luglio 2000

10. DATA DI REVISIONE DEL TESTO

Dicembre 2010

Cellule staminali mesenchimali (MSCs)

A. Pantalone¹, V. Salini¹, I. Antonucci², M. GB Guelfi³, M. Guelfi¹, S. Massimi¹, L. Stuppi², D. Vanni¹

¹ Clinica Ortopedica e Traumatologica, Università "G. d'Annunzio" di Chieti - Pescara - ² Dipartimento di Scienze Psicologiche, Umanistiche e del Territorio, Università "G. d'Annunzio" di Chieti - Pescara - ³ Divisione Ortopedica, Clinica Montallegro - Genova

Le cellule staminali mesenchimali sono una popolazione di cellule progenitrici capaci di differenziarsi in molteplici linee di tessuti mesenchimali, quali osseo, cartilagineo, legamentoso, muscolare e adiposo. Queste cellule sono presenti fisiologicamente all'interno dei tessuti sopra citati, ma possono essere ritrovate anche nel liquido amniotico o nel sangue contenuto nel cordone ombelicale. Di seguito vengono analizzate le principali fonti di MSCs, oggi oggetto di studio per un possibile utilizzo in campo clinico in diversi settori medici tra cui quello ortopedico-traumatologico.

Cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BMMSCs)

Le BMMSCs sono cellule staminali mesenchimali prelevate da midollo osseo. All'interno del midollo osseo troviamo diverse sottopopolazioni di cellule staminali: abbiamo le HSCs, cellule staminali ematopoietiche che sono responsabili dell'ematogenesi, precursori endoteliali e infine le MSCs, cellule staminali mesenchimali. Queste ultime non solo sono in grado di differenziarsi, secondo la loro linea mesodermica, in tessuto osseo, cartilagineo e adipociti, ma si differenziano anche in direzione della linea ectodermica ed endodermica. Per questa ragione sono un tipo unico di cellule staminali adulte.

La scoperta del loro potenziale fu casuale: si vide, infatti, che la somministrazione di cellule staminali prelevate da midollo osseo in pazienti affetti da leucemia, non solo portava a miglioramento di questa patologia (grazie alla componente HSCs), ma, se questi pazienti avevano danni epatici, si aveva miglioramento anche di tali lesioni (grazie alla componente MSCs). Perciò si comprese che queste cellule sono in grado di integrarsi in tessuti danneggiati e differenziarsi *in vivo* in un ampio spettro di cellule. La multipotenza di queste cellule dipende anche da fattori ambientali: infatti, colture in presenza di acido ascorbico, fosfato inorganico e desametasone portano alla differenziazione delle MSCs in osteoblasti, mentre la somministrazione di growth factor- β porta all'espressione di markers condrogenici. Diversi studi sono stati, e sono tuttora condotti, per testare la funzionalità delle BMMSCs *in vitro* e *in vivo*. (Figura 2) In uno studio del 2010 (Tortelli F et al.) sono stati utilizzati topi nudi GFP-Tg (Green Fluorescent protein-Transgenic). Le MSCs sono state prelevate, dopo aver sacrificato i topi, mediante lavaggio del midollo di femore e tibia con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Le cellule così ottenute sono state messe in coltura in medium di Coon modificato con aggiunto siero fetale di vitello al 10%, 2 mM di L-glutamina, 50 mg/ml di penicillina/streptomomicina e 1 ng/ml di fattore

di crescita dei fibroblasti (FGF-2). La coltura è mantenuta a 37°C con CO₂ al 5% fino a confluenza; poi le cellule vengono riespanse rutinariamente utilizzando tripsina-EDTA allo 0,05% per staccarle dalla piastra. Solo le cellule che hanno fatto 1-2 passaggi possono essere utilizzate. Per escludere una contaminazione leucocitaria significativa, le colture sono state sottoposte a citometria a flusso per testare la percentuale di cellule CD45+. Per poter essere utilizzate, le colture dovevano contenere un numero inferiore al 5% di cellule CD45+. 2,5x10⁶ cellule vengono poi seminate su di un supporto di ceramica altamente poroso costituito da uno scaffold (cioè una struttura sintetica in grado di creare un microambiente favorevole per l'adesione e la replicazione cellulare) di idrossiapatite al 100%, prima di essere incorporate in un gel di fibrina. Lo scaffold è stato impiantato nel sottocute di 32 topi nudi. Questi sono stati sacrificati a 3, 15, 30 e 60 giorni per raccogliere gli impianti. Gli impianti estratti sono stati decalcificati con Osteodec, poi incorporati in paraffina usando tecniche istologiche standard e tagliati in quattro sezioni dello spessore micrometrico. Le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina o con blu di Toluidina per rivelare tessuto osseo e cartilagineo. Per individuare la presenza di MSCs all'interno dei pori dell'impianto, le sezioni sono state trattate con anticorpi policlonali di coniglio anti-GFP seguiti poi

dall'utilizzo di un secondo tipo di anticorpi biotinilati di capra anti anticorpi di coniglio. Per individuare il tessuto cartilagineo e osseo sono stati utilizzati anticorpi policlonali di coniglio anti collagene tipo II e tipo I murino. Con le tecniche citate precedentemente gli impianti, a 3 giorni dall'innesto, sono risultati positivi per la presenza di cellule GFP+ e le cellule sono state trovate vive e integrate al biomateriale. A 30 giorni dall'innesto le cellule GFP+ erano totalmente assenti e la colorazione H&E rivelava la presenza di tessuto simil-cartilagineo; l'immunoistochimica confermava la presenza di collagene di tipo II. Questi dati erano indicativi del fatto che l'osso si formava attraverso ossificazione endocondrale eseguita da cellule dell'ospite reclutate nell'impianto. A 60 giorni la presenza di collagene di tipo I confermava la presenza di tessuto osseo; inoltre si è visto che il processo di ossificazione iniziava preferenzialmente dal centro dei pori, parametro verificato mediante il rapporto tra l'area di deposizione della matrice ossea e l'area totale dei pori. Un'altra caratteristica degna di nota è la capacità dell'impianto di portare a formazione di vascolarizzazione funzionalmente connessa con l'ospite. I vasi sanguigni sono stati evidenziati mediante colorazione tricromica di Mallory a 15 giorni dall'innesto dell'impianto. Questo tipo di cellule può essere utilizzato, oltre che come sospensione di cellule

espanso in coltura, anche come midollo osseo concentrato. La frazione di MSCs è molto limitata rispetto alle colture, ma la presenza di vari tipi di cellule progenitrici può avere un'influenza positiva sulla rigenerazione tissutale.

Cellule staminali mesenchimali da cordone ombelicale umano (hUCMSCs)

Le hUCMSCs sono cellule staminali mesenchimali prelevate da cordone ombelicale (CO). Il CO normalmente è scartato dopo la nascita del bambino; per questa ragione la sua raccolta non richiede procedure invasive e non dà grandi preoccupazioni dal punto di vista etico. Inoltre si tratta di una fonte di MSCs virtualmente inesauribile.

Le MSCs sono state isolate in tutti i compartimenti del CO:

- Endotelio della vena ombelicale.
- Gelatina di Wharton, una sostanza gelatinosa che si trova nel cordone ombelicale e che serve a proteggere e a isolare i vasi ombelicali. Questa è costituita da una componente amorfa di mucopolisaccaridi (acido ialuronico e condroitin-solfato) e da scarse fibre collagene. Vi è inoltre una componente cellulare, per lo più fibroblasti e macrofagi. All'interno della gelatina di Wharton le MSCs sono state isolate da tre differenti regioni:
 - Zona perivascolare
 - Zona intervascolare
 - Stroma sotto amniotico.

Inoltre queste cellule possono essere raccolte anche dal sangue presente nel CO, ma a causa della sua scarsa quantità e delle difficoltà tecniche del prelievo, questa procedura è meno indicata.

Per quanto riguarda le tecniche di prelievo e lo studio *in vitro*, in passato sono stati condotti diversi studi, che, però, prevedevano l'utilizzo di procedure troppo complesse per una terapia cellulare clinicamente orientata a un utilizzo su larga scala.

Un recente lavoro italiano (Marmotti A. 2012), ha cercato di sviluppare una metodica più veloce, economica e più semplice da applicare delle precedenti. Secondo tale protocollo il CO è stato prelevato da diverse donne andate incontro a parto cesareo, dopo aver raccolto il consenso informato. Questa metodica è effettuata in sala operatoria e pertanto permette di evitare sia una possibile contaminazione da parte dell'ambiente esterno (grazie alla sterilità della sala operatoria), sia da parte della flora microbica vaginale (evitando il passaggio del cordone nel canale del parto).

I cordoni raccolti sono stati subito posti in PBS (Phosphate Buffered Solution) contenente anche 200mg/100mL di ciprofloxacina e 500 UI di eparina. In seguito sono stati messi in un contenitore sterile per essere pesati e misurati. Dopo essere stati lavati per due volte con PBS, al fine di rimuovere ogni traccia di globuli rossi, i cordoni sono stati tagliati in frammenti di 3 cm di lunghezza e poi tagliati longitudinalmente per esporre la superficie interna.

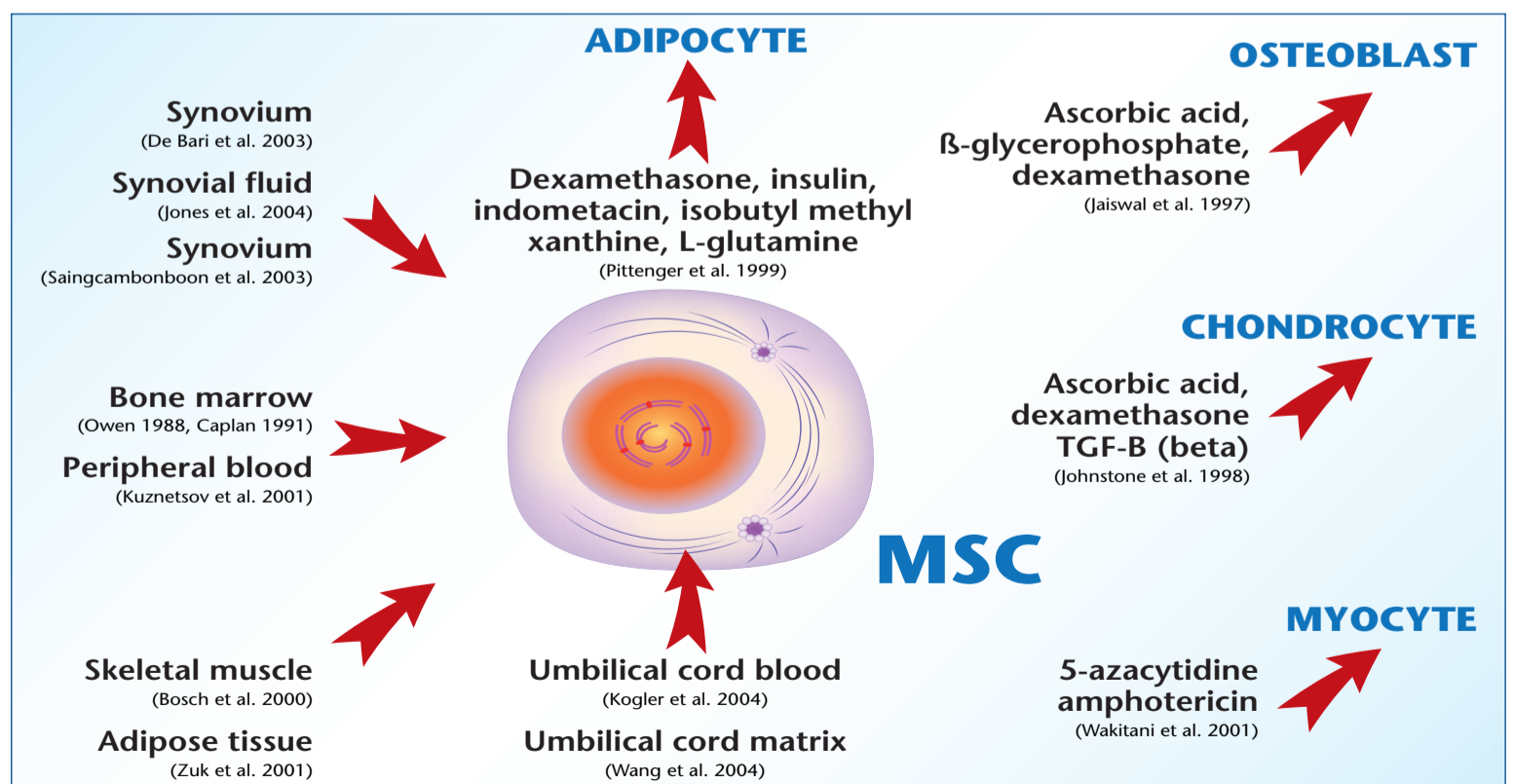


Figura 2 - Possibili vie di differenziazione della MSC

XXIV

International Conference on Sports Rehabilitation and Traumatology



In partnership with



Football Medicine Strategies for Player Care

11th-12th April, 2015 - LONDON

The Queen Elizabeth II Conference Centre

3rd Science of
Football Summit
13th April, 2015

Williams (UK)
Griffin (UK)
Nathwani (UK)
Fu (USA)

Dvorak (SUI)
D'Hooghe (BEL)
Brukner (AUS)
Khan (CAN/QAT)

Batty (UK)
Neyret (FRA)
Clancy (IRE)
Knowles (USA)

Kramer (RSA)
Medina (ESP)
Benazzo (ITA)
Holmich (DEN)

Ueblicher (GER)
Gobbi (ITA)
Ekstrand (SWE)
Beasley (UK)

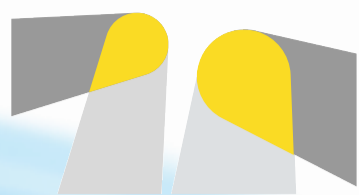
Tencone (ITA)
Mandelbaum (USA)
Ntagiopoulos (GRE)
Espregueira-Mendes (POR)

BOOKINGS & INFORMATION
conference@isokinetic.com

www.FootballMedicineStrategies.com



Nei disturbi articolari dolorosi



AMEDIAL PLUSTM

Glucosamina solfato, Condroitina solfato,
Collagene idrolizzato, Metilsulfonilmetano (MSM),
Vitamina C e L-Carnitina fumarato



NOVITÀ

MODALITÀ D'USO*

1 bustina al dì da 1 a 3 mesi
a cicli ripetuti

* adattabile alle singole necessità



Benessere articolare **RAGGIUNTO!**

Di seguito i frammenti sono stati spostati in una piastra di Petri della grandezza di 60 cm² contenenti mezzo di espansione per MSC composto da 10mL di D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12) arricchito con il 5% di piastrine umane lisate e il 10% di siero bovino fetale, 1X di penicillina/streptomomicina, 1X di piruvato di sodio, 1X di aminoacidi non essenziali e 500 UI di eparina. I frammenti poi sono stati tagliati manualmente in piccoli cubi di 4-7mm di lunghezza e trasferiti in 6-7 piastre di Petri di 60 cm² di superficie (40-45 frammenti per piastra), incubate a 37°C al 5% di CO₂.

Dopo due settimane il tessuto del CO è stato rimosso e tutte le cellule adese alla piastra sono state prelevate per poi essere incubate per altre due settimane. Al termine di tale periodo le cellule adese sono state tripsinizzate, centrifugate a 1200 giri/minuto e risospese in mezzo di espansione per MSC per un'ulteriore espansione, fino a completa confluenza. Questa viene raggiunta in altre due settimane circa (complessivamente quindi in 42esima giornata dal prelievo di CO).

Per quanto riguarda i risultati, le cellule sono state sottoposte all'immunostochimica ed è stato visto che esprimevano i tipici markers delle MSC (CD73, CD90, CD105, CD44, CD29) ed erano negative per il tipico marker ematopoietico (CD34). Inoltre tali cellule erano in grado di differenziarsi secondo varie linee cellulari (tessuto adiposo, osseo, muscolare, cartilagineo) e la lunghezza dei telomeri era simile a quella delle MSCs prelevate dal midollo osseo di donatori sani e giovani. Inoltre nelle colture in cui si è stimolata la differenziazione in senso osteogenico, sono state osservate deposizioni di calcio e le cellule sono risultate positive alla colorazione per la fosfatasi alcalina e all'immunofluorescenza per l'osteocalcina, indicanti quindi l'avvenuta differenziazione in senso osteogenico.

Un altro vantaggio di questa metodica è la possibilità di poter utilizzare cellule provenienti da diversi donatori, il che aumenta la disponibilità di risorse e diminuisce il tempo di messa in coltura delle cellule per l'espansione. Inoltre le cellule sono state manipolate in maniera minimale rispetto alle precedenti procedure: difatti la selezione delle MSC (rispetto alle altre cellule contenute nel compartimento del CO) è avvenuta esclusivamente sfruttando la loro naturale tendenza all'adesione alla piastra, mentre tutti gli altri tipi cellulari sono stati eliminati mediante lavaggio dopo le prime due settimane.

Per quanto riguarda il comportamento *in vivo* delle hUCMSCs, uno studio ne ha confermato il potenziale osteogenico che era già stato rivelato *in vitro*. In questo studio, le cellule sono state prelevate dal CO e sono state messe in coltura secondo un protocollo che presenta alcune varianti rispetto a quello precedentemente descritto, ma con risultati sovrapponibili.

Le cellule, raggiunto l'ottavo passaggio, sono state staccate dalla piastra, contaminate e poste in sospensione in α -MEM (α -Modified Eagle's Medium) alla concentrazione di 2x10⁶ cellule/mL. Come carriers per le cellule sono stati utilizzati degli scaffolds porosi composti da idrossiapatite/collagene/poli (acido lattico) fabbricati in cubi delle dimensioni di 5mm x 5mm x 5mm e sterilizzati mediante irradiazione con raggi 60Co- γ . Gli scaffolds sono stati immersi nella sospensione cellulare per due ore a 37°C e in seguito impiantati nel tessuto sottocutaneo della schiena di 10 topi nudi di 12±2g e circa 4 settimane di vita, intervento effettuato in anestesia generale.

Altri 10 topi nudi sono stati utilizzati come campione controllo; in questi ultimi è stato inserito solamente lo scaffold senza le cellule.

A 4-8-12 settimane le cavie sono state sacrificate e l'impianto è stato esaminato al microscopio ottico e all'immunostochimica per rilevare la presenza di materiale osseo. Nel campione controllo non è stata rilevata traccia di tessuto simil osseo. Negli impianti caricati con le cellule, invece, già a 4 settimane c'era evidenza istologica di materiale osteoide; le cellule erano cresciute nei pori formando una matrice simile all'osso.

A 8 settimane si poteva osservare formazione di franca matrice ossea.

A 12 settimane si è potuto constatare la presenza di preosteoblasti e osteoblasti, i quali erano molto probabilmente derivati dalla differenziazione delle cellule caricate sugli scaffolds. Questo dato è stato confermato all'immunostochimica che ha mostrato positività per la presenza di osteocalcina umana nella superficie interna degli scaffolds e nel tessuto sottocutaneo subito circostante all'impianto, mentre il restante tessuto sottocutaneo era negativo.

Cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo (FMSCs)

Le FMSCs sono cellule staminali mesenchimali prelevate da tessuto adiposo. Il prelievo del tessuto adiposo, come descritto da un recente studio, viene effettuato con lipoaspirazione mediante una cannula di 2,5 mm di diametro e un macchinario convenzionale per la lipoaspirazione.

In letteratura esistono diversi studi a proposito della variabilità regionale delle componenti cellulari del tessuto adiposo. Ma, secondo studi più recenti (Robrich RJ et al.), sembra che questa variabilità non sia statisticamente significativa tra il grasso addominale, quello delle cosce, del fianco o delle ginocchia. Pertanto prelievi effettuati in una di queste zone sono equiparabili come contenuto di FMSCs.

Dopo aver prelevato il tessuto, le cellule devono essere isolate. A tale scopo i campioni prelevati sono digeriti mediante soluzione contenente collagenasi II allo 0,15% per un'ora a 37°C; la sospensione è poi centrifugata a 400g per quattro minuti. Il pellet risultante viene lavato con PBS (Phosphate Buffered Solution) e risospesa in α -MEM (α -Modified Eagle's Medium) contenente il 10% di siero fetale di bovino e passata poi attraverso un filtro a maglie di 100 μ m. Dopo aver lisato i globuli rossi, il risultato viene sospeso nuovamente in α -MEM con aggiunta di FBS al 10%.

A questo punto le cellule prelevate sono caricate all'interno di tri-calcio fosfato poroso, o cilindri di idrossiapatite o blocchi di xenografts acellulare. Per garantirne la sopravvivenza, vengono prima sospese in un pozzetto con 150 μ l di componenti fibrinogeno diluite e mischiate con un uguale volume di componenti trombiniche diluite. La risultante matrice fibrinocellulare è poi avvolta intorno agli scaffolds e poi avvolta intorno agli scaffolds menzionati precedentemente.

Attualmente queste cellule sono in fase di studio *in vivo*, utile per valutarne la capacità osteogenica in modelli murini. Infatti gli scaffolds vengono poi impiantati nel tessuto sottocutaneo di topi nudi privi di timo, utilizzati per evitare reazioni immunitarie contro l'impianto.

I risultati, al momento, non sono entusiasmanti. Le FMSCs, *in vivo*, non producono formazione di tessuto osseo maturo; i campioni analizzati istologicamente, erano formati da una matrice simile a tessuto osteoide, ricco di collagene, ma privo di ossificazione.

Ciò sembra indicare una riduzione della capacità osteogenica del tessuto adiposo in confronto con le BMMSCs. Ciò è probabilmente dovuto all'assenza di fattori inducenti processi di ossificazione. Infatti, *in vitro*, con l'aggiunta di questi fattori, si sono raggiunti buoni risultati. Le FMSCs

continuano a rimanere oggetto di grande interesse scientifico per la facilità della loro raccolta e isolamento, e per l'elevata concentrazione tissutale, circa 500 volte maggiore rispetto all'aspirato del midollo osseo. Inoltre le FMSCs *in vivo* possiedono capacità di vasculogenesi: infatti, nei campioni analizzati, sono stati ritrovati vasi funzionalmente collegati con l'apparato vascolare della cavità.

Cellule staminali mesenchimali da liquido amniotico (AFMSCs)

Le AFMSCs sono cellule staminali prelevate da liquido amniotico (LA). Negli ultimi quattro anni la ricerca ha visto nel liquido amniotico una nuova e promettente frontiera per il reperimento di cellule staminali mesenchimali (MSCs).

Le MSCs hanno la capacità di autorinnovarsi e di differenziarsi in una grande varietà di cellule (transdifferenziazione) e contribuiscono in particolare modo alla generazione dei tessuti mesenchimali (l'osso, la cartilagine, il muscolo, i legamenti, i tendini e il tessuto adiposo).

Nel liquido amniotico troviamo una popolazione cellulare eterogenea:

- Cellule aderenti sotto condizioni standard di coltura:
 - a. Cellule in grado di dividersi e di formare colonie;
 - b. Cellule non proliferanti.
- Cellule non aderenti sotto condizioni standard di coltura.

Le cellule del LA presentano importanti e specifiche caratteristiche immunocitochimiche. Sono positive per la vimentina, citocheratina 8 e 18, la proteina FSP (fibroblast surface protein), actina del muscolo liscio (SMA), e negative per la desmina e per il marcatore CD31. Inoltre alcune di loro esprimono il fattore di trascrizione Oct-4, gene espresso nelle cellule staminali embrionali e nelle cellule germinali primordiali.

Paolo De Coppi e Anthony Atala hanno avvalorato tali dati isolando cellule dal liquido amniotico umano e murino di una linea cellulare che esprime markers delle cellule staminali embrionali e adulte.

Più del 90% delle cellule presentava il fattore di trascrizione Oct-4 che è stato associato con il mantenimento dello stato indifferenziativo e con la pluripotenza delle ES ed EG cells, provando la loro unicità e versatilità nell'occupare uno stadio intermedio tra le cellule staminali embrionali e adulte.

Le AFS (cellule staminali derivate da liquido amniotico) hanno mostrato caratteristiche sorprendenti per un'applicazione terapeutica in quanto dotate di:

- Stadio intermedio tra pluripotenza e multipotenza
- Stabilità mitotica
- Non tumorigenicità (le AFS non formano tumori *in vivo*).

Le linee umane clonali sono state indotte a differenziarsi in ogni tipo di cellule dei foglietti embrionali, comprese le cellule primordiali del tessuto adiposo, osseo, muscolare, endoteliale, neuronale ed epatico. Osteoblasti, neuroni ed epatociti sono tra le linee cellulari che aprono incoraggianti orizzonti per nuove applicazioni terapeutiche.

Le AFS cells possono, infatti, produrre cellule che *in vitro* esprimono marcatori e acquisiscono funzioni caratteristiche (formazione di noduli minerali di calcio, secrezione del neurotrasmettitore L-glutammato, produzione di urea). Inoltre, sono in corso studi che indicano come tali cellule, dopo vari trattamenti, sono in grado di generare cellule specializzate in seguito ad impianto *in vivo*.

Nella letteratura internazionale si trovano

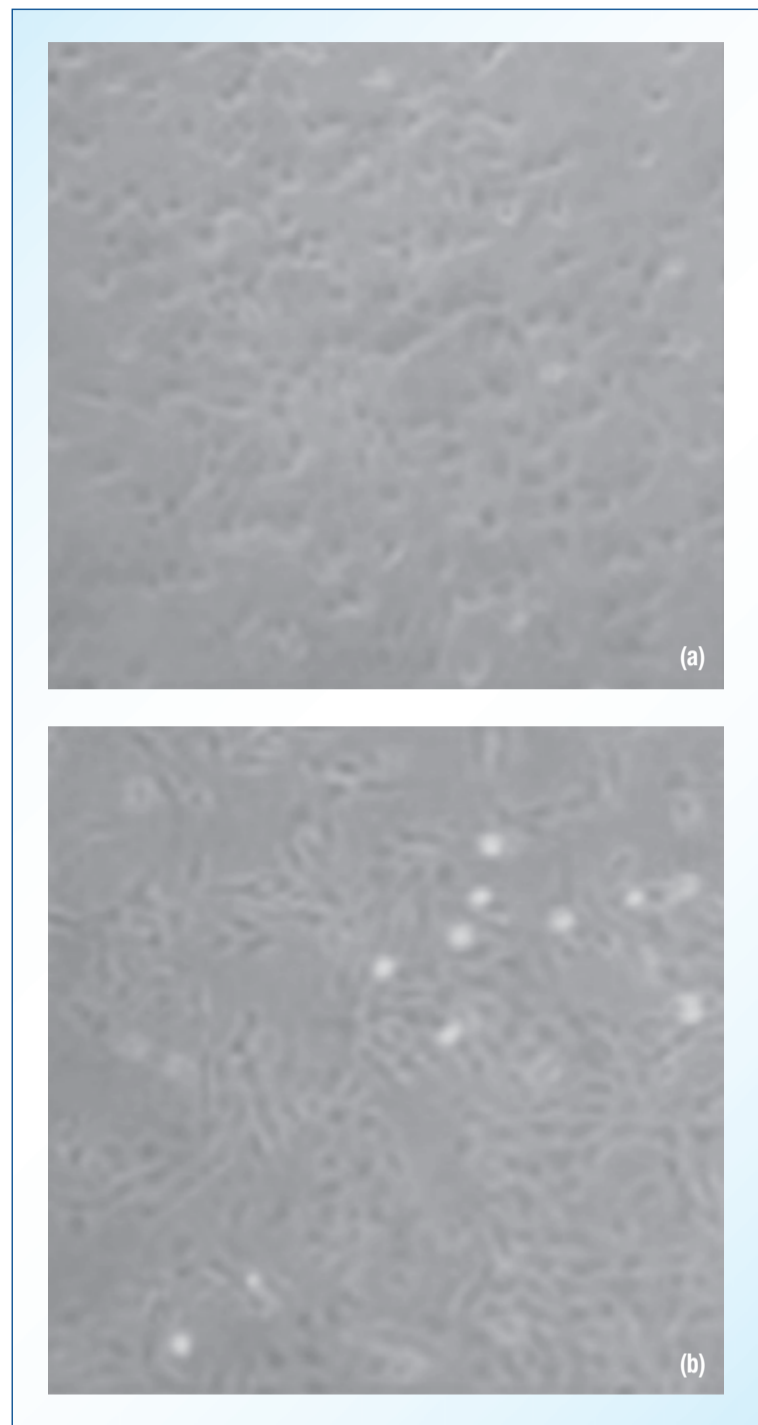


Figura 3 - AFMSCs in coltura a 8 giorni (a) e a 10 giorni (b)

molti articoli di differenti autori a proposito delle tecniche di prelievo e messa in coltura di tali cellule.

Dato che negli ultimi anni abbiamo personalmente lavorato con questo tipo di cellule, ci limiteremo a descrivere la nostra esperienza. Il LA contenuto all'interno del sacco amniotico, può essere facilmente raccolto da donne che si sottopongono ad amniocentesi per diagnostica prenatale. Le colture possono essere ottenute a partire da una quantità minima di 2mL di LA, che corrisponde all'incirca al quantitativo di LA che è normalmente scartato dopo la diagnosi.

L'amniocentesi viene effettuata all'incirca alla sedicesima settimana di gestazione e le cellule prelevate possono essere classificate in tre tipi: epitelioidi, specifiche del LA e fibroblastiche. Solo le cellule specifiche del LA, derivanti dalle membrane fetali e dal trofoblasto, permangono durante il processo di coltivazione.

Queste cellule in coltura crescono velocemente e sono capaci di compiere più di 250 raddoppiamenti. La cosa importante è che, anche dopo un così grande numero di moltiplicazioni, il loro cariotipo appare essere normale e la lunghezza telomerica è mantenuta costante.

Infatti, queste cellule non mostrano segni d'invecchiamento, né di tumorigenesi anche dopo più di due anni in coltura. All'interno delle cellule specifiche del LA si ritrovano le AFMSCs in una percentuale che è stata stimata essere variabile tra lo 0,9 e l'1,5%. Perciò al momento del prelievo del LA e della messa in coltura avremo approssimativamente 2,7x10⁵ cellule.

Tali cellule sono state coltivate con successo per un periodo superiore agli 8 mesi mostrando un alto livello di proliferazione e un cariotipo stabile. Il 90% di queste cellule esprime l'mRNA Oct-4 e la proteina Oct-4, un fattore di trascrizione che gioca un ruolo chiave nel mantenimento della pluripotenza. (Figura 3) Queste cellule esprimono inoltre i tipici markers mesenchimali, quali CD90, CD105, CD73, CD166, CD29, CD49.

Le AFMSCs raggiungono la senescenza al 27esimo passaggio e ciò si collega con la scomparsa dell'espressione di Oct-4.

Per quanto riguarda le tecniche di prelievo e coltura, i campioni di liquido amniotico (LA) sono stati forniti dal centro di Citogenetica dell'Ospedale di Pescara e prelevati mediante amniocentesi nel II trimestre di gravidanza.

Il LA è stato direttamente centrifugato per 10' a 1200 giri/minuto e le cellule contenute nel pellet sono state risospese in un terreno completo costituito da: Iscove modified Dulbecco medium (IMDM), 20% di siero bovino fetale (FCS), L-glutammina 2mM, penicillina 100 U/ml/streptomomicina 100 μ g/ml e basic fibroblast growth factor 5ng/ml (bFGF). Dopo 5-6 giorni di coltura le cellule in sospensione sono rimosse e quelle adese alla piastra sono state coltivate per altri 20 giorni.

Al raggiungimento del 90% circa di confluenza, le AFMSCs sono state staccate con tripsina, contaminate e piastrate in terreni osteoinduttori, per 30 giorni, con aggiunta di: Desametasone 10-8, β glicerol-fosfato 150 μ g/ml e acido ascorbico 50 μ g/ml (Antonucci I et al. 2009). ■



IBUPAS[®]

sicura adesione contro il dolore



**Confezione 7 cerotti medicati
da 136 mg di ibuprofene**

Classe C-SOP

**1 cerotto medicato
1 volta al giorno
per non più di 14 giorni**

Concessionario per la vendita

Cellule staminali in ortopedia

A. Pantalone¹, V. Salini¹, I. Antonucci², M. GB Guelfi³, M. Guelfi¹, S. Massimi¹, L. Stuppia², D. Vanni¹

¹ Clinica Ortopedica e Traumatologica, Università "G. d'Annunzio" di Chieti - Pescara - ² Dipartimento di Scienze Psicologiche, Umanistiche e del Territorio, Università "G. d'Annunzio" di Chieti - Pescara - ³ Divisione Ortopedica, Clinica Montallegro - Genova

Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs) sono state identificate per prime nel 1966 da Friedenstein et al. nel midollo osseo. In seguito, nel 1970, il gruppo di Caplan dimostrò per primo il potenziale di differenziazione condrogenico, osteogenico e muscolare di queste cellule e introdusse la terminologia "cellule staminali mesenchimali" nel 1990.

Wakitani et al. invece documentarono l'efficacia delle MSCs autologhe sul processo di guarigione di difetti osteocondrali nel coniglio. Infine, nel 2001, anche l'italiano Quarto descrisse, su un articolo pubblicato sul prestigioso *The New England Journal of Medicine* il primo successo nell'applicazione pre-clinica di MSCs coltivate su difetti ossei critici.

Per quanto riguarda le **modalità di applicazione**, esse possono essere impiantate sole o su scaffold di supporto. Nell'impianto sono quindi coinvolti diversi biomateriali talvolta combinati con fattori di crescita o di trascrizione, come ad esempio TGF- β , BMP-7, FGF-2 o SOX9, acido ialuronico o devices magnetici. Ad esempio nelle lesioni traumatiche con difetto osseo, l'attuale approccio clinico e sperimentale prevede l'impiego di queste cellule progenitrici per riparare tali danni al fine di ottenere un pieno recupero funzionale. Lo stroma del midollo osseo contiene una popolazione di cellule progenitrici con capacità di differenziamento in una varietà di linee tessutali mesenchimali quali osso, cartilagine, legamenti, muscolo, grasso e altri: tali cellule sono definite Cellule Mesenchimali Multipotenti (CMM) o MSCs. Le grandi potenzialità delle CMM sono state valutate mediante differenti modelli pre-clinici che si avvalgono dei moderni principi d'ingegneria tessutale. L'ingegneria tessutale è una metodologia basata sulla manipolazione cellulare che può comprendere:

- Stimolazione mediante *growth factors* di progenitori locali per ricreare nuovo tessuto;
- Autotrapianto di cellule staminali concentrate o espanse in vitro per ricreare tessuto mancante;
- Trapianto di cellule staminali concentrate o espanse in vitro su scaffold, modificate mediante *growth factors* o con tecniche d'ingegneria genetica per differenziarsi in un particolare tessuto specializzato: trapianto di tessuto specializzato già preformato *in vitro* o *in vivo*.

Quest'ultima applicazione è quella più interessante ed è in questo campo che la ricerca ha continuato i suoi progressi. Caplan A. I. et al. dello Skeletal Research Center di Cleveland (Ohio, USA) hanno valutato *in vivo* il potenziale osteocondro-

genetico delle CMM combinando una coltura espansa di CMM con un tubo di ceramica porosa in idrossiapatite-tricalcio fosfato precedentemente rivestito di fibronectina. Il cubo in ceramica così trattato è stato impiantato in un topo immunodeficiente o in un ospite singenico all'interno di una tasca sottocutanea. Dopo 3 o 6 settimane dall'impianto, osso e/o cartilagine sono stati identificati e quantificati nei pori del cubo in ceramica. Al contrario, nei pori di un cubo ceramico impiantato vuoto o rivestito con fibroblasti dermici è stato osservato solo del tessuto fibroso. La capacità osteocondrogenica delle CMM permane anche dopo lo sviluppo di numerose sottocolture. Un dato di primaria importanza emerso in questo studio è che il numero di CMM nel midollo osseo si riduce in funzione dell'età sia negli animali trattati sia nell'uomo. Proprio la perdita di un segmento osseo diafisario (difetto osseo di dimensione critica) ha costituito da sempre una delle sfide più complesse per i chirurghi ortopedici. Un difetto osseo post-traumatico di dimensioni critiche non riesce spesso a guarire spontaneamente ma evolve in **pseudoartrosi**. La pseudoartrosi è legata e direttamente proporzionale alla gravità del quadro di partenza (es. esposizione della frattura), ma può essere causata anche da una necrosi ossea e da un'infezione della frattura.

Il trattamento prevedeva l'impianto d'innesto osseo autologo, eterologo oppure omologo (quest'ultimo effettuato con tessuto osseo prelevato da individui della medesima specie), che presuppone l'esistenza di una fornita **banca dell'osso** per le forme non infette. Questa procedura è comunque limitata dalla quantità di tessuto disponibile e dalla morbidità nella sede di prelievo per quello.

La *restitutio ad integrum* delle fratture e relative complicanze può, pertanto, dipendere soprattutto dalla disponibilità di un adeguato numero di cellule progenitrici osteogenetiche già presente nella sede del difetto per formare un blastema di guarigione. Le CMM hanno la capacità di differenziarsi secondo una linea osteogenetica *in vivo* e *in vitro*, hanno cioè il potenziale per essere utilizzate nel trattamento delle pseudoartrosi. In un modello di ratto nudo immunodeficiente, Bruder et al. (1998) hanno trattato un difetto osseo di dimensione critica (7mm di lunghezza) utilizzando una ceramica di idrossiapatite/ β -tricalcio fosfato seminata con una coltura espansa di CMM di midollo osseo umano. Gli Autori hanno trovato nuovo tessuto osseo formatosi nei pori della ceramica caricata con CMM umane che presentava una distribuzione continua di ponti ossei tra l'ospite e l'impianto. Anche Caplan A. I. e Gao J. (2003) hanno utilizzato lo stesso

modello di Bruder et al. osservando che le CMM hanno la capacità di favorire la rigenerazione ossea di un difetto di dimensioni critiche con formazione di tessuto osseo e di ponti di connessione tra ospite e impianto. In un altro esperimento Bruder et al. hanno esteso il modello di guarigione con CMM autologhe al difetto osseo segmentale di un cane. I risultati ottenuti da questi primi studi realizzati più di 15 anni fa hanno dimostrato la realizzabilità e l'efficacia degli impianti con le CMM nella risoluzione di ampi difetti ossei, suggerendo già a suo tempo l'importanza di combinare le cellule staminali mesenchimali con un veicolo appropriato.

Proprio sulla base dei risultati di Caplan e Bruder è maturata l'attuale esperienza clinica riguardo all'utilizzazione di **trapianto di cellule staminali adulte coadiuvato da fattori di accrescimento**.

Si è pertanto certificata l'importanza di tali fattori nel fenomeno d'induzione ossea, dove alla mitogenesi di cellule staminali perivascolari indifferenziate segue la differenziazione di cellule osteoblastiche capaci di formare nuovo osso in sedi eterotopiche cioè non scheletriche grazie proprio all'interazione con segnali solubili molecolari. Tali segnali sono in grado di stimolare recettori appropriati nelle cellule mesenchimali indifferenziate dando così inizio al processo osteoinduttivo.

Le fondamentali osservazioni di Marshall e Urist prima e di Sampath e Reddi dopo hanno portato alla scoperta delle attività biologiche delle *bone morphogenetic osteogenic proteins BMPs/OPs*, una numerosa famiglia di molecole che, insieme ad altri membri della superfamiglia del TGF- β e relativi fattori di crescita e differenziazione, sono direttamente coinvolte nei processi di rigenerazione tessutale incluse le fratture ossee. La letteratura scientifica ha dimostrato come questi fattori di crescita agiscano da potenti stimolatori della proliferazione osteoblastica in vitro e della guarigione ossea *in vivo*, tali da rivelarsi utili nel favorire i processi di consolidamento o rigenerazione ossea qualora correttamente applicati nella sede di lesione.

Sebbene ne siano state individuate almeno 40 diverse isoforme, a oggi una chiara dimostrazione clinica del potenziale osteoinduttivo è disponibile solo per la rh-BMP-7, nota anche con l'acronimo OP-1 (Osteogenic Protein-1), e la rh-BMP-2. Esse appartengono alla super-famiglia dei fattori di crescita trasformanti TGF- β i cui recettori sono espressi sia sui condrociti sia sugli osteoblasti.

Il fenomeno dell'osteoiduzione è caratterizzato dalla trasformazione delle cellule mesenchimali perivascolari in osteoprogenitrici in grado di rigenerare tessuto osseo. Lrh-BMP-7 (eptotermia alfa) è veicolata

dal collagene di tipo 1 ed è la prima e unica approvata nel mondo per il trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe e negli Stati Uniti come HDE (*Humanitarian Device Exemption*) nel trattamento delle pseudoartrosi spinali. In Europa è registrata come farmaco con indicazione al trattamento delle pseudoartrosi di tibia refrattarie all'autotrapianto o nei casi in cui l'autotrapianto non sia effettuabile.

In Italia, Capanna et al., già nel 2002, per la riparazione di grandi perdite di sostanza ossea e il trattamento delle pseudoartrosi, sperimentarono la necessità di associare innesti ossei di banca a cellule staminali autologhe. In 27 pazienti, affetti da patologie neoplastiche (es. cisti ossee), post-traumatiche e necrosi asettiche dell'anca, è stata riscontrata una più rapida e omogenea riabilitazione dei trapianti ossei, con tempi dimezzati (3 mesi anziché 6) grazie all'impianto di cellule staminali autologhe su innesti ossei omoplastici.

Nel 2005 Manes et al. descrissero dettagliatamente la tecnica chirurgica two-step utilizzata per l'impianto di cellule staminali adulte con fattori di crescita:

- Preparazione del concentrato piastrinico contenente i fattori di crescita estratti dal sangue del paziente;
- Applicazione del gel piastrinico e delle cellule staminali, effettuata nelle sale operatorie.

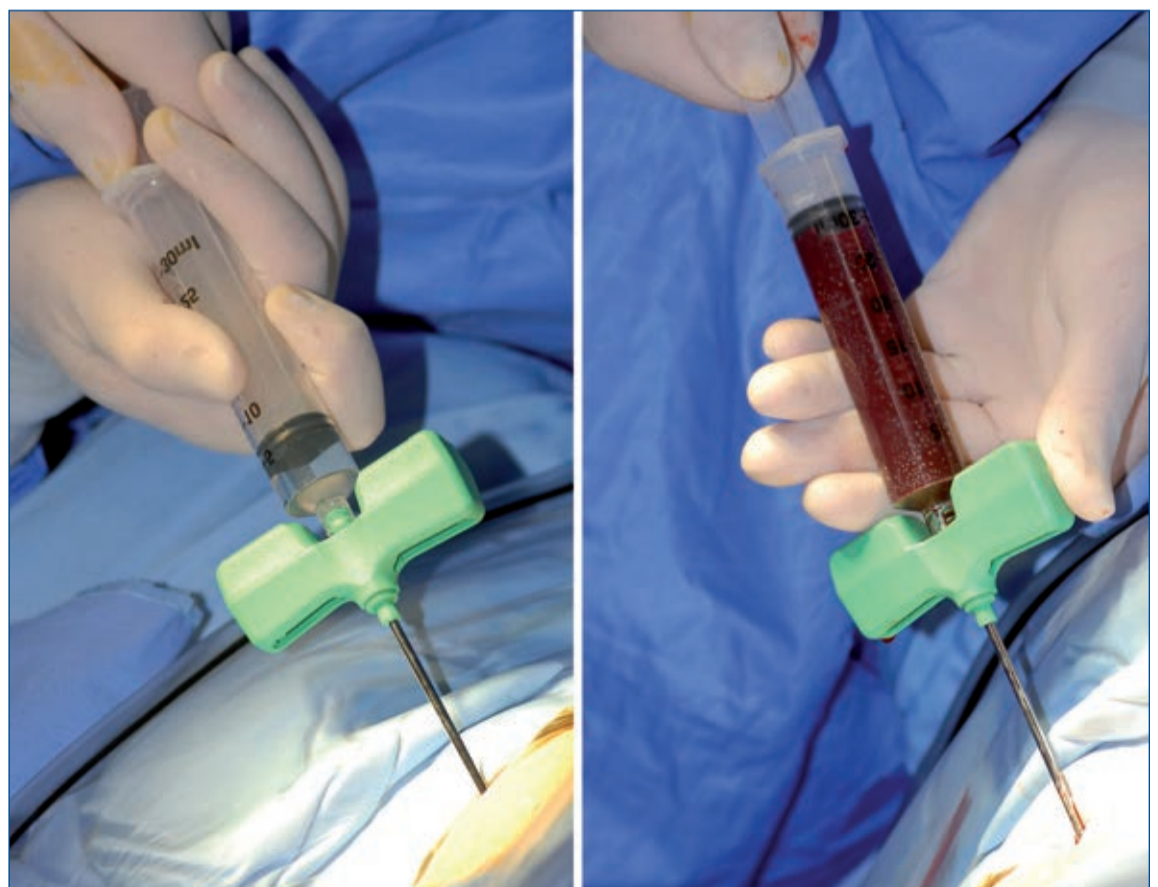


Figura 4 - Prelievo di sangue midollare da cresta iliaca

Il giorno precedente l'intervento chirurgico, i medici del Centro Trasfusionale eseguono la plasma-piastrianoferesi, raccolgono 400 cc di plasma dal paziente e preparano il gel piastrinico.

Il giorno seguente il paziente può essere sottoposto all'intervento chirurgico. In sala operatoria vengono prelevati in anestesia generale circa 80-100 ml di sangue midollare, mediante aspirazioni multiple dalla cresta iliaca posteriore, per evitare di aspirare sangue periferico. (Figura 4)

In laboratorio si separano e preparano le cellule staminali adulte multipotenti in circa 50 minuti. Nel frattempo si esegue la parte strettamente chirurgica, le cellule staminali e il gel piastrinico vengono poste attorno al focolaio chirurgico mediante iniezione *in loco*.

Tale tecnica è stata applicata con buoni risultati:

- nelle **pseudoartrosi atrofiche ed ipertrofiche**;
- nelle **cisti ossee**;
- nelle **necrosi epifisarie parziali del femore**;
- nelle **fratture diafisarie e metadiafisarie**;
- nelle **condropatie di ginocchio**.

Oggi la **tecnica** di trapianto di cellule staminali adulte è eseguita in **one step** (Buda R et al. Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells.

J Bone Joint Surg Am. 2010; Giannini S et al. Arthroscopic bone marrow mononuclear cells transplantation for the treatment of osteochondral lesions of the talus: "one-Step surgical technique". G.I.O.T. 2010).

Il prelievo di midollo osseo è effettuato durante l'intervento chirurgico dalla cresta iliaca del paziente dopodiché, il campione prelevato viene centrifugato. Le MSCs concentrate ottenute sono impiantate direttamente all'interno del sito chirurgico. (Figura 5)

L'aspirato di midollo osseo del paziente permette la concentrazione di cellule staminali mesenchimali direttamente in sala operatoria: da processi di centrifugazione che separano i componenti cellulari per la loro densità oppure da processi di ritenzione (filtrazione) che sfruttano la naturale affinità selettiva delle MSCs a una matrice ossea di origine animale o di sintesi, così imbevuto in pressione negativa di MSCs. Questi nuovi metodi mostrano due evidenti vantaggi: meno costi rispetto all'espansione in vitro delle MSCs e un abbassamento drastico della morbilità del sito donatore rispetto alla tradizionale raccolta a cielo aperto dalla cresta iliaca. Nonostante i buoni risultati, dimostrati da diversi autori, ottenuti con l'utilizzo delle staminali soprattutto se associate a BMPs nel trattamento delle pseudoartrosi (Saito A et al. 2005), permangono degli interrogativi, in particolare non esiste un consenso comune relativo alla possibile diminuzione di MSCs con potenziale osteogenico con il crescere dell'età (Nishida S et al. 1999; Muschler GF 2001). Esiste una grande variabilità di concentrazione delle MSC nel midollo osseo dei pazienti, tra le 200 e le 2.000 MSCs per ml 40, e, in alcune malattie o alcune co-morbilità (fumatori), le cellule del midollo possono essere danneggiate o ridotte di numero. ■

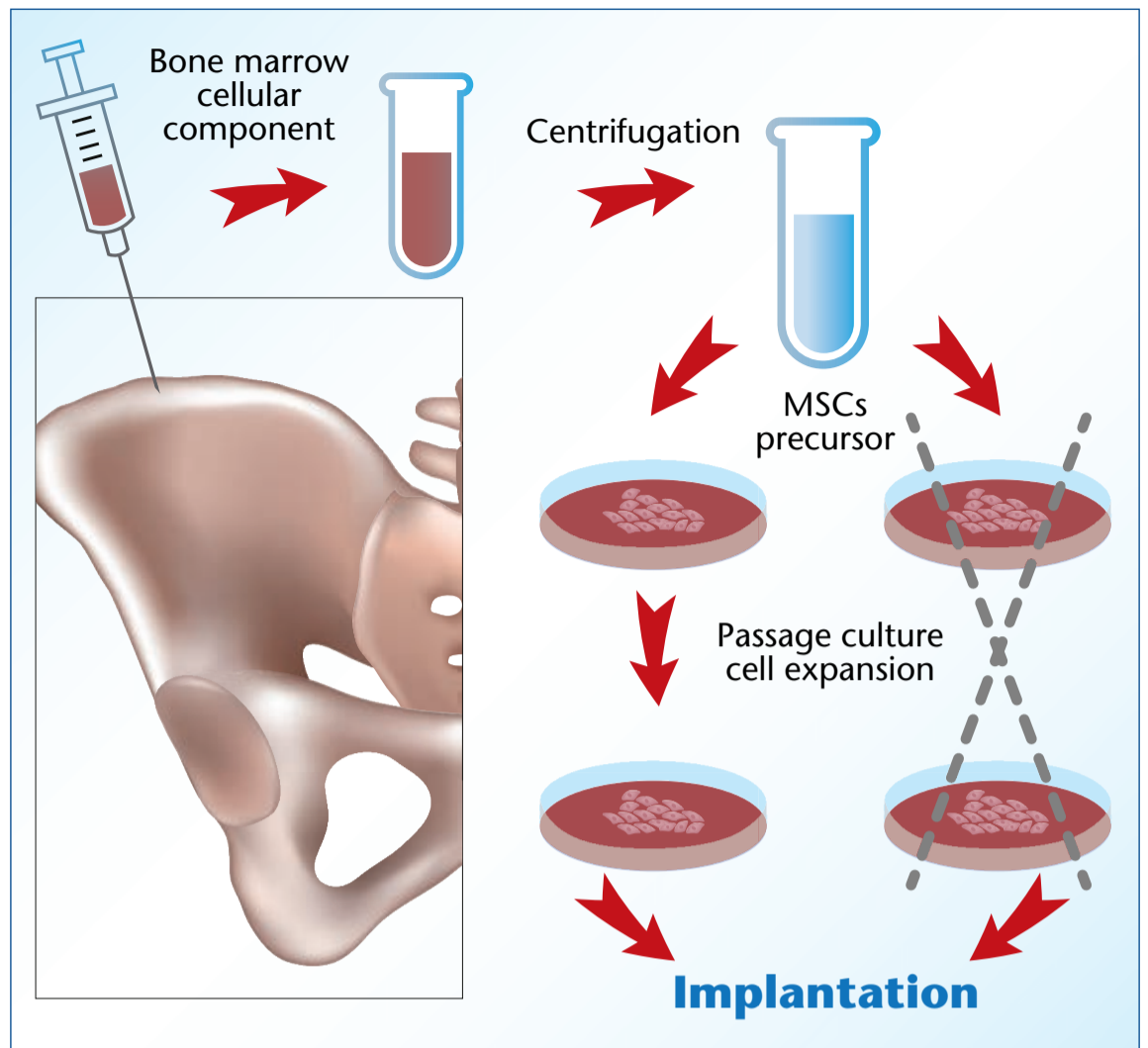


Figura 5 - Le MSCs possono essere usate sia come sospensione cellulare espansa in coltura che come concentrato midollare osseo

LE Tendinopatie

dall'overuse
all'infiammazione

Juventus
STADIUM
TORINO
16
maggio
2015

TOPICS

- Fisiopatologia del tendine
- Le patologie tendinee negli sportivi
- Le patologie tendinee nei malati reumatici
- L'imaging nelle tendinopatie
- Il ruolo dell'ecografia nella fase diagnostica e di follow-up
- L'ecografia nelle procedure interventistiche
- La terapia medica delle tendinopatie
- La terapia chirurgica delle tendinopatie
- La terapia riabilitativa delle tendinopatie
- Trattamenti innovativi

Responsabili Scientifici

Oscar M. Epis (Milano)

Donato Vassalli (Siena)

Sede Congressuale

Juventus STADIUM
Corso Gaetano Scirea 50 - 10151 Torino

Segreteria Organizzativa

dynar.com

Via San Gregorio, 12 - Milano
Tel. +39 0289693762 - Fax +39 02201176
E-mail: valentina.arena@dynamicom.it



IBUPAS®

cerotto medicato a base di ibuprofene

RIASSUNTO DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

1. DENOMINAZIONE DEL MEDICINALE

IBUPAS 136 mg cerotto medicato

2. COMPOSIZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Un cerotto medicato contiene:
principio attivo: ibuprofene 136 mg.
Per l'elenco completo degli eccipienti vedere paragrafo 6.1

3. FORMA FARMACEUTICA

Cerotto medicato.

4. INFORMAZIONI CLINICHE

4.1 Indicazioni terapeutiche

IBUPAS è indicato per il trattamento dei disturbi a livello articolare e peri-articolare causati da patologie infiammatorie e di natura reumatica (es.: tendiniti, borsiti, epicondiliti, peri-artriti) e per il trattamento dei disturbi di tipo infiammatorio e reumatico extra-articolari (es.: fibrositi, miositi).

4.2 Posologia e modo di somministrazione

Usare un solo cerotto medicato per volta e sostituirlo ogni 24 ore per un periodo non superiore a 14 giorni.

IBUPAS è da utilizzarsi esclusivamente per applicazioni sulla cute integra.

Si consiglia di lavare ed asciugare accuratamente la zona dolorante, prima di applicare il cerotto medicato. Nel caso il cerotto medicato debba essere posizionato su articolazioni soggette ad ampia mobilità, come ad esempio il gomito od il ginocchio, si consiglia l'applicazione in senso longitudinale e non trasversale, avendo cura di attaccare il cerotto medicato tenendo l'articolazione parzialmente flessa. Per applicare il cerotto medicato, staccare parzialmente le due parti di film protettivo trasparente nella zona centrale del cerotto medicato in modo da avere una superficie adesiva libera di 2-3 centimetri e far aderire tale parte sulla cute della zona centrale del punto dolorante. Lentamente staccare uno dopo l'altro i due film protettivi, facendo attenzione ad evitare che il cerotto medicato faccia delle pieghe o si attacchi su se stesso. Immediatamente dopo aver attaccato il cerotto medicato, massaggiare leggermente la cute per circa 20 secondi in modo da assicurare una perfetta adesione del cerotto medicato.

Non superare le dosi raccomandate.

Pazienti pediatrici

Non c'è esperienza sull'uso di IBUPAS nei bambini e pertanto se ne sconsiglia l'utilizzo in soggetti di età inferiore a 12 anni (vedere paragrafi 4.3 e 4.4).

4.3 Controindicazioni

Ipersensibilità al principio attivo (ibuprofene) o ad uno qualsiasi degli eccipienti.

È controindicato l'utilizzo di IBUPAS in soggetti in cui si sia manifestata una precedente ipersensibilità all'acido acetilsalicilico o ad altri analgesici o antinfiammatori non steroidei, in pazienti con pregressi episodi di broncospasmo, angioedema o reazioni anafilattoidi.

La somministrazione di IBUPAS è da evitare in pazienti affetti da ulcera peptica in fase attiva, asma bronchiale o affetti da grave insufficienza renale ed epatica.

È altresì da evitare l'utilizzo di IBUPAS in pazienti con storia di emorragia gastrointestinale o perforazione relativa a precedenti trattamenti attivi o storia di emorragia/ulcera peptica ricorrente (due o più episodi distinti di dimostrata ulcerazione o sanguinamento), in terapia con anticoagulanti (vedere paragrafo 4.5) ed infine in casi di grave insufficienza cardiaca.

Evitare inoltre l'applicazione del cerotto medicato su cute lesa o in zone che presentino dermatosi o infezioni. Evitare il contatto con gli occhi e le mucose.

L'uso di IBUPAS è controindicato in gravidanza e allattamento (vedere paragrafo 4.6) e nei bambini al di sotto di 12 anni.

4.4 Avvertenze speciali e precauzioni di impiego

I livelli plasmatici di ibuprofene raggiunti dopo la somministrazione del cerotto medicato sono molto più bassi di quelli ottenuti mediante somministrazione sistemica e pertanto l'insorgenza di effetti collaterali sistemici è verosimile che sia molto ridotta rispetto all'uso sistemico.

Gli analgesici, antipiretici ed antiinfiammatori non steroidei (FANS non selettivi ed inibitori selettivi della COX-2), compreso l'ibuprofene, possono causare reazioni di ipersensibilità, potenzialmente gravi, in soggetti non precedentemente esposti a questo tipo di farmaci. Queste reazioni comprendono attacchi d'asma, eruzioni cutanee, riniti allergiche e reazioni di tipo anafilattico.

Pazienti asmatici, con malattie ostruttive dei bronchi, riniti allergiche o infiammazione della mucosa nasale (polipo nasale) reagiscono più spesso di altri pazienti al trattamento effettuato con FANS, con attacchi asmatici, infiammazione locale della pelle e della mucosa (edema di Quincke) o orticaria.

Usare cautela nel somministrare IBUPAS in pazienti con anamnesi di ulcera peptica o di emorragia gastrointestinale non secondaria alla somministrazione di FANS e nei casi di colite ulcerosa e morbo di Crohn. È inoltre sconsigliato in caso di diatesi emorragica, gravi disfunzioni epatiche o renali ed in casi di insufficienza cardiaca.

Cautela deve essere prestata ai pazienti che assumono farmaci concomitanti che potrebbero aumentare il rischio di ulcerazione o emorragia, come corticosteroidi orali, anticoagulanti come warfarin, inibitori selettivi del reuptake della serotonina o agenti antiaggreganti come l'aspirina (vedi sezione 4.5).

L'uso prolungato o ripetuto di prodotti per uso cutaneo può dare origine a fenomeni locali di sensibilizzazione. In presenza di reazioni di ipersensibilità è necessario interrompere immediatamente la terapia e consultare il medico ai fini della istituzione di una terapia idonea.

Dopo breve terapia senza risultati apprezzabili, consultare il medico.

Si deve usare cautela nel trattamento di pazienti anziani che sono generalmente più predisposti agli eventi avversi.

Non c'è esperienza sull'uso di IBUPAS nei bambini e pertanto se ne sconsiglia l'utilizzo in soggetti di età inferiore a 12 anni.

4.5 Interazioni con altri medicinali ed altre forme di interazione

È improbabile che l'impiego di cerotti a base di ibuprofene abbia interazioni con altri medicinali. Non è comunque da escludere la possibilità di competizione tra ibuprofene assorbito ed altri farmaci ad alto legame con le proteine plasmatiche.

Non utilizzare il prodotto insieme ad altri farmaci per uso orale o locale contenenti ibuprofene od altri FANS.

4.6 Gravidanza ed allattamento

IBUPAS è controindicato durante la gravidanza e l'allattamento.

Va anche evitato l'uso nel caso si sospetti una gravidanza o si desideri pianificare una maternità.

4.7 Effetti sulla capacità di guidare veicoli e sull'uso di macchinari

Non sono stati effettuati studi sulla capacità di guidare veicoli e sull'uso di macchinari dal momento che non ci si attende che IBUPAS interferisca con tali capacità.

4.8 Effetti indesiderati

Gli effetti indesiderati possono essere minimizzati riducendo la durata del trattamento al più breve tempo possibile che occorre per controllare i sintomi.

Per determinare la frequenza delle reazioni avverse sono stati usati dati provenienti dagli studi clinici sul prodotto.

Per la classificazione delle frequenze è stata adottata la seguente convenzione:

Molto comuni $\geq 1/10$; Comuni $\geq 1/100$ - $< 1/10$; Non comuni $\geq 1/1.000$ - $< 1/100$; Rari $\geq 1/10.000$ - $< 1/1.000$; Molto rari $< 1/10.000$

Tabella 1: Incidenza di effetti indesiderati associati al trattamento negli studi clinici controllati

Classificazione per sistemi e organi e frequenza	Reazione indesiderata
Patologie del sistema nervoso	
Comuni	Secchezza delle fauci, cefalea, disgeusia
Patologie gastrointestinali	
Comuni	Nausea
Patologie della cute e del tessuto sottocutaneo	
Comuni	Edema facciale, vescicole
Patologie del sistema muscoloscheletrico e del tessuto connettivo	
Comuni	Malessere generale
Patologie sistemiche e condizioni relative alla sede di somministrazione	
Molto Comuni	Lieve eritema
Comuni	Prurito, bruciore, chiara manifestazione eritematosa, esfoliazione cutanea e fessurazione

Tutti gli eventi avversi riscontrati negli studi clinici sono stati di natura lieve e transitoria.

Da dati di letteratura, come per altri FANS, raramente possono verificarsi reazioni di ipersensibilità locali, dermatiti da contatto, intorpidimento e formicolii nel sito di applicazione.

Con questo tipo di medicinali sono stati riportati casi di lesioni dermatologiche estese e gravi quali eritema multiforme, edema di Quincke e, molto raramente, reazioni bollose includenti Sindrome di Stevens-Johnson e Necrosi Tossica Epidermica. Le reazioni indesiderate sistemiche a seguito dell'impiego topico di ibuprofene sono poco probabili in quanto i livelli plasmatici di ibuprofene rilevati a seguito dell'applicazione di IBUPAS sono molto più bassi di quelli rilevabili con la somministrazione sistemica di farmaci a base di ibuprofene. Tuttavia, a seguito di applicazioni per lunghi periodi di tempo, oltre il termine consigliato e la non osservanza di controindicazioni ed avvertenze, non è possibile escludere la comparsa di effetti indesiderati sistemici, soprattutto a livello gastroenterico (vedere paragrafi 4.4 e 5.2).

4.9 Sovradosaggio

Non sono stati riportati casi di sovradosaggio.

5. PROPRIETA' FARMACOLOGICHE

5.1 Proprietà farmacodinamiche

Categoria farmaco terapeutica: farmaci per uso topico per dolori articolari e muscolari

Codice ATC: M02AA13

Ibuprofene è un potente inibitore della sintesi prostaglandinica e gli effetti farmacologici sono legati principalmente all'inibizione della sintesi prostaglandinica a livello periferico.

5.2 Proprietà farmacocinetiche

L'applicazione cutanea di IBUPAS determina la diffusione di ibuprofene attraverso la cute ed il tessuto sottocutaneo nei tessuti sottostanti il sito di applicazione. Tramite l'assorbimento diretto locale del principio attivo, si è in grado di raggiungere concentrazioni terapeuticamente efficaci di ibuprofene nei tessuti profondi sottostanti il sito di applicazione, ma con un'esposizione sistemica estremamente bassa. Dopo singola somministrazione si osserva una concentrazione plasmatica massima compresa mediamente tra 85 e 120 ng/ml, raggiunta dopo circa 24 ore. Dopo applicazioni ripetute la concentrazione plasmatica raggiunge lo "Steady-state" al sesto giorno con valori di circa 300 ng/ml. Dopo applicazioni ripetute l'emivita plasmatica è compresa approssimativamente tra le 2 e le 3.9 ore. Ibuprofene presenta un forte legame (>99%) alle proteine plasmatiche.

L'eliminazione della sostanza avviene per via renale, principalmente sotto forma di metaboliti. Il profilo metabolico, dopo applicazione topica, è simile a quello osservato dopo somministrazione orale. Non è nota l'influenza dell'assunzione di cibo sull'assorbimento per via topica. I dati raccolti non hanno posto in evidenza una possibile influenza dell'assunzione di cibo sulla risposta terapeutica.

5.3 Dati preclinici di sicurezza

Ibuprofene è estesamente impiegato nella pratica clinica da molti anni, con una limitata incidenza di effetti indesiderati. Le prove di tossicologia effettuate su diverse specie animali e tramite varie vie di somministrazione, hanno messo in evidenza una buona tollerabilità del prodotto. La DL₅₀ dopo somministrazione orale nel topo è circa 1200 mg/kg e nel ratto è circa 1000 mg/kg. La somministrazione di FANS a ratte gravide può determinare una restrizione del dotto arterioso fetale.

6. INFORMAZIONI FARMACEUTICHE

6.1 Elenco degli eccipienti

Sale di potassio del copolimero di 2-etilacrilato, metilacrilato, acido acrilico, glicidimetacrilato; acido oleico; Al+3.

Matrice di supporto: PET

Film protettivo: PET siliconato

6.2 Incompatibilità

Nessuna nota.

6.3 Periodo di validità

A confezionamento integro: 36 mesi. A confezionamento aperto: 3 mesi

6.4 Precauzioni particolari per la conservazione

Nessuna particolare condizione di conservazione.

6.5 Natura e contenuto del contenitore

Astuccio contenente 1 busta laminata richiudibile; ogni busta richiudibile contiene 5 o 7 cerotti medicati da 136 mg.

6.6 Precauzioni particolari per lo smaltimento

Il medicinale non utilizzato ed i rifiuti derivati da tale medicinale devono essere smaltiti in conformità alla normativa locale vigente.

7. TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO

SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.a. Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma - Italia

Concessionaria per la vendita

BIOFUTURA PHARMA S.p.A. Via Pontina km 30,400 - 00040 Pomezia (Roma)

8. NUMERO DI AUTORIZZAZIONE

IBUPAS 136 mg cerotto medicato - confezione da 5 cerotti - AIC n. 036439014

IBUPAS 136 mg cerotto medicato - confezione da 7 cerotti - AIC n. 036439026

9. DATA PRIMA AUTORIZZAZIONE O RINNOVO

Autorizzazione: 26/07/2010 (5 cerotti) 17/10/2011 (7 cerotti)

10. DATA DI REVISIONE DEL TESTO

Maggio 2012

Concessionario per la vendita

Titolare dell'AIC:

Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

biofutura
gruppo sigma-tau

Utilizzo delle cellule staminali in chirurgia vertebrale

A. Pantalone¹, V. Salini¹, I. Antonucci², M. GB Guelfi³, M. Guelfi¹, S. Massimi¹, L. Stuppi², D. Vanni¹

¹ Clinica Ortopedica e Traumatologica, Università "G. d'Annunzio" di Chieti - Pescara - ² Dipartimento di Scienze Psicologiche, Umanistiche e del Territorio, Università "G. d'Annunzio" di Chieti - Pescara - ³ Divisione Ortopedica, Clinica Montallegro - Genova

L'identificazione e la successiva caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali hanno costituito una svolta epocale in chirurgia ortopedica e negli ultimi anni anche in chirurgia vertebrale.

Ciò sta modificando profondamente l'approccio sia alle tecniche di fusione spinale quanto soprattutto l'atteggiamento terapeutico verso la malattia degenerativa del disco. In questi ambiti si può trovare una proficua applicazione della terapia cellulare con cellule staminali, con conseguenti indubbi vantaggi per il paziente. Attualmente, una terapia cellulare di supporto alla quotidiana pratica chirurgica è poco praticata. In effetti, l'unica risorsa disponibile è costituita da sostituti ossei, organici (autologhi o omologhi) o sintetici, il cui unico scopo è di sostenere e promuovere la proliferazione osteoblastica endogena a livello vertebrale.

Tale approccio è applicabile solo agli interventi di artrodesi vertebrale e comunque fa affidamento esclusivamente sulla capacità osteoproliferativa autologa, che risulta spesso inefficace, soprattutto in pazienti anziani.

Alla luce degli studi condotti, sia *in vitro* che *in vivo*, le cellule staminali adulte mostrano un'importante capacità proliferativa, anche a lungo termine, un efficiente "self-renewal" e una capacità di differenziazione multipotente. Tali caratteristiche sono di fatto peculiari, preziose ma soprattutto uniche.

Artrodesi vertebrale (Spinal Fusion)

La tecnica di fusione spinale, introdotta circa un secolo fa, rappresenta una delle procedure più comunemente impiegate in chirurgia vertebrale.

Ogni anno negli Stati Uniti si eseguono circa 350.000 interventi di fusione, con un aumento di circa il 200% negli ultimi dieci anni. Purtroppo, a fronte dei notevoli progressi ottenuti sia in termini di disponibilità di nuovi materiali, oltre che nell'affinamento delle tecniche chirurgiche, fino al 40% degli interventi di fusione può complicarsi con ritardi di guarigione o pseudoartrosi, rendendo pertanto necessario l'intervento di revisione.

Diversi possono essere i fattori responsabili di tale fallimento: compromissione del bone stock autologo, come accade nel paziente anziano/osteoporotico, fumo, diabete ma soprattutto una diminuzione della cellularità dell'autotrapianto, in particolare modo nell'anziano. Sebbene l'osso autologo rimanga attualmente il "gold standard", oltre alla "donor site morbidity" in caso di autotrapianto, le problematiche in precedenza esposte hanno spinto i ricercatori a orientarsi verso metodiche alternative. La "conditio sine qua non" di una corretta fusione, prevede un'attiva popolazione osteoblastica nel sito ricevente di sia cellule progenitrici

che cellule mature; altrettanto importante è che tali elementi cellulari possano esprimere un idoneo "signaling" intercellulare, responsabile di una differenziazione verso la linea osteoproduttrice.

Infine è necessario uno "scaffold" idoneo che possa consentire l'intero processo. Indubbiamente la fase più critica consiste nella proliferazione e differenziazione delle cellule osteoproduttrici mature (osteoblasti) ma soprattutto dei loro precursori, ossia le cellule staminali mesenchimali. Queste ultime hanno suscitato notevole interesse a causa delle loro caratteristiche di autorinnovamento e multipotenzialità. Gli ultimi studi preclinici si sono concentrati sull'impiego di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo o tessuto adiposo.

Nel 2001, Cui ha impiegato cellule osteoprogenitrici da midollo osseo per ricreare in un modello murino atimico un prototipo di fusione postero-laterale. Esso si è dimostrato più resistente e rapido rispetto a quello eseguito attraverso l'utilizzo di cellule miste da midollo. Inoltre la possibilità di ingegnerizzare le cellule staminali, trasferendo al loro interno fattori di crescita specifici, come nel caso della proteina morfogenetica ossea di tipo 2 (BMP-2), permette di ottenere fusioni ancor più efficaci (Peterson et al.).

Anche le cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo si sono dimostrate un'alternativa eccellente, poiché a fronte di risultati equivalenti a quelle di origine midollare, sono sicuramente di più facile reperibilità, come descritto da Miyazaki. Il tessuto adiposo fornisce quindi un'ulteriore e promettente fonte di staminali.

Come già anticipato in precedenza, ancor più interessante sarebbe coltivare o addirittura di trasferire cellule staminali con fattori di crescita differenti, al fine di amplificarne le capacità replicative ma soprattutto di promuoverne la differenziazione cellulare verso citotipi specifici. Shen ha dimostrato, infatti, come la differenziazione in senso osteoblastico di cellule staminali mesenchimali di ratto derivate da tessuto adiposo, possa essere promossa dalla loro coltivazione in terreni arricchiti da growth and differentiation factor-5 (GDF-5).

Inoltre, Hsu ha evidenziato che cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo presentano un'importante potenzialità come vettori cellulari per proteine ricombinanti (es: BMP-2).

Concordi con questi stessi risultati gli studi di Miyazaki e Lopez. Tuttavia non può negarsi che il complesso processo di osteoformazione sia influenzato da una varietà di segnali biologici, compresi il carico meccanico e stimoli elettromagnetici e/o chimici. Sebbene molti fattori di crescita siano stati impiegati per il loro ruolo di promozione del differenziamen-

to osteogenico delle staminali, solo pochi si sono dimostrati efficaci e impiegabili nella fusione spinale. BMP-2 si è rivelato un proficuo fattore osteoinduttivo.

Tuttavia già nel 2003 è stato dimostrato il danno potenziale di alte dosi di BMP, necessarie per indurre una fusione spinale nell'uomo. Di fatto, alla luce degli ultimi studi (Peterson et al, Miyazaki et al, Hsu et al) è stata dimostrata la possibilità di eseguire una comunque una valida fusione, ma impiegando ridotte concentrazioni di BMP.

Oltre a BMP-2, anche BMP-7, noto anche come proteina osteogenica-1, è un altro fattore di crescita impiegabile efficacemente in questo processo, come dimostrato Hidaka, il quale ne ha evidenziato l'efficacia, utilizzando cellule staminali da midollo osseo modificate attraverso un vettore adenovirale-BMP-7.

Da ultimo Zhu ha dimostrato che il trasferimento combinato di BMP-2 e BMP-7, è risultato significativamente più efficace nell'induzione della differenziazione in senso osteoblastico, rispetto a un loro utilizzo individuale, ma soprattutto non sono stati evidenziati danni collaterali, potendo ridurre la concentrazione dei singoli fattori. Sebbene gli studi *in vitro* e *in vivo* (animali) abbiano abbondantemente e sufficientemente gettato basi importanti per l'applicazione delle cellule staminali nel processo di fusione spinale, la transizione verso studi (umani) *in vivo*, costituisce un passo fondamentale per la successiva introduzione di tali procedimenti nella pratica chirurgica quotidiana.

Malattia degenerativa del disco intervertebrale

La degenerazione del disco-intervertebrale rappresenta un processo patologico involutivo caratterizzato da una serie di alterazioni molecolari e, solo in seguito, morfologiche che interessano l'intera struttura del disco intervertebrale, con conseguente riduzione del suo turgore ed elasticità. Ciò determina irrimediabilmente una progressiva "disfunzione" e, nel tempo, una conseguente instabilità degli elementi costituenti l'unità funzionale spinale. L'impatto economico-sanitario che ne deriva è ingente: sono stimati costi tra i 50 e i 90 miliardi di dollari all'anno nei soli Stati Uniti.

Il management del low-back pain associato alla malattia degenerativa del disco, è incentrato soprattutto su opzioni conservative: correzione dello stile di vita, terapia fisico-riabilitativa e terapia farmacologica a scopo analgesico-antinfiammatorio-decontratturante.

Nei casi più gravi e refrattari alla terapia conservativa sono previste terapie chirurgiche finalizzate all'immobilizzazione dell'unità funzionale spinale coinvolta, attraverso un'artrodesi intervertebrale.

Negli ultimi anni si è proposto un approccio chirurgico di tipo funzionale, basato sulla ricostruzione artificiale del disco attraverso una protesi.

I risultati, tutt'altro che riproducibili, soprattutto nel secondo caso, spesso non sono soddisfacenti. Entrambe le procedure non agiscono alla radice del problema e si propongono piuttosto esclusivamente come soluzione tardiva.

Infatti, non intervengono sul processo di degenerazione del disco, cercando di rallentarlo, ma direttamente sul trattamento dell'esito della patologia e delle sue complicanze. Per ben comprendere il razionale dell'applicazione delle cellule staminali, bisogna valutare in dettaglio l'anatomia discale. Il disco intervertebrale è composto da un anulus fibroso (AF) duro, costituito da sfoglie di tessuto, disposte perifericamente ad avvolgere un nucleo polposo (NP) amorfo. Queste strutture hanno una cellularità differente, sia in termini qualitativi sia quantitativi.

Le cellule in AF sono fibroblasti la cui matrice extracellulare è prevalentemente composta da collagene di tipo I e contiene relativamente basse quantità di proteoglicani e acqua. All'interno del NP, le cellule assumono una morfologia più arrotondata (condrocito-like); la matrice extracellulare è invece composta da collagene di tipo II associata a un'elevata concentrazione di proteoglicani con proporzioni inverse (collagene-proteoglicani) rispetto ad AF. Alla base della patologia degenerativa del disco esiste un'alterazione di tale equilibrio. Pertanto, il target dell'utilizzo delle cellule staminali consiste nella possibilità di integrare o ricostituire la popolazione delle cellule discali, al fine di ripristinarne il "pattern" originale, in termini quali e quantitativi.

Come per la rigenerazione ossea, sono state prese in considerazione differenti fonti di cellule staminali, ma soprattutto midollo osseo e tessuto adiposo.

Ottenere cellule staminali orientate e/o orientabili verso la linea condrodrocitaria, rappresenta il gold standard per il trattamento di questo tipo di patologia. Yamamoto ha valutato l'impiego di cellule stromali derivate dal midollo osseo, finalizzate all'up-regolazione della vitalità delle cellule del nucleo polposo native in un sistema di co-cultura a contatto diretto. L'autore ha descritto una "upregulation" significativa in termini di proliferazione cellulare, sintesi di DNA e proteoglicani nelle cellule del NP che avevano contatto diretto cellula-cellula con cellule staminali da midollo osseo.

Stoyanov ha definito come orientare in senso condrocitario le staminali da midollo osseo attraverso l'utilizzo di TGF- β e GDF-5. Allon ha realizzato infine il primo modello murino, dimostrando una prevenzione della degenerazione discale *in vivo* attraverso l'utilizzo di cellule sta-

minali.

Negli ultimi anni si è guardato con interesse anche alle staminali di origine adiposa, data la facilità di approvvigionamento e il maggior numero di cellule ottenibili rispetto al midollo osseo o altre fonti. Liang ha recentemente condotto uno studio *in vitro* su entrambe le tipologie di cellule staminali, dimostrando la non inferiorità delle cellule derivate dal tessuto adiposo.

Poiché il metabolismo cellulare del disco intervertebrale è modulato da una varietà di fattori di crescita che agiscono sia con ruolo paracrino che autocrino, questa potrebbe essere un'altra valida modalità per agire in maniera più o meno diretta sulla citopopolazione discale.

In tal modo sarebbe possibile tentare di aumentare la sintesi dei componenti della matrice extracellulare e/o bloccarne il loro catabolismo. I fattori di crescita possono essere applicati sia come proteine "nude" oppure trasferiti all'interno di cellule.

Numerosi fattori di crescita sono stati considerati: fattore di crescita trasformante-b, insulin-like growth factor-1, GDF-5, osteogenic protein-1/BMP-7, BMP-2 e 12 e Fattore fibroblastico-2. Feng ha esaminato in un modello murino gli effetti della GDF-5 sulla condrogenesi di cellule staminali derivate da tessuto adiposo. L'autore ha dimostrato che GDF-5 si comporta come un potente induttore della condrogenesi delle staminali, in questo caso derivate da tessuto adiposo e che esse possono essere geneticamente ingegnerizzate per esprimere fattori di crescita procondrogenici.

Si conferma pertanto un ipotetico ma promettente impiego terapeutico nel trattamento della patologia degenerativa discale umana.

In conclusione, il futuro della chirurgia della colonna vertebrale è in continua evoluzione e i recenti progressi nelle tecnologie basate sull'impiego di cellule staminali, sia per gli interventi di artrodesi vertebrale, che per il trattamento della malattia degenerativa del disco, sono entrambi promettenti.

Sia in termini di osteogenesi che condrogenesi, le cellule staminali adulte, derivate dal midollo osseo o tessuto adiposo, si sono dimostrate ampiamente valide negli studi preclinici.

Vari fattori di crescita sono stati brillantemente impiegati con lo scopo di migliorare le proprietà specifiche delle cellule, amplificandone così l'eventuale potenziale clinico.

Tale approccio rivestirà senza dubbio un ruolo fondamentale sia per "rigenerare" il tessuto malato in processi patologici come la malattia degenerativa del disco, sia per migliorare il tessuto ospite negli interventi di fusione spinale. Ci auguriamo che tutto questo avvenga in un futuro non troppo lontano. ■

Ligatender®

*Integratore alimentare di Metilsulfonilmetano,
Ornitina alfa-chetoglutarato, Lisina, Condroitinsolfato,
Glucosamina, Vitamina C, Vitamina E e Biotina*



**Musica per tendini
e legamenti**