

# INGEGNERIA TESSUTALE DELLA CARTILAGINE

Selenia Casciana, Denise Luchetta, Aronne Murciano,  
Pietro Navalesi, Emanuele Russello, Alessio Siliberto

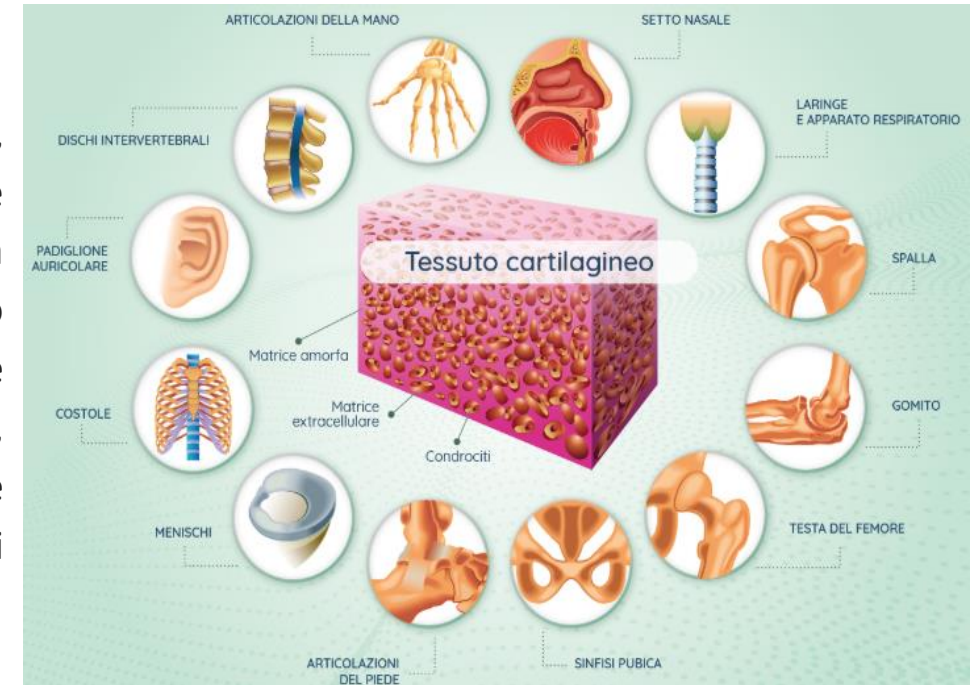


# Sommario

- Introduzione e funzione
- Cellule differenziate e staminali
- Traumi e terapie
- Tecniche di nuova generazione
- Scaffold
- Bioreattori
- ATMPs

# INTRODUZIONE

La cartilagine è un tessuto particolare perché a differenza dagli altri tessuti, non ha una rete di capillari, e quindi un apporto di ossigeno e sostanze nutritive, e questa è una spiegazione del fatto che la cartilagine ha una poverissima capacità intrinseca di ripararsi. La cartilagine è un tessuto soggetto spesso a numerosi stress ed è anche colpita da malattie degenerative. Sono questi i motivi per cui la cartilagine è soggetta a studi, con lo scopo di ricrearla in vitro e poi inserirla laddove ce n'è bisogno grazie ad interventi chirurgici, ma anche in vivo cercando stimoli in grado di aumentare la capacità rigenerativa della zona colpita.



# LA FUNZIONE

Il tessuto cartilagineo rappresenta l'abbozzo per quasi tutte le ossa dello scheletro che successivamente verranno sostituite dal tessuto osseo vero e proprio, perciò è un tessuto indispensabile per lo sviluppo e l'accrescimento delle ossa stesse. La cartilagine è particolarmente flessibile e, grazie alla consistenza della propria matrice extracellulare, è in grado di resistere a sollecitazioni meccaniche senza subire deformazioni permanenti, fornire sostegno ai tessuti molli, ed essendo capace di recuperare la sua forma, la cartilagine fornisce alle articolazioni una superficie ammortizzante adatta agli scorrimenti, donando una maggiore concordanza dei capi articolari e riducendo l'usura degli stessi nelle sollecitazioni fisiologiche e nei microtraumi.

## CENNI ISTOLOGICI

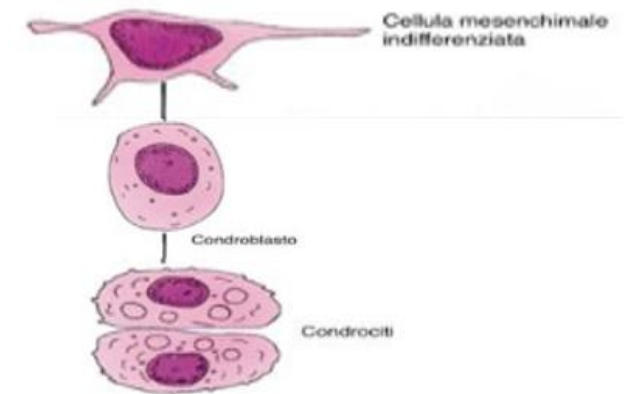
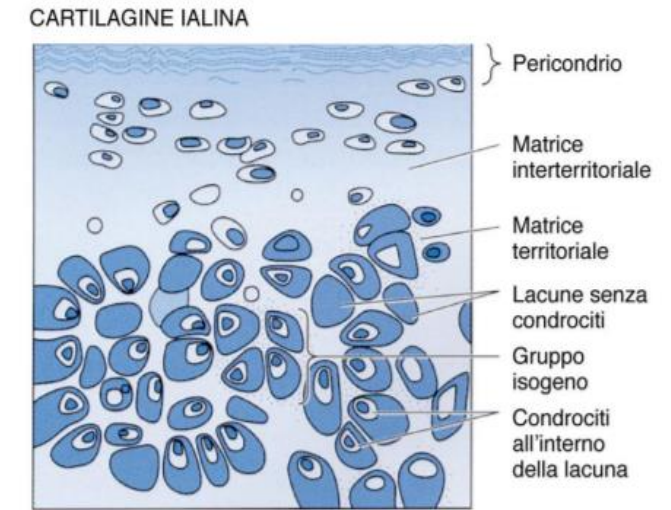
Il tessuto cartilagineo è un tessuto connettivo di sostegno specializzato. È costituito da cellule dette condrociti, immerse in un'abbondante sostanza amorfa intercellulare, da essi stessi sintetizzata, fatta da fibre collagene e da una matrice gelatinosa. Le cartilagini vengono classificate in base alla quantità e alla costituzione della sostanza amorfa. Vi sono tre tipi di cartilagine: ialina, Elastica e Fibrosa.

La cartilagine IALINA comincia la sua formazione durante la quinta settimana di sviluppo embrionale, a partire dal mesenchima differenziatosi dal mesoderma. Le cellule mesenchimali subiscono modificazioni quali la scomparsa dei loro prolungamenti citoplasmatici e la trasformazione in cellule più tondeggianti (condrificazione). Gruppi di cellule mesenchimali subiscono queste modificazioni e ogni nuovo gruppo in differenziazione viene detto centro di condrificazione. Quando le cellule dei centri cominciano a secernere una matrice simil cartilaginea e a sintetizzarne le fibre collagene, possono essere identificate come **condroblasti**. A mano a mano che i condroblasti secernono la matrice cartilaginea si allontanano fra loro e rimangono intrappolati nelle lacune. Quando l'attività del condroblasto diminuisce esso può essere identificato come **condrocita**. Mentre i condroblasti secernono la matrice, il **mesenchima non differenziato** circonda l'intera struttura in formazione e costituisce il **pericondrio**, formato da cellule staminali unipotenti, dette cellule condro-progenitrici, e contiene a differenza della cartilagine pura, dei vasi sanguigni e vasi linfatici.

Da questo punto in poi l'accrescimento cartilagineo può avvenire con due processi:

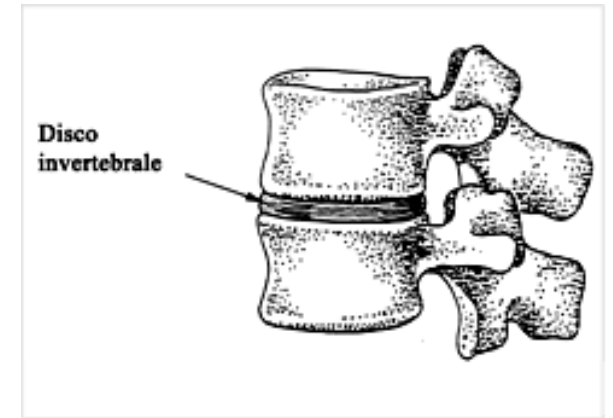
Accrescimento interstiziale: proliferazione dei condroblasti, che secernono matrice cartilaginea finché non sono circondati e immobilizzati, diventando condrociti.

Accrescimento per apposizione: le cellule condro-progenitrici del pericondrio si staccano da esso e si differenziano in condroblasti che secernono matrice cartilaginea.

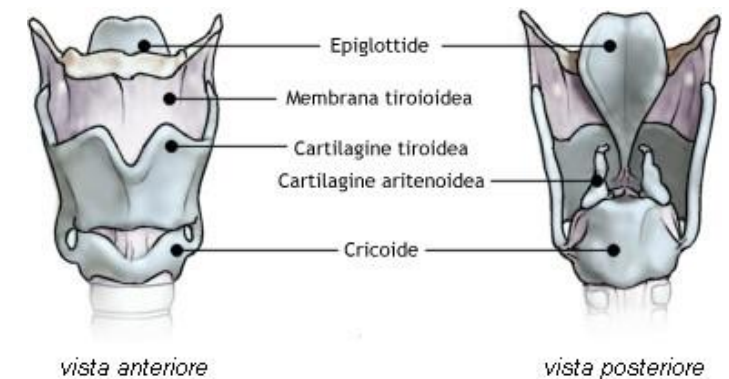




La cartilagine FIBROSA, considerata intermedia tra un tessuto connettivo denso (per via delle fibre di collagene di tipo I) e la ialina (per via della matrice cartilaginea), si origina con un processo sostanzialmente simile a quello della ialina, con la differenza che le cellule mesenchimali si differenziano prima in fibroblasti, che sintetizzano fibre collagene di tipo I e non di tipo II e in misura maggiore, poi si differenziano in condroblasti che cominciano a secernere la matrice cartilaginea. Le cellule mesenchimali non migrano, per cui non si forma il pericondrio e ciò comporta una non autorigenerazione. La cartilagine fibrosa è la costituente dell'anello fibroso dei dischi intervertebrali, della sinfisi pubica, delle zone di inserzione tra tendini e osso, dei menischi.



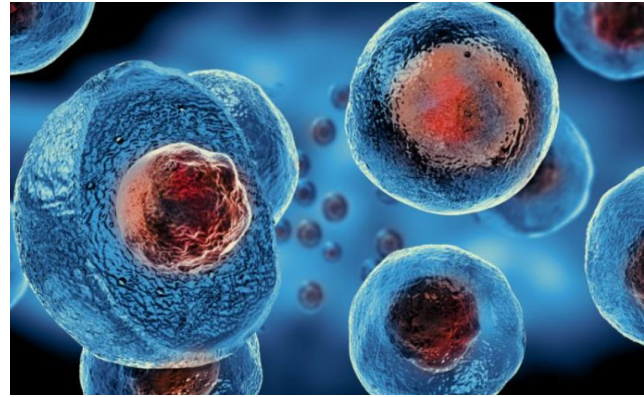
La cartilagine ELASTICA è la tipologia di cartilagine più elastica e flessibile per via della prevalente componente fibrosa rispetto a quella della matrice cartilaginea. Si origina dalla cartilagine ialina, che in questo caso sintetizza prevalentemente molecole di tropoelastina che si associano a formare elastina, la quale poi si aggrega alla fibrillina per formare le fibre elastiche. Non subisce quasi mai calcificazione e possiede pericondrio così come la ialina. Forma il padiglione auricolare, la tuba uditiva e l'epiglottide.



In generale la MATRICE CARTILAGINEA è formata da fibre collagenee (50% del peso a secco), proteoglicani (25-40% del peso a secco), glicoproteine (15% del peso) e fibre elastiche, una struttura qualitativamente simile a quella del connettivo propriamente detto, a cui l'accomuna anche l'elevata idratazione di cui sono responsabili i glicosaminoglicani.

# CELLULE: CONDROCITI E STAMINALI

Le cellule rappresentano l'elemento vitale nella costruzione di un tessuto biologico, siano queste autologhe o provenienti da sorgenti differenti e quindi, presentare fenotipo diverso. L'ideale fonte di cellule per la cartilagine ingegnerizzata è quella che può essere isolata e successivamente espansa senza particolari difficoltà, in grado di sintetizzare i componenti specifici della matrice extracellulare presente nella cartilagine come i proteoglicani e il collagene di tipo II.

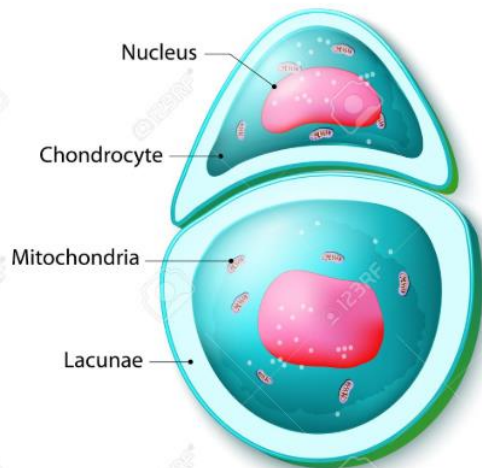


**CHONDROCYTES**

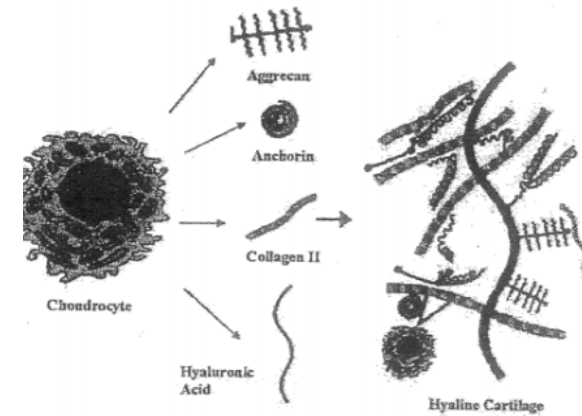
***Cellule staminali***

Per guidare la crescita di un costrutto in maniera affidabile e riproducibile, sono necessari stimoli sia biologici che meccanici nel tempo, provenienti sia dallo scaffold che dall'ambiente biochimico che circonda le cellule. La rigenerazione tissutale permette, quindi, di spostarsi da una visione puramente biologica della cellula, a una visione ingegneristica della stessa, secondo la quale è studiata come struttura biologica in grado di applicare e trasmettere forze, e di tradurre stimoli fisici in risposte biologiche e meccaniche. Il tessuto cartilagineo possiede una particolare struttura non del tutto definita e una composizione molto complicata da riprodurre, in quanto i condrociti non sono semplici da gestire e trattare.

Le strategie adottate sono principalmente due: l'utilizzo di condrociti differenziati, isolati da differenti siti anatomici, oppure l'isolamento di cellule staminali, le quali sono in grado di dare origine a vari tipi di tessuti.



Le cellule differenziate, cioè i condrociti, sono cellule specializzate che presentano un fenotipo ben definito e stabile nel tempo.



## PROBLEMI

- Limitata reperibilità e prelievo.
- Capacità di proliferazione molto limitata e che diminuisce con l'età, cioè con l'aumentare dell'età la numerosità delle cellule a parità di volume diminuisce e le cellule diventano senescenti.
- Bisogna avere la certezza che le cellule prelevate siano sane, altrimenti si ottiene un tessuto ricostruito patologico.
- Problema della de-differenziazione delle cellule quando sono in vitro. I condrociti in coltura, non trovandosi immersi nell'ambiente fisiologico che trovano in vivo, possono perdere il loro fenotipo originale trasformandosi in fibroblasti e riducendo la sintesi di collagene di tipo II, aumentando quella di tipo I (tipico nella pelle).

Le cellule staminali sono cellule primitive non specializzate capaci di dividersi in coltura senza differenziarsi per periodi indefiniti di tempo e/o di differenziarsi generando cellule specializzate, a seguito di particolari stimoli, nel processo di differenziamento cellulare. Si consideri che per la rigenerazione della cartilagine sono utilizzate soprattutto le cellule embrionali o mesenchimali del midollo osseo (evitano risposte infiammatorie a seguito di reimpianti). Altre sorgenti di cellule staminali possono essere il liquido sinoviale, il tessuto adiposo o altri tessuti.

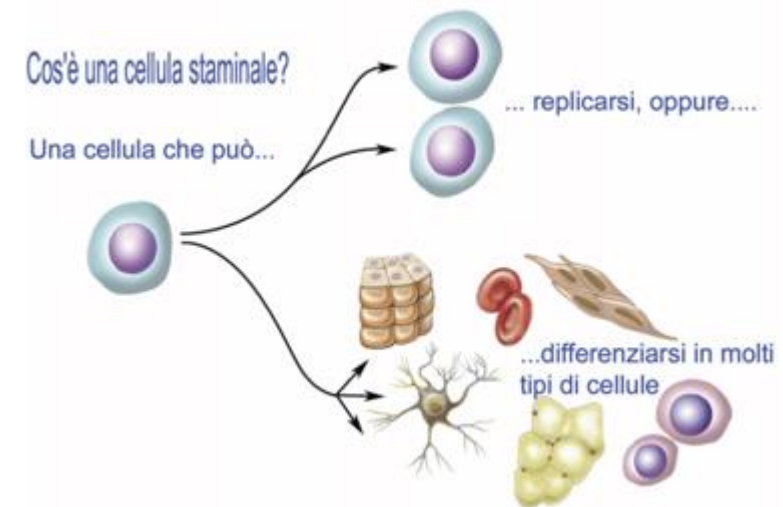
**Le cellule staminali** hanno elevata capacità proliferativa, tempi di divisione cellulare minori rispetto ai condrociti, elevata potenzialità di differenziazione, e il tessuto che ne deriva dipende meno dall'età del donatore, rispetto a quello ottenuto da condrociti differenziati.

Affinché sia possibile indurre la differenziazione di tali cellule in condrociti, sono necessari:

- L'aggiunta di fattori di crescita;
- Stimoli meccanici che ottimizzano la secrezione di proteine condrogeniche.

A seconda dei segnali ambientali che la cellula riceve si ha:

- Replicazione simmetrica, tipica dello stadio di sviluppo embrionale;
- Replicazione asimmetrica, tipica della fase adulta, dove produce due cellule figlie: una specializzata e l'altra staminale. Grazie a questo tipo di divisione asimmetrica è garantita la presenza di una cellula non-differenziata, e quindi la possibilità di riparare il tessuto a cui la cellula appartiene. La capacità di auto-ripararsi o di auto-rigenerarsi dipende infatti dall'assenza o meno di cellule non-specializzate o di cellule labili.





## CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (SE)

- Possiedono una capacità proliferativa praticamente illimitata
- Hanno la possibilità di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula.
- Hanno un ottimo potenziale per la riparazione delle lesioni cartilaginee.
- Non sono ancora stati ottenuti condrociti puri in vitro o in vivo tramite queste cellule
- Bisogna riuscire a prevenire l'ipertrofia e la calcificazione dei condrociti derivanti dalla coltura in vitro, oltre che riuscire a controllare in pieno la differenziazione.

## CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC)

- Molto studiate nella medicina rigenerativa per piccoli e grandi difetti della cartilagine grazie alla loro presenza in varie parti del corpo: midollo osseo, tessuto adiposo, muscolo scheletrico e pelle.
- Le cellule ad oggi più usate sono quelle derivanti dal midollo osseo grazie alla facilità con cui possono essere prelevate e per il loro potenziale condrogenico, in quanto si differenziano velocemente
- Le cellule del midollo osseo sono in grado di generare un tessuto più simile alla cartilagine ialina rispetto alle cellule del tessuto adiposo
- si differenziano in base alla provenienza
- presentano un'alta percentuale di differenziazione osteogenica rispetto alle cellule sinoviali che presentano la miglior differenziazione condrogenica

## CELLULE STAMINALI ADIPOSE (ASC)

- Abbondanza e facilità con cui sono prelevabili
- L'operazione con la quale vengono prelevate è minimamente invasiva e non procura dolore al paziente, evitando danni alla zona di prelievo.
- Il potenziale di condrogenesi risulta inferiore rispetto alle cellule staminali mesenchimali e embrionali.
- A seguito di trapianto possono sorgere alcune problematiche: l'accumulo di matrice, proprietà meccaniche inferiori e l'età.



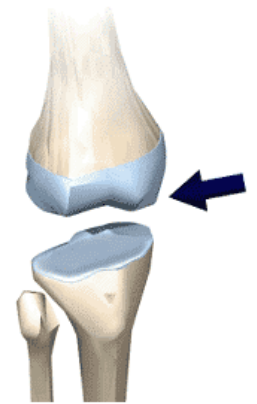
**VANTAGGI**



**SVANTAGGI**

# CARTILAGINE ARTICOLARE

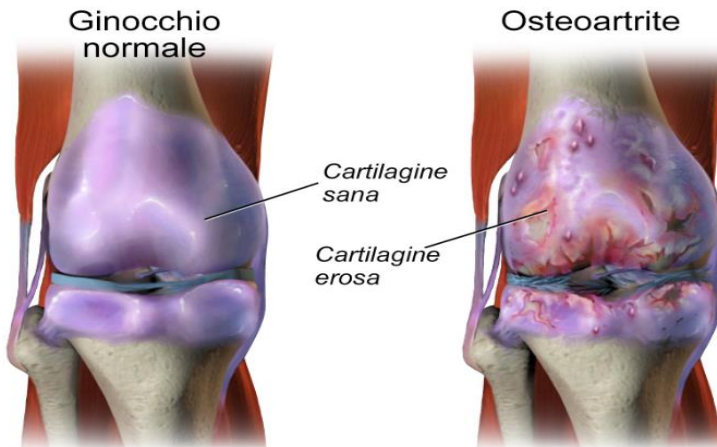
È un tessuto connettivo elastico dotato di notevole resistenza alla pressione e alla trazione, con funzionalità di sostegno e di dissipazione delle sollecitazioni dei movimenti. Funge da cuscinetto ammortizzante, salvaguardando i rapporti articolari. È un tessuto costituito solo per l'1-2% in volume dai soli condrociti. È poi costituito dalla matrice extracellulare, ricca di proteoglicani e glicosamminoglicani, che trattengono una grande quantità di acqua e conferiscono elasticità alla struttura, e da macromolecole, quali il collagene II, che consentono legami robusti per mantenere la forma e sopportare sollecitazioni. In genere si tratta di cartilagine ialina, di colore bianco e riveste le estremità delle ossa articolari, proteggendole dall'attrito e dall'usura e facilitandone la concordanza.



La cartilagine articolare è quella più soggetta a diverse patologie

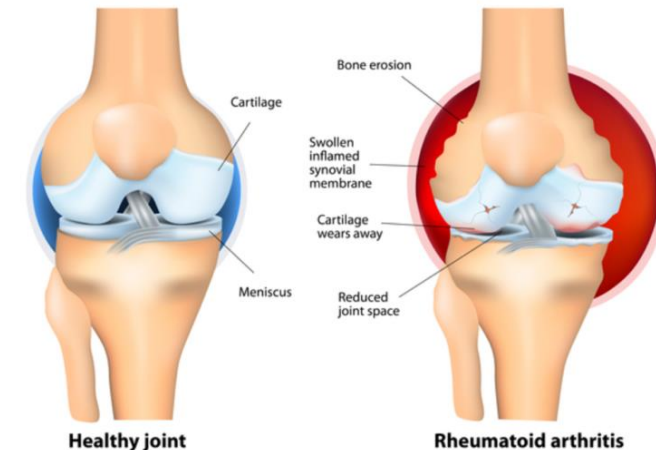
## OSTEOARTRITE

- Perdita di quantità e di integrità dei proteoglicani: minore resistenza meccanica, le fibre di collagene si frantumano e la protezione dei condrociti diventa inefficace.
- I fattori di rischio sono: l'età, i fattori meccanici, l'ereditarietà, l'obesità e l'infiammazione.
- Il dolore di tipo meccanico: viene risvegliato con il movimento e si placa con il riposo.



## ARTRITE REUMATOIDE


- È una malattia autoimmune
- Si presenta con la rigidità, il dolore e la tumefazione ma poi peggiora, degradando le cartilagini dell'osso sottostante e tessuti limitrofi
- Oltre alle dita delle mani, i polsi, i piedi, le ginocchia e le caviglie, la malattia può coinvolgere occhi, polmoni e vasi sanguigni.
- Le prime lesioni compaiono nelle zone più periferiche e non nelle zone soggette a carico.




## **Bibliografia**

1. G. Gualtieri, A. Ferruzzi, P. Calderoni, I. Andreoli, B. Grigolo, A. Facchini, *Autologous Chondrocyte Transplantation in the treatment of articular cartilage lesions of the knee*, 2001.
2. B. Grigolo, L. Roseti, M. Fiorini, L. De Franceschi, A. Facchini, *Tissue engineering applications: cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes*, 2002.
3. [https://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto\\_cartilagineo](https://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto_cartilagineo)
4. <http://lecurenaturali.it/le-malattie-moderne/le-malattie-moderne/artrosi-e-l-artrite-reumatoide-causano-una-degradazione-della-cartilagine-delle-articolazioni>
5. [http://amsdottorato.unibo.it/4720/1/patella\\_silvio\\_tesi.pdf](http://amsdottorato.unibo.it/4720/1/patella_silvio_tesi.pdf)


Le lesioni a cui può essere soggetta la cartilagine possono essere classificate in:




**Microlesioni**, cioè lesioni che non arrivano fino all'osso sub condrale e colpiscono solo superficialmente il tessuto



La zona del danno risulta inaccessibile al sangue e alle cellule progenitrici presenti nell'osso ed è proprio per questo motivo che non vi è la presenza di meccanismi di auto-riparazione. Nelle cellule si verifica la formazione di necrosi e dopo circa tre giorni i condrociti adiacenti alla zona danneggiata iniziano a proliferare e a produrre matrice extracellulare. Nonostante questo, essi risultano in numero esiguo per riuscire a riparare il danno e inoltre cessano la propria attività prima che il tessuto sia guarito



**Ferite** che si spingono fino all'osso e quindi per la totale profondità della cartilagine



Il danno viene riparato dalle cellule staminali del mesenchima originate dal midollo osseo che migrano nel sito danneggiato e lo sostituiscono con tessuto fibrocartilagineo

## ❖ DANNI A CARICO DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

Vi sono tre principali tipi di danno:

- **rottura della matrice:** La ECM è danneggiata; se il danno non è grave, i condrociti rimasti vitali aumentano la loro attività sintetica per riparare il tessuto
- **difetti a spessore parziale:** La rottura della cartilagine resta superficiale e non si estende all'osso subcondrale. Dopo il danno le cellule adiacenti cominciano a proliferare, ma per motivi ancora sconosciuti, il tentativo di riempire il difetto si arresta, prima che il danno sia riparato.
- **difetti a spessore totale:** Il danno attraversa tutto lo spessore della cartilagine e raggiunge l'osso subcondrale.

In tal caso, il difetto è riempito con un coagulo di fibrina e quindi si ha il classico processo di guarigione di una ferita. A differenza che negli altri casi, in questo caso, una popolazione di cellule progenitrici può migrare dal midollo osseo per riparare il difetto. Queste cellule di solito sostituiscono il coagulo di fibrina con un tessuto intermedio fra cartilagine ialina e cartilagine fibrosa che è meno resistente e più permeabile della cartilagine nativa e degrada di solito nel giro di alcuni mesi.

### Cartilagine ha scarsa capacità di autoriparazione dopo un danno

Fattori:

- ai condrociti non è richiesto di proliferare per mantenere la cartilagine, come accade alle cellule di altri tessuti (es. la pelle)
- i condrociti maturi hanno una scarsa attività metabolica
- le cellule progenitrici non hanno accesso tranne nel caso di difetto a pieno spessore
- i condrociti residenti possono essere ostacolati dalla ECM a migrare per riempire il difetto



## ❖ TRATTAMENTI PER I DIFETTI A CARICO DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

Se il danno è grave si interviene con la resezione o altro trattamento chirurgico. Per alleviare il dolore si può anche praticare una osteotomia per rimuovere parte di una delle ossa coinvolte nell'articolazione per ridurre il carico del giunto.

Per lesioni di minore entità al fine di ripristinare la cartilagine sulla superficie articolare si possono usare vari metodi:

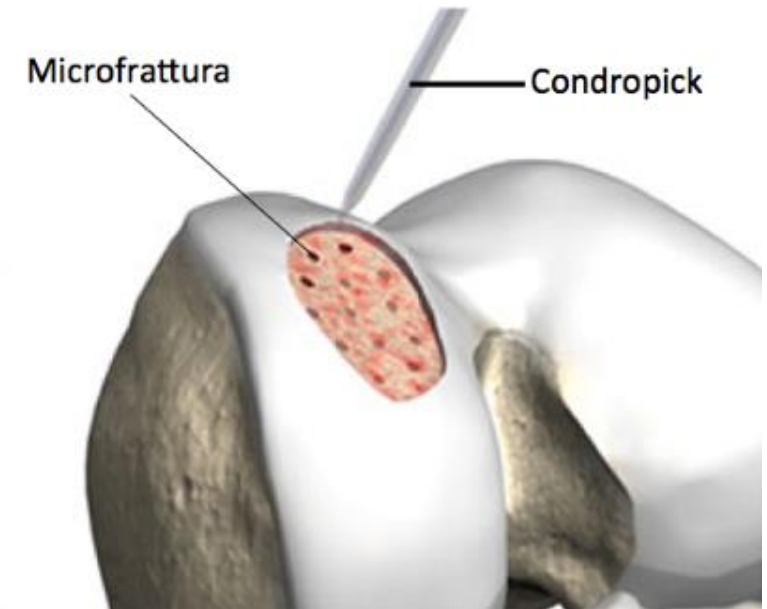
- *microfrattura*
- *impianto di innesti di tessuto di sostituzione*
- *impiego di tecniche che favoriscono il processo di riparazione naturale*

### ➤ Microfratture

Questa tecnica mira a creare numerose perforazioni a livello subcondrale. Lo strato di osso al quale aderisce la cartilagine viene così fatto sanguinare e si forma un nuovo strato di cartilagine qualitativamente più scadente (cartilagine fibrosa) rispetto alla cartilagine originale (cartilagine ialina) ma comunque dotata di caratteristiche biomeccaniche accettabili.

Tecnica prevede:

-la stimolazione midollare, con lo scopo di facilitare la migrazione delle cellule staminali del midollo osseo nel sito della lesione cartilaginea, stimolando i processi di guarigione.



## ➤ Innesti Tessutali

La cartilagine può essere sostituita:

- con autoinnesto (autograft)
- con innesto completo da donatore (allograft)

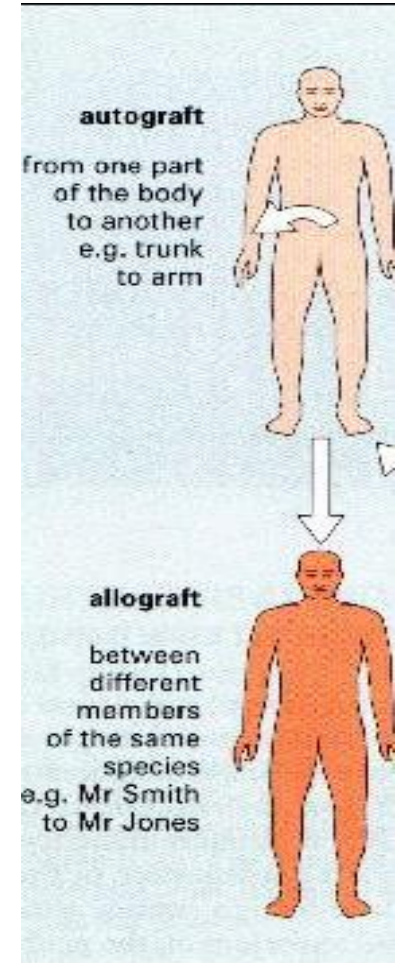
### • INNESTI DA DONATORE

caratterizzati da un tasso di sopravvivenza a 5 anni pari al 95% anche se:

- innesti freschi inducono risposta immunitaria
- innesti congelati riducono la risposta immunitaria
- riduce il dolore nel 70% dei pazienti ma va tenuto comunque conto del danno a carico del sito donatore
- evitano interventi chirurgici a più fasi richiesti nelle procedure di autoinnesto.

### LIMITAZIONI INNESTI DA DONATORE

- tessuti del donatore insufficienti
- morbidità del sito donatore
- mancata corrispondenza superficiale dell'innesto e siti implantari
- instabilità del trapianto
- durabilità limitata nella sua nuova posizione ad elevato carico considerando la provenienza da una regione a basso carico
- indurre reazioni immunitarie come l'infiammazione o il rigetto



## TECNICA AUTOLOGA (MOSAICOPLASTICA)

Impianta molti piccoli autoinnesti osteocondrali in un sito difettoso, è possibile creare un contorno più regolare per difetti piccoli o medi. Procedimento:

- l'innesto composto di osso e cartilagine viene prelevato a forma di cilindro
- viene pressato ad incastro nella zona del difetto opportunamente preparata
- si avrà così una superficie liscia di cartilagine nell'articolazione

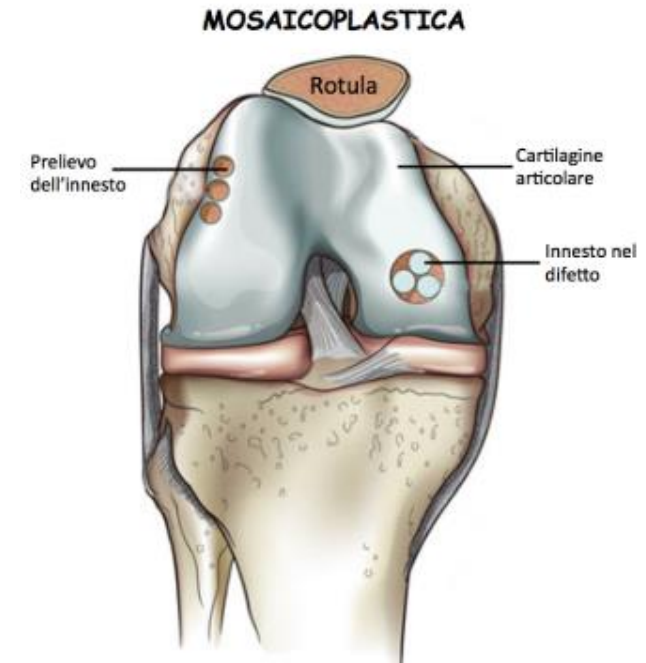
La tecnica ha mostrato risultati promettenti per il trattamento di lesioni cartilaginee articolari che si estendono per 1-4 cm<sup>2</sup>.

- Innesti alternativi

- Periostio
- Pericondrio

Tessuto periostale prelevato da una zona adiacente viene posto nel difetto cartilagineo auspicando che le cellule periostali indifferenziate siano indotte a formare condrociti nel nuovo ambiente. Lo stesso può essere fatto con pericondrio delle costole anche se in tal caso è stata osservata una minore condrogenesi e nel 70% dei casi è stato osservato a 5 anni il fallimento dell'impianto a causa della ossificazione del tessuto derivato dal pericondrio.

Queste procedure portano ad un danneggiamento del sito donatore e possono richiedere una seconda incisione per ottenere il tessuto da trapiantare.



## ❖ RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE

Le tecniche proposte si sono basate:

- ❑ sulla stimolazione delle proprietà rigenerative intrinseche del tessuto;
- ❑ sul trapianto di condrociti extra così da poter formare più tessuto

Nessuna di queste però ha avuto un completo successo.

### ➤ Incremento delle capacità rigenerative

Il trattamento più comune consiste nel penetrare l'osso sub-condrale creando un difetto a pieno-spessore. In tal modo sulla superficie dell'osso si forma un coagulo di fibrina che può costituire uno scaffold per la migrazione di cellule staminali mesenchimali e il loro eventuale differenziamento in condrociti.

Tecniche meno invasive:

- stimolazione elettrica o con laser
- stimolazione mediante agenti farmacologici (fattori di crescita)

### ➤ Trapianto di condrociti extra

La tecnica del trapianto autologo di condrociti per la riparazione di lesioni cartilaginee si è evoluta nel tempo presentando così diverse generazioni, suddivise in:

Prima generazione, ACI

Seconda generazione, MACI

Terza generazione, AMIC

In campo ortopedico c'è la possibilità di trapiantare:

- condrociti umani autologhi → ricostruzione di cartilagine deteriorata a seguito di traumi o di patologie
- cellule mesenchimali staminali precursori degli osteoblasti



favorire la formazione di nuovo tessuto osseo nel trattamento di anomalie dello scheletro, traumi e tumori ossei.

### PROBLEMI CARTILAGINE:

- incidenza di patologie infiammatorie e degenerative
- limitata capacità di rigenerazione delle lesioni, in quanto il naturale processo di riparazione porta alla formazione di un tessuto fibrocartilagineo che non presenta le caratteristiche di resistenza e deformabilità al carico del tessuto originario.

### OBIETTIVO:

- creare un tessuto che abbia strutture e funzioni identiche al precedente in modo da risultare meccanicamente idoneo a supportare i carichi fisiologici e a ridurre o evitare l'evoluzione artrosica della lesione iniziale. Questo processo va sotto il nome di Neocondrogenesi.

La cartilagine ialina può essere sostituita con un tessuto strutturalmente complesso poiché il suo trofismo non è dipendente dal flusso ematico, essendo assicurato direttamente dal liquido sinoviale.

### ***TERAPIE PER LA RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE***

-debridment  
-perforazioni artroscopiche  
-microfratture



#### **VANTAGGI**

- riduzione del dolore
- incremento della mobilità

#### **SVANTAGGI**

- formazione di un tessuto fibro-cartilagineo costituito principalmente da collagene di tipo I, che presenta la caratteristica di minore resistenza meccanica rispetto alla cartilagine ialina in cui predomina il collagene di tipo II.



## ❖ TRAPIANTI DI CONTROCITI AUTOLOGHI (ACI)

L'utilizzo dei trapianti di condrociti autologhi è iniziato nei primi anni del '80. Nel 1987, in Svezia, Brittberg et al. hanno iniziato dei trials clinici sull'uomo per trattare le lesioni sintomatiche a tutto spessore della cartilagine articolare del ginocchio, con i condrociti autologhi.

Tecnica descritta per la prima volta nel 1994 come una tecnica innovativa per la ricostruzione di lesioni a tutto spessore

Nel 1998 sono stati presentati i risultati a 2-10 anni in 219 pazienti trattati con tecnica ACI

DANNO	MIGLIORAMENTO QUADRO CLINICO
Lesioni isolate dei condili femorali	89% dei casi
Lesione del condilo femorale associata alla lesione del legamento crociato anteriore	74% dei casi
Osteocondrite dissecante	84% dei casi
Condropatie rotulee	69% dei casi

Una valutazione artroscopica dell'area innestata, ha mostrato che nel 90% dei casi la cartilagine aveva una consistenza simile a quella sana e il 91% dei pazienti sono stati in grado di ritornare ad un livello normale di attività.

### + VANTAGGI:

- sicuro
- efficace
- riproducibile
- usato per lesioni della cartilagine con dimensioni maggiori di 2 cm<sup>2</sup> in pazienti giovani che vogliono riprendere un buon livello di attività.

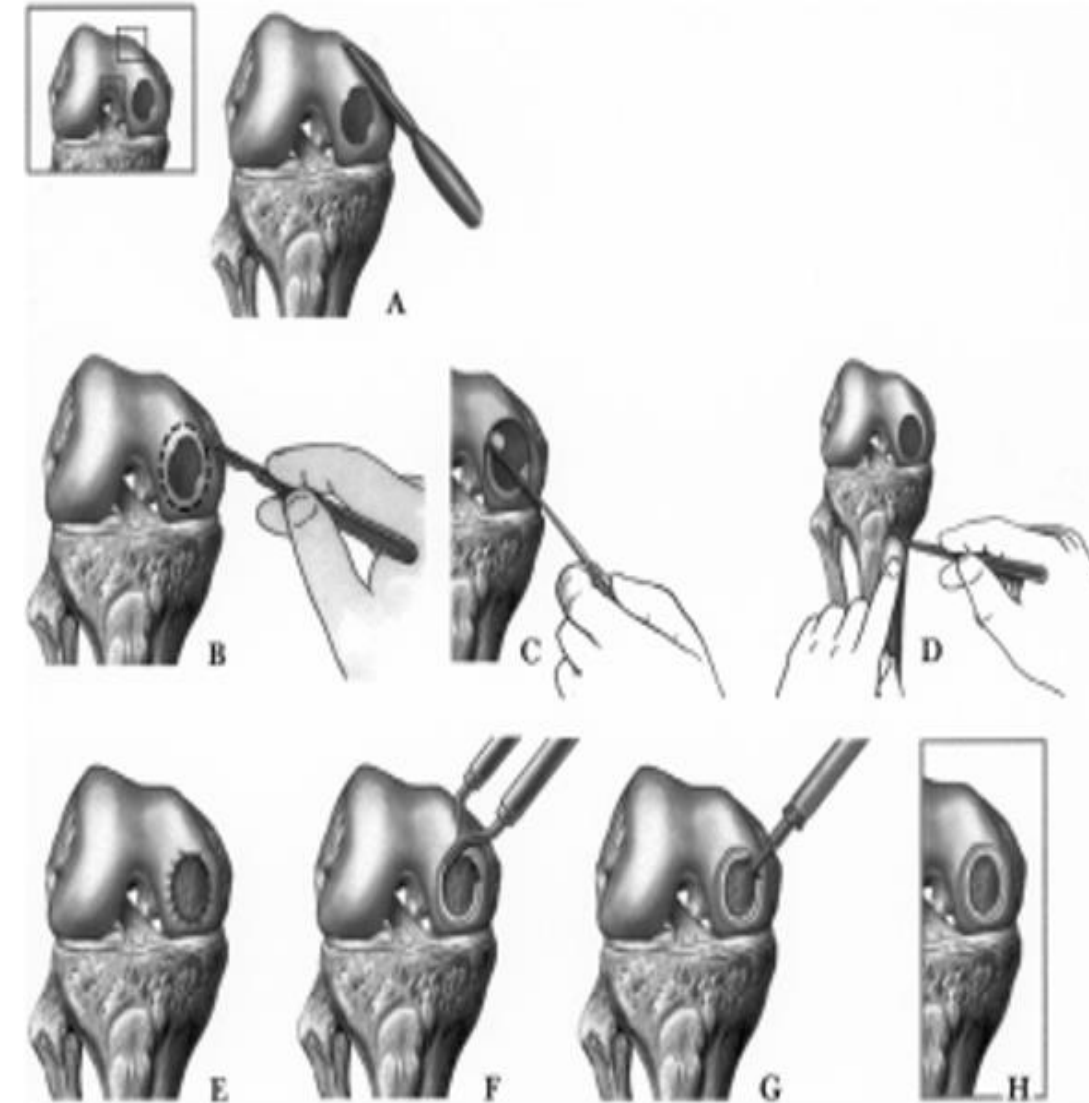
### - SVANTAGGI:

- la sospensione liquida di condrociti in coltura non è facile da maneggiare durante la procedura chirurgica
- la sutura del lembo periostale è una procedura chirurgica difficile e con un rischio maggiore di complicanze quali rigidità articolare o artrofibrosi ed infezioni.

## Trapianto di condrociti autologhi (ACI)

L'approccio clinico nell'uomo ha interessato soprattutto la riparazione di lesioni a livello del ginocchio ed il menisco. Il trapianto di condrociti si articola in varie fasi:

1. si esegue un prelievo di tessuto cartilagineo sano preferibilmente in una zona di non carico, tipicamente dalla gola intercondiloidea o dalla porzione superiore del condilo femorale mediale
2. Il frammento viene sottoposto a digestione enzimatica della matrice extracellulare, seguita da isolamento e coltura delle cellule
3. Periodo di espansione di circa un mese in coltura monostrato i condrociti possono essere trapiantati
4. ultimata la fase di crescita cellulare, vi è l'esposizione della lesione mediante artrotomia, regolarizzazione dei margini fino a tessuto sano (Fig. 1B, 1C)
5. prelievo dalla tibia prossimale di un'isola di periostio delle dimensioni della lesione condrale (Fig. 1D)
6. sutura del periostio ai margini cartilaginei con filo riassorbibile 6-0 (Dexon o Vicryl) (Fig. 1E)
7. rinforzo con colla di fibrina (Tissucol®) (Fig. 1F)
8. si ottiene una tasca in cui iniettare, tramite un foro lasciato libero superiormente, la soluzione con i condrociti autologhi in sospensione (Fig. 1G)
9. mediante un ultimo punto di sutura e colla di fibrina si sigilla quindi la tasca periostale (Fig. 1H).



## ✗ CRITICHE TRAPIANTO CONDROCITI

La ricostruzione cartilaginea può essere indotta da cellule mesenchimali periostee e non dai condrociti autologhi iniettati.

Perché i condrociti introdotti nella sede di lesione potrebbero non essere sempre in grado di indurre una rigenerazione tessutale



perché in numero esiguo e con modesta attività metabolica



per la mancanza di fattori locali in grado di influenzare il differenziamento e l'attività delle cellule staminali di origine vascolare che, si differenziano in senso condrocitario



potrebbero non moltiplicarsi a sufficienza o non essere vitali quando vengono reimpiantate.

Sono necessari due interventi chirurgici, uno per la biopsia e uno per l'impianto delle cellule da coltura. I risultati a lungo termine sono ottimi ma i tempi di riabilitazione sono molto lunghi: l'intervento prevede il non carico per 30-45 giorni post-intervento e la ripresa dell'attività sportiva ad alto impatto dai 10 mesi in poi.



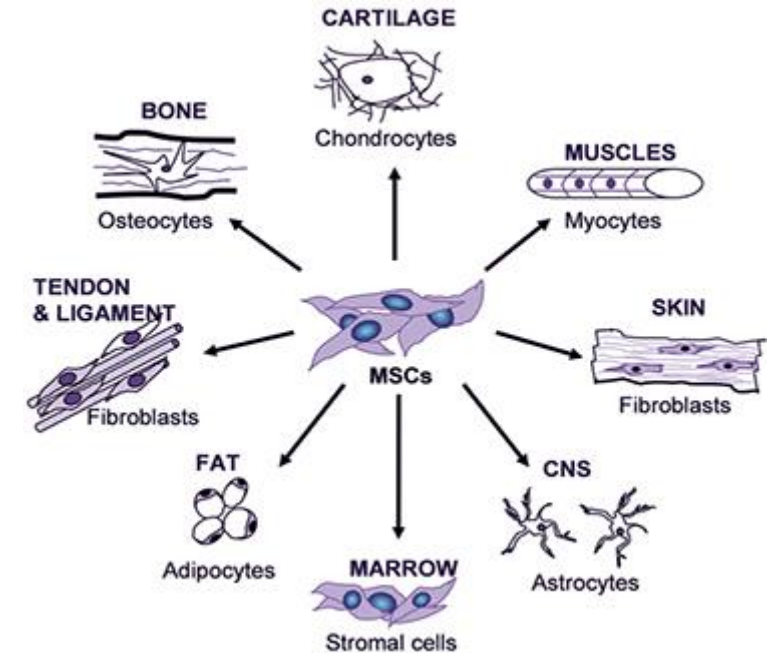
## ❖ TRAPIANTO DI CELLULE MESENCHIMALI AUTOLOGHE – UN’ALTERNATIVA ALL’ACI

Le cellule staminali mesenchimali sono cellule umane ottenute da tessuto umano, come il midollo osseo o il tessuto adiposo. Quando le cellule staminali sono poste in un ambiente specifico, possono dare origine a cellule che sono simili al tessuto di quell’ambiente, dunque si vuole che le cellule staminali poste nei pressi di una superficie articolare danneggiata stimolino la crescita di cartilagine ialina.

Il trapianto di cellule mesenchimali nell’artrosi di ginocchio, è una tecnica innovativa ma già praticata da alcuni anni con ottimi risultati.

Le cellule staminali mesenchimali vengono infiltrate nel ginocchio del paziente stesso, o in qualunque altra articolazione in cui sia presente artrosi.

Grazie alla loro azione fortemente antinfiammatoria, anti-degenerativa e di stimolazione della produzione di cartilagine, è possibile evitare che la malattia artrosica progredisca fino ad arrivare alla necessità di una protesi.



Il trattamento con le cellule staminali mesenchimali avviene in diverse fasi:

1. anestesia locale
2. prelievo di grasso dall'addome o dalle cosce. Il prelievo si effettua con un ago lungo e sottile tramite una microincisione
3. il grasso prelevato finisce in una speciale siringa al cui interno sono presenti microsfere di metallo che inducono la micro-frammentazione del grasso, separando le cellule mesenchimali intatte dal prodotto di scarto
4. infiltrazione nel ginocchio solo delle cellule staminali mesenchimali, estratte sotto forma di una specie di soluzione cellulare, e trasferite sterilmente in una speciale sonda aghi-forme. Iniettate nei punti desiderati dell'articolazione del ginocchio, iniziano a sviluppare il loro effetto antinfiammatorio, anti-degenerativo e di stimolazione della cartilagine.

L'innesto autologo di ASC (cellule mesenchimali del tessuto adiposo) prevede il prelievo e l'innesto di cellule mesenchimali adipose dal paziente che è contemporaneamente donatore e ricevente.

#### VANTAGGI:

- + • scarso rigetto
- impossibilità di contrarre malattie infettive da altro donatore
- facilità di riassorbimento da parte dell'organismo
- tempi di recupero veloci con benefici a medio lungo termine





## ❖ BIBLIOGRAFIA

- Schulz R.M., Bader A., “ Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes”, Eur Biophys J (2007)
- Zhang L., Hu J., Athanasiou K.A., “The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration”, Crit Rev Biomed Eng. (2009)
- Bhosale A.M., Richardson J.B., “Articular cartilage: structure, injuries and review of management”, British Medical Bulletin (2008)
- Iwasa J., Engebretsen L., Shima Y., Ochi M., “ Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering” , Knee Surg. Sports Traumatol. Arthroscop. (2009)
- Madry H., Grun U.W., Knutsen G., “Cartilage repair and joint preservation
- Jiang Y.Z., Zhang S.F., Qi Y.Y., Wang L.L., Ouyang H.W., “Cell transplantation for articular cartilage Defects: principles of past, present and future practice”, “Cell Transplantation”, Deutsche Arzteblatt International (2011)
- Bagna G.P., Bonsi L., Alviano F., “Cellule staminali”
- G. Gualtieri, A. Ferruzzi, P. Calderoni, I. Andreoli, B. Grigolo, A. Facchini, “Autologous Chondrocyte Transplantation in the treatment of articular cartilage lesions of the knee”
- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindhal A, “Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability”. Am J Sports Med. 2002

# CELLULE IN SCAFFOLD

## Problema della perdita del fenotipo

E' stato dimostrato che i condrociti coltivati in monostrato, in sistemi bidimensionali (capsule di Petri), tendono a de-differenziarsi, fenotipicamente e funzionalmente, assumendo un aspetto fibroblastoide, poiché vengono alterate le normali interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. Producono collagene di tipo I piuttosto che di tipo II e perdono la capacità di produrre proteoglicani.

→ Invece se coltivati in 3D mantengono il loro fenotipo differenziato e le loro funzioni, ripristinando la loro forma sferica.

Cellule differenziate possono essere trattenute in una data area utilizzando scaffold altamente porosi.



Con le cellule usate per la rigenerazione della cartilagine (condrociti e cellule staminali mesenchimali) è molto importante la densità cellulare: se si seminano poche cellule lo scaffold non viene adeguatamente colonizzato e si ha la penetrazione di tessuto fibroso che altera le caratteristiche della cartilagine che si forma.

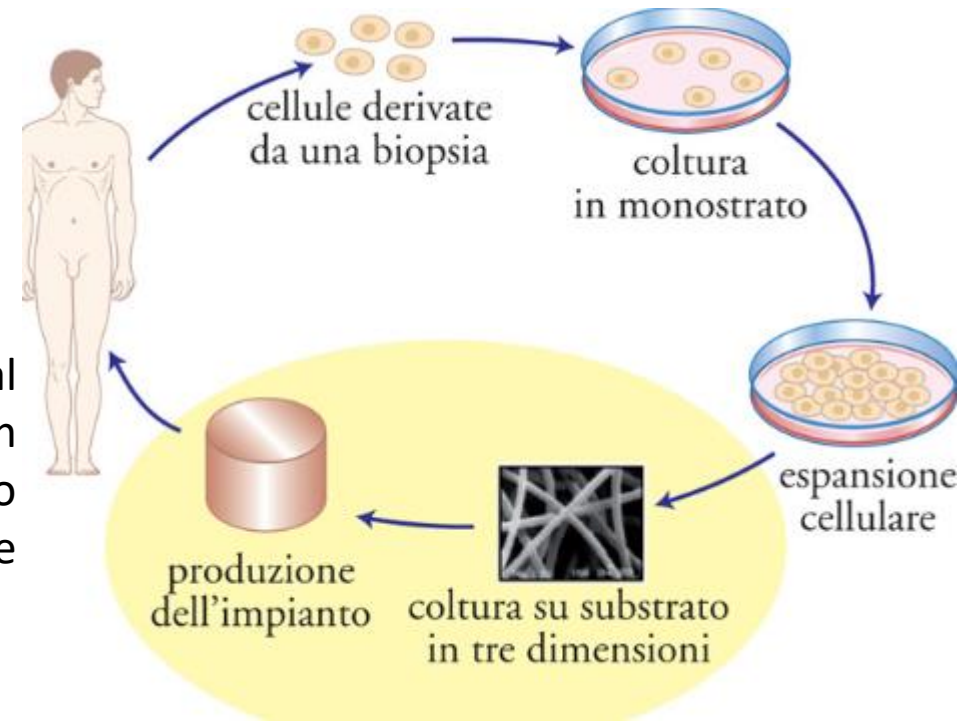
L'evoluzione della tecnica di trapianto delle cellule in sospensione secondo la metodica di Peterson è rappresentata dalla possibilità di usare scaffold, che permettono di trasferire e fissare meglio le cellule nel sito di impianto e nello stesso tempo di far loro contrastare meglio le sollecitazioni all'interno dell'articolazione anche durante la riabilitazione: **Tecnica di seconda generazione**



## MACI

**Impianto di condrociti  
autologhi su membrana**

Metodica che prevede due tempi chirurgici. Dal momento che i condrociti vengono applicati in forma solida, non si richiede l'utilizzo del periostio per mantenere le cellule nella sede della lesione e quindi l'intervento chirurgico è più semplice.



## **Applicazioni dell'ingegneria tissutale: riparazione di lesioni cartilaginee con condrociti autologhi**

*Tissue engineering applications:  
cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes*

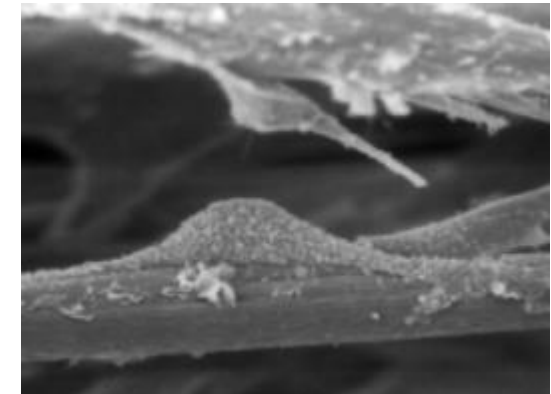
**B. Grigolo<sup>1</sup>, L. Roseti<sup>1</sup>, M. Fiorini<sup>1</sup>, L. De Franceschi<sup>1</sup>, A. Facchini<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio di Immunologia e Genetica, Istituto di Ricerca Codivilla Putti, Istituti Ortopedici Rizzoli;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Interna e Gastroenterologia, Università degli Studi di Bologna

Tra i biomateriali che hanno già trovato un'applicazione nel trapianto di condrociti per la riparazione di lesioni cartilaginee nell'animale e nell'uomo, troviamo un derivato esterificato dell'acido ialuronico denominato **Hyaff®-11**. In particolare, nel caso di trapianto di condrociti, lo Hyaff®-11 si è rivelato essere un carrier idoneo alla proliferazione ed al mantenimento del fenotipo condrocitario delle cellule da esso controllate.

Si è visto infatti come condrociti umani isolati da cartilagine sana di pazienti seminati sulla matrice tridimensionale Hyaff®-11 e processati a diversi tempi sperimentali ri-esprimano i messaggeri per il collagene di tipo II e per i proteoglicani.



**Immagine di un condrocita a 24 ore dalla semina sul biomateriale Hyaff®-11**

## Confronto tra ACI E MACI (utilizzo di HYAFF-11)

L'uso del biomateriale Hyaff®-11 è stato validato nella riparazione di lesioni condrali previamente allestite in un modello sperimentale animale quale il coniglio.

### Sperimentazione nell'uomo

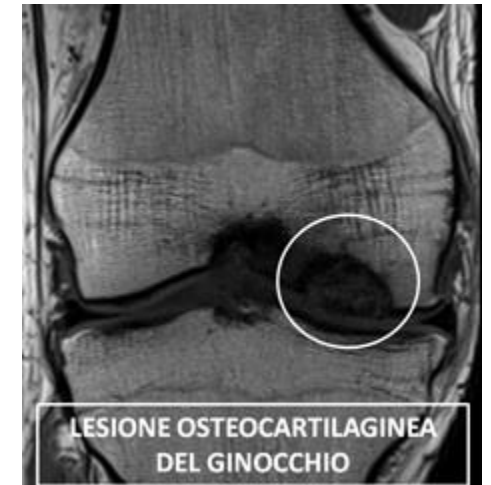
Per la sperimentazione nell'uomo sono stati ammessi allo studio 30 pazienti, affetti da lesioni osteocondrali traumatiche del ginocchio. Tali pazienti sono stati suddivisi in due gruppi:

1. il primo gruppo è stato trattato mediante trapianto di condrociti eseguito con il *metodo di Brittberg-Peterson* (flap periostale);
2. il secondo gruppo mediante trapianto di condrociti controllati sul biomateriale Hyaff®-11.

La prima fase del trattamento è stata analoga per entrambe le procedure operatorie.

Dal punto di vista clinico i risultati funzionali valutati hanno mostrato un progressivo ripristino dell'articolartà con scomparsa del dolore in entrambe le casistiche analizzate. L'analisi istologica effettuata a 12 mesi ha evidenziato la formazione di tessuto cartilagineo simil-ialino con presenza variabile di collagene di tipo II e la scomparsa del biomateriale che presenta in vivo un tempo di degradazione di circa 5 mesi.

Da un punto di vista chirurgico, l'utilizzo del biomateriale semplifica la tecnica di impianto riducendo il tempo ed i costi operatori.



## Condrociti nasali per lesioni cartilaginee:



I condrociti nasali sono in grado di duplicarsi in vitro in maniera ottimale e possono adattarsi all'ambiente articolare del ginocchio, assumendo caratteristiche simili a quelle dei condrociti normalmente presenti in questa articolazione. Inoltre, le cellule del naso, a differenza di quelle articolari, non perdono questo loro potenziale con l'invecchiamento e possono quindi essere utilizzati anche in soggetti meno giovani.

I condrociti nasali, prelevati tramite una biopsia, vengono sottoposti a coltura in laboratorio per due settimane, e durante il periodo di coltura iniziale, hanno mostrato una dimensione e una morfologia cellulare equivalente al fenotipo di condrocita ialino, venendo poi applicati a una speciale membrana di collagene che viene tagliata a misura della lesione, posizionata sulla cartilagine all'interno del ginocchio e fissata con piccoli punti di sutura. L'utilizzo di cellule autologhe ha il grande vantaggio di scongiurare il rigetto dell'impianto.

Da diversi anni si studiano sorgenti cellulari alternative per la rigenerazione della cartilagine articolare. Interessanti risultati si sono ottenuti anche con i condrociti prelevati dal padiglione auricolare o dalle coste, ma quelli nasali si sono dimostrati particolarmente promettenti anche per le limitate alterazioni estetiche derivanti dal loro prelievo.

Articles

### **Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial**



Marcus Mumme\*, Andrea Barbero\*, Sylvie Miot, Anke Wixmerten, Sandra Feliciano, Francine Wolf, Adelaide M Asnaghi, Daniel Baumhoer, Oliver Bieri, Martin Kretschmar, Geert Pagenstert, Martin Haug, Dirk J Schaefer, Ivan Martin, Marcel Jakob

L'intervento è mininvasivo, consiste in una piccola incisione a livello del ginocchio, sufficiente ad esporre la lesione e a posizionare la membrana con le cellule autologhe. Le lesioni del ginocchio trattabili con questa nuova metodica, ad esclusione di quelle della rotula, sono conseguenza di traumi di varia natura o di sovraccarico funzionale, e hanno un'estensione tra i 2 e gli 8 cm quadrati. A seguito di alcuni trattamenti e operazioni effettuate si è dimostrato che il nuovo tessuto ha mantenuto una composizione simile alla cartilagine naturale ed era cresciuto in modo appropriato presso i siti interessati senza alcuna influenza legata all'età dei pazienti.



→ Ulteriore sviluppo per la rigenerazione della cartilagine:

## AMIC

Consente alle cellule staminali mesenchimali (MSC) di svilupparsi in condrociti con l'aiuto di uno scaffold di collagene. La fissazione avviene con l'inserimento di colla di fibrina, per risolvere il problema della sutura, in cui la trombina viene prodotta dal sangue del paziente.

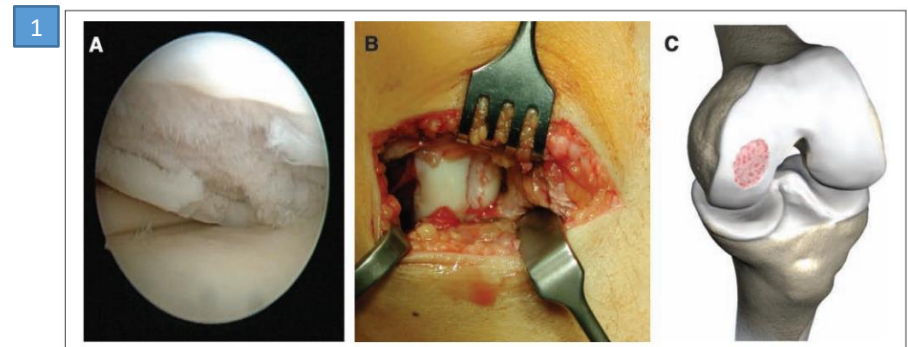
- ✓ È una metodica che sfrutta il potenziale di guarigione dell'organismo stesso, ma può essere applicata su lesioni limitate, non superiori agli otto centimetri quadrati.

### Vantaggi

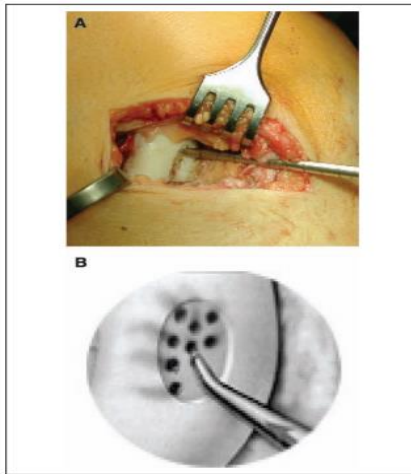
La tecnica AMIC evita i processi di prelievo e coltivazione, avvalendosi della microfratturazione dell'osso subcondrale. Applicare questa nuova tecnica significa dunque **risparmiare tempo**, poiché si tratta di eseguire più operazioni durante lo stesso intervento. Inoltre si tratta di un **metodo semplice e poco invasivo**.

### Tecnica chirurgica

La procedura può essere eseguita in anestesia spinale o generale. La procedura inizia con un'artroscopia dell'articolazione interessata per verificare la dimensione e la posizione del difetto. Se la dimensione è localizzata, viene eseguita un'artrotomia minimamente invasiva.



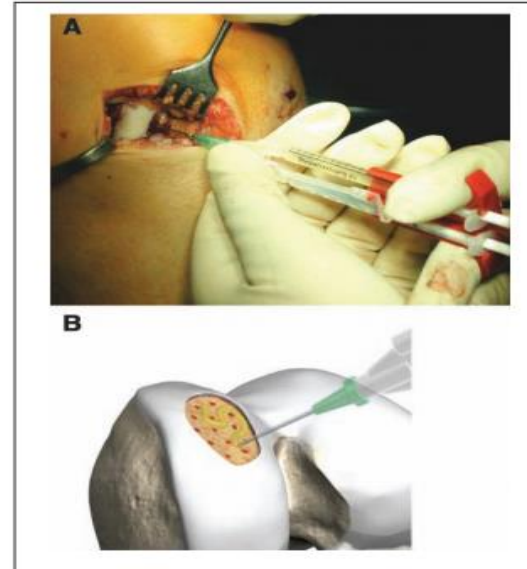
2



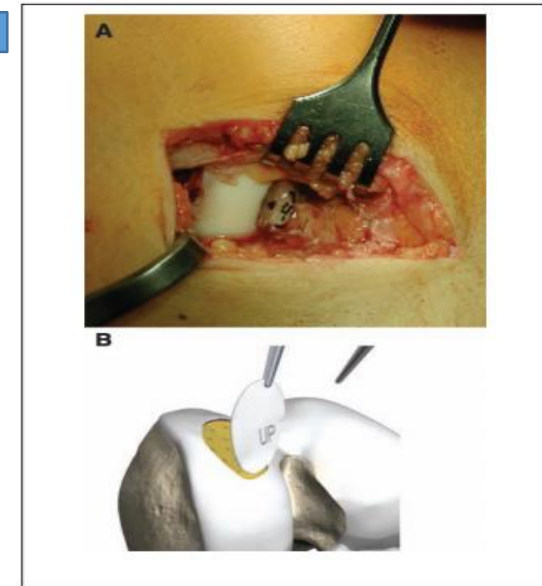
Il tessuto cartilagineo difettoso viene rimosso con una curette. Si procede con la microfratturazione dell'osso subcondrale.

La dimensione del difetto viene valutata e viene misurata una membrana di collagene per coprire il difetto. Quest'ultima deve essere posizionata leggermente al di sotto del livello della cartilagine per evitare spostamenti.

3



4



Knecht et al. hanno confermato che l'incollaggio con colla di fibrina porta ad una sufficiente stabilità.

Per la preparazione della colla di fibrina esistono diverse opzioni:

- colla di fibrina parzialmente autologa prodotta centrifugando un campione di sangue dal paziente ottenendo trombina e mescolando quest'ultima con fibrinogeno allogenico;
- colla di fibrina completamente allogenica come disponibile in commercio.


# AMIC – Animazione ginocchio



Fonte: <https://www.geistilich.it/it/paziente/rigenerazione-delle-ossa-e-della-cartilagine/rigenerazione-della-cartilagine/metodo-trattamento-amic/>

*Research Article*

**Cartilage Surgery in Overweight Patients:  
Clinical and MRI Results after the Autologous Matrix-Induced  
Chondrogenesis Procedure**

Matthias Lahner <sup>1,2</sup>, Christopher Ull,<sup>3</sup>  
Marco Hagen,<sup>4</sup> Christoph von Schulze Pellengahr,<sup>2,5</sup> Kiriakos Daniilidis,<sup>6</sup>  
Lars Victor von Engelhardt,<sup>7</sup> Nina Lahner,<sup>8</sup> and Wolfram Teske<sup>2,9</sup>

Scopo dello studio:

analizzare l'esito della procedura AMIC nei pazienti in sovrappeso con difetti della cartilagine del ginocchio. 9 pazienti con un difetto della cartilagine del ginocchio con una dimensione media della lesione di  $2,1 \pm 1,2 \text{ cm}^2$  e un indice di massa corporea medio (BMI) di 29,3 disponibili per il follow-up.

Risultati ottenuti:

si è osservato che lo scaffold aveva raggiunto una copertura del difetto dell'80%.



La procedura AMIC migliora la riduzione del dolore e l'aumento della funzionalità del ginocchio per i difetti della cartilagine nei pazienti in sovrappeso.

## Caso dell'anca



Condropatia dell'acetabolo: causa frequente di dolore e limitazione funzionale. Sono disponibili numerose opzioni terapeutiche per la riparazione delle lesioni condrali all'anca, fra cui l'impianto di condrociti autologhi (ACI) e l'artroscopia dell'anca AMIC.

**Chondro-Gide®** è un prodotto registrato CE, sviluppato da Geistlich Pharma AG, appositamente costruito per il trattamento dei difetti della cartilagine articolare.

È una matrice di collagene suino, naturalmente riassorbibile a doppio strato, ossia uno strato compatto e uno poroso.

- Lo strato compatto presenta una superficie densa e occlusiva a livello cellulare; impedisce alle cellule staminali di diffondersi nello spazio articolare e protegge il sito da sollecitazioni meccaniche.
- Lo strato poroso è costituito da fibre di collagene libere che favoriscono l'invasione e l'attecchimento delle cellule. La disposizione delle fibre assicura un'elevata resistenza alla trazione e alla lacerazione.

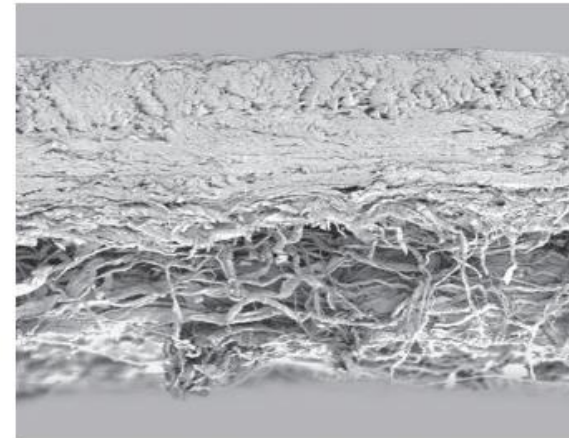


Fig. 1: Straordinaria struttura a doppio strato di Chondro-Gide® (100x)



Fig. 2: Superficie compatta, occlusiva a livello cellulare (SEM 1500x)

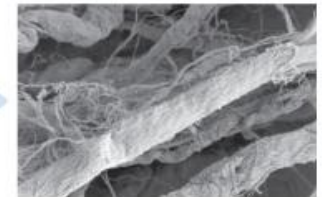


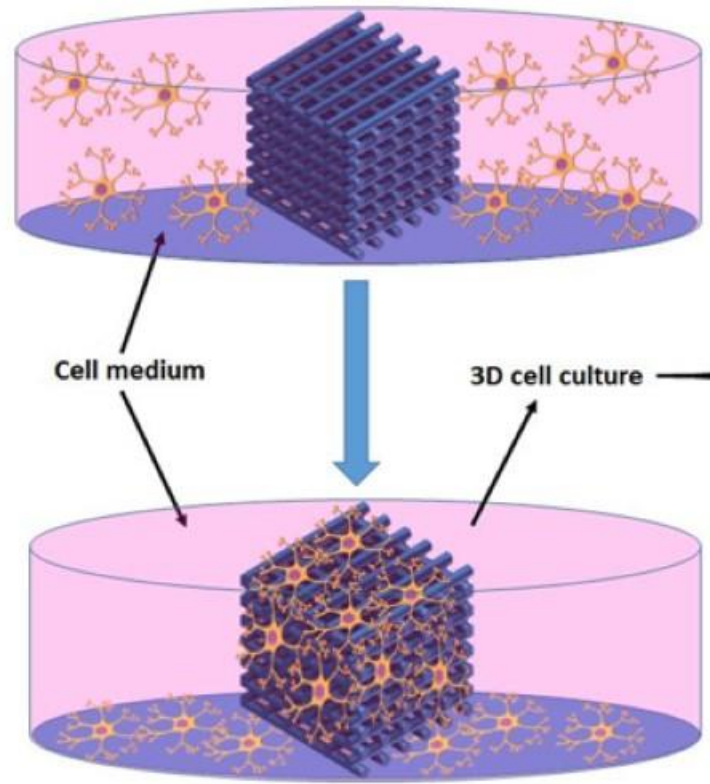
Fig. 3: Superficie porosa, adesiva a livello cellulare (SEM 1500x)

## **Bibliografia**

1. M. Lahner et al., *Cartilage Surgery in Overweight Patients: Clinical and MRI Results after the Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis Procedure*. BioMed Research International (2018).
2. J. P. Benthien and P. Behrens, *Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC): Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing*. Cartilage. 2010;1(1):65-8.
3. B. Grigolo et al., *Tissue engineering applications: cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes*. Reumatismo, 2002; 54(4):364-371
4. M. Mumme et al., *Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial*. (2016), Pages 1985-1994.
5. [http://amsdottorato.unibo.it/4720/1/patella\\_silvio\\_tesi.pdf](http://amsdottorato.unibo.it/4720/1/patella_silvio_tesi.pdf)
6. <https://www.geistlich.it/it/orthopaedic/aree-terapeutiche/rigenerazione-della-cartilagine/amic/amic-anca/>
7. <https://www.geistlich.it/it/paziente/rigenerazione-delle-ossa-e-della-cartilagine/rigenerazione-della-cartilagine/metodo-trattamento-amic/>



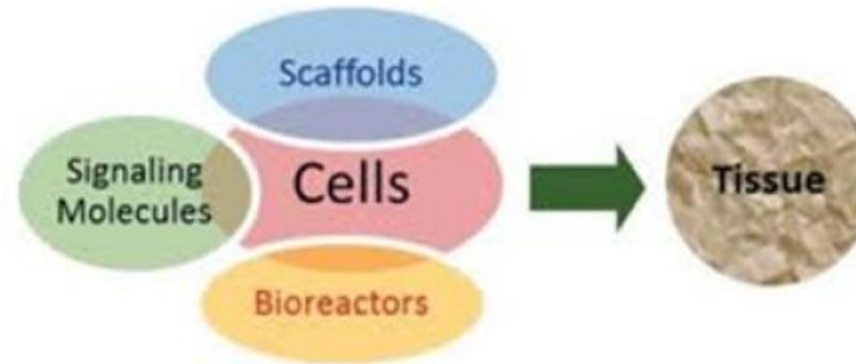
# SCAFFOLD



# SCAFFOLDS

Uno scaffold ideale deve possedere le caratteristiche seguenti:

- essere biocompatibile
- essere biodegradabile ma in modo controllato senza rilasciare prodotti tossici all'interno dell'organismo
- possedere una porosità adeguata che permetta la diffusione dei nutrienti e dei prodotti di scarico
- avere la funzione di supporto per la proliferazione e la differenziazione delle cellule e permettere la formazione della matrice extracellulare
- deve fissarsi e integrarsi con il tessuto circostante
- deve possedere le adeguate proprietà meccaniche per sopportare la crescita di nuovo tessuto sotto il carico a cui è naturalmente sottoposto



# SCAFFOLDS NATURALI

I biomateriali possono essere suddivisi in due categorie: polimeri naturali e i polimeri sintetici.

I biomateriali naturali sono quelli più usati per la costruzione di scaffold.

Fra i biomateriali naturali vi sono il collagene, l'acido ialuronico, l'agarosio, l'alginato, il chitosano e la fibrina.

Il polimero naturale che ha ricevuto la maggiore attenzione è il collagene:

- collagene: presente nelle proteine che formano la matrice extracellulare dei tessuti connettivi e conferisce a essa la speciale forza e flessibilità che la caratterizza.

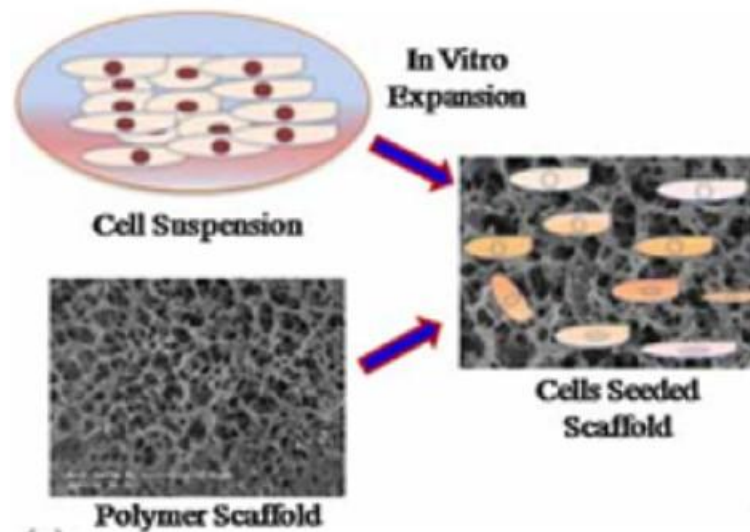
E' stato notato che i condrociti coltivati all'interno di gel di collagene mantengono il loro fenotipo e la produzione di glicosaminoglicani almeno per 6 settimane. Le proprietà chimiche, meccaniche e biologiche rendono possibile il controllo della degradazione degli scaffold.



A e B) Matrice di collagene con condrociti C) applicazione colla di fibrina D) applicazione del trapianto cartilagineo



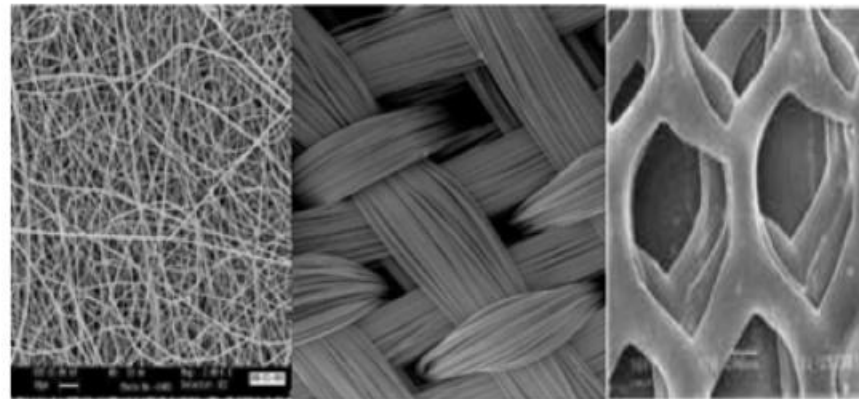
- [L'acido ialuronico](#), un glicosaminoglicano non solfatato presente nella matrice extracellulare della cartilagine articolare, è stato utilizzato come supporto per la crescita di condrociti o per stimolare la rigenerazione della condrogenesi delle cellule staminali del mesenchima.
- [L'agarosio](#) e [l'alginato](#) sono invece polisaccaridi che derivano dalle alghe e vengono usati come scaffold tridimensionali per incapsulare le cellule. Entrambi questi scaffold hanno mostrato un'eccellente citocompatibilità per la crescita delle cellule ma hanno una lenta degradazione
- [La fibrina](#) è una proteina coinvolta nella coagulazione del sangue e si forma per polimerizzazione del fibrinogeno in presenza della trombina attorno alla ferita . La sua biocompatibilità e la sua biodegradabilità la rendono un biopolimero molto interessante ed un ulteriore vantaggio è costituito dalla possibilità di essere iniettata insieme ai fattori di crescita



# SCAFFOLDS SINTETICI

➤ I polimeri sintetici sono:

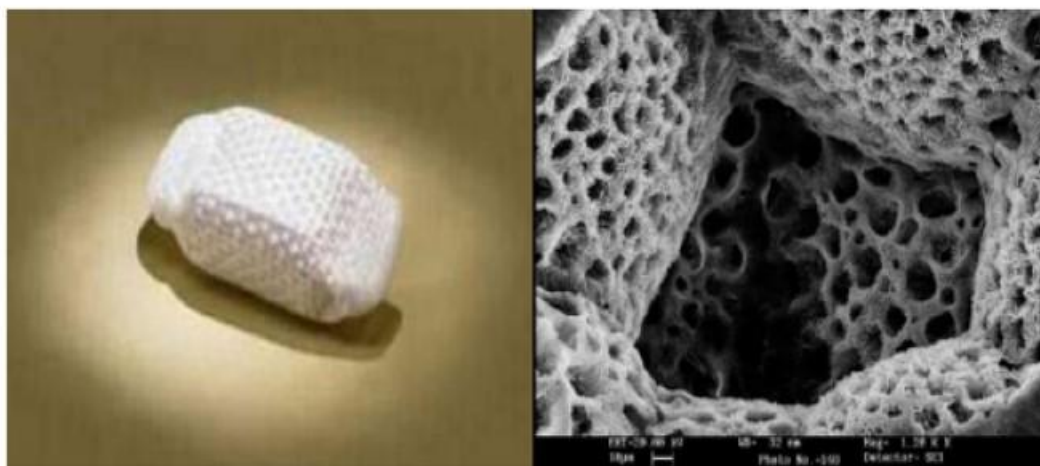
- **L'acido poliglicolico (PGA)** è un polimero termoplastico biodegradabile. Viene preparato partendo dall'acido glicolico per mezzo di una policondensazione ed è stato largamente utilizzato per la fabbricazione di scaffold per la riparazione della cartilagine perché possiede un alto grado di degradazione, un'alta porosità, un'elevata crescita cellulare e mantiene le funzioni dei condrociti molto simili a quelle presenti nella cartilagine ialina.
- **L'acido polilattico (PLA)** è un polimero biodegradabile che può essere formato a partire dall'acido lattico. Il PLA è stato studiato per le applicazioni nell'ingegneria tissutale della cartilagine grazie alla grande proliferazione di condrociti.
- **IL PGLA** possiede un'elevata biocompatibilità, abilità di degradarsi in unità di monomeri, elevate proprietà meccaniche e una degradazione controllabile in base alle proporzioni dei due polimeri. Grazie a studi approfonditi si è potuto constatare che il PGLA è particolarmente adatto per la condrogenesi delle cellule staminali provenienti dal tessuto adiposo. Gli scaffold di PGLA sono stati trattati con numerosi fattori di crescita per migliorare la differenziazione condrogenica delle cellule staminali del midollo osseo.



: polimeri sintetici, PLA, PGA, PLGA

## CONFIGURAZIONE DEGLI SCAFFOLDS

- Per fare in modo che il tessuto prenda esattamente la forma che vogliamo, diamo agli scaffold la forma desiderata così che le cellule possano formarsi attorno al tessuto.
- L'obiettivo che si cerca di conseguire è l'ottenere una struttura il più simile possibile al tessuto originario che ne imiti le funzioni e che abbia proprietà simili. Per raggiungere questo scopo sono state proposte diverse configurazioni per gli scaffold

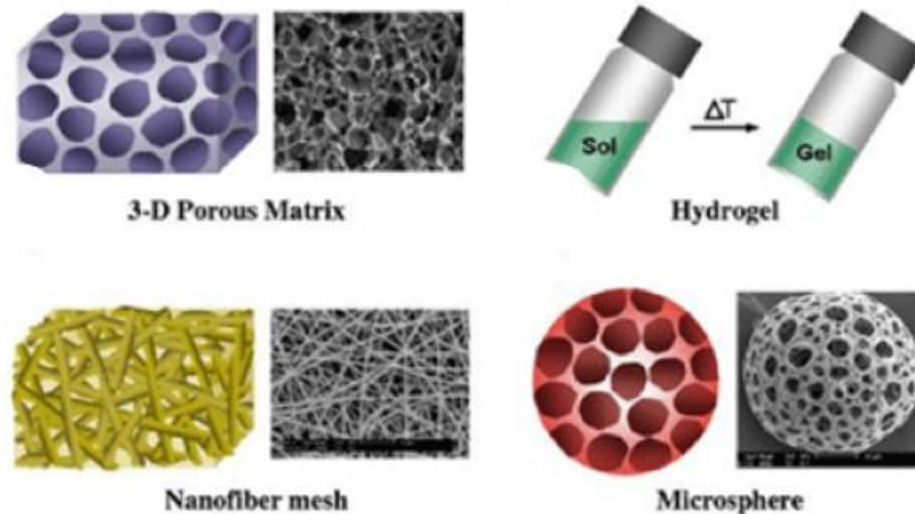


scaffold tridimensionale (a sinistra)

articolare di microporosità (a destra)



- **SCAFFOLD TRIDIMENSIONALI** :Nel caso specifico della cartilagine, una struttura 3D serve per prevenire la de-differenziazione dei condrociti che spesso succede nel caso di colture in sistemi bidimensionali. Caratteristiche importanti per questo genere di costrutti è la porosità .Infatti la porosità e la permeabilità hanno un grande effetto sulla proliferazione dei condrociti e si stima che la grandezza dei pori sia tra i 100 e i 500 micron.
- **IDROGEL**: i condrociti vengono incapsulati dentro lo scaffold invece che attaccati sulla superficie. Anche se gli idrogel sono largamente utilizzati, il fatto che i fattori di crescita si diffondano molto rapidamente può risultare essere un problema.
- **SCAFFOLD NANOISTRUTTURATI**: Le nanofibre sintetiche mostrano maggiore stabilità meccanica rispetto a quelle naturali, ma l'idrofobicità di cui sono caratterizzate risulta essere un problema



# SCAFFOLD NANOSTRUTTURATO PER IL TRATTAMENTO DI DIFETTI OSTEOCONDRAI

Studio di E. Kon et al.

## ➤ LESIONI OSTEOCONDRAI

- Il trattamento delle lesioni osteocondrali è problematico poiché coinvolge 2 tessuti con diverse caratteristiche biochimiche e biomeccaniche.
- I progressi nelle nano-tecnologie hanno permesso lo sviluppo di diversi metodi di assemblaggio di innesti osteocondrali compositi bioingegnerizzati.

## ➤ OBIETTIVO

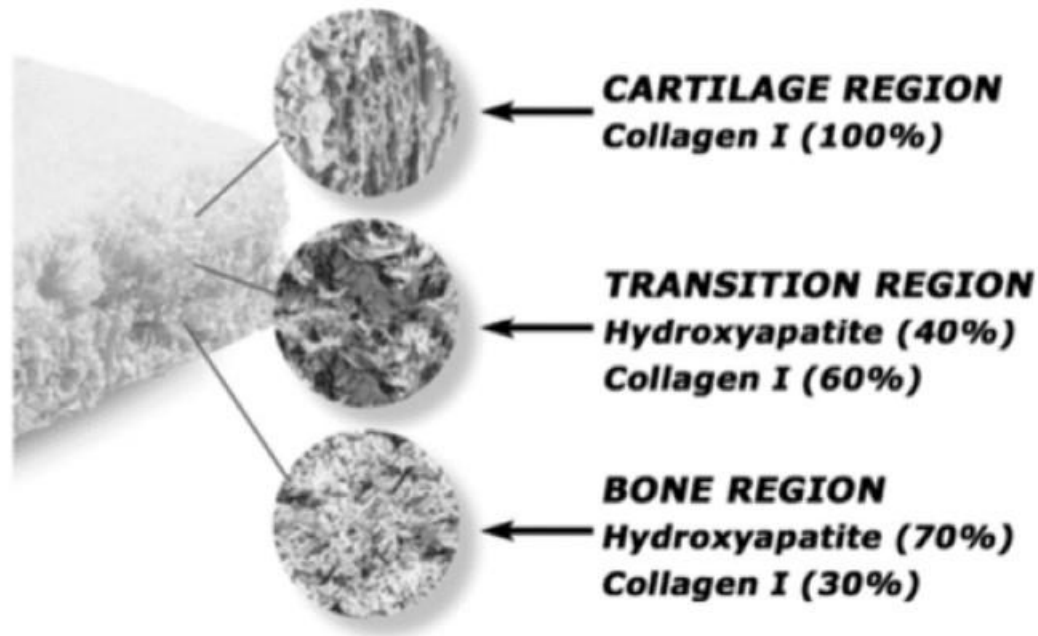
- L'obiettivo è quello di fare in modo che la struttura delle matrici promuova la neoformazione ossea nella porzione più profonda del costrutto e non interessi lo strato superficiale all'interno del quale invece dovrebbe attivarsi un processo di formazione connettivale simil-cartilaginea.

## ➤ MATERIALI SCAFFOLD

- Idrossiapatite: materiale ampiamente utilizzato in neurochirurgia, odontoiatria ed ortopedia come sostituto osseo sintetico di comprovata efficacia
- Collagene: è noto avere un ruolo strutturale importante nella rigenerazione dei connettivi complessi come l'osso e la cartilagine. Il collagene utilizzato per la realizzazione dello scaffold oggetto dello studio è di tipo I di derivazione equina, opportunamente modificato chimicamente al fine di escludere ogni reazione immunologica e prolungare il tempo di permanenza sul distretto anatomico



- Lo scaffold oggetto dello studio o dispositivo sostituto osteocondrale è costituito da un gradiente multistrato la cui percentuale di idrossiapatite risulta prevalente (70%) in direzione dello strato più profondo (sito subcondrale) della matrice, diminuisce nello strato intermedio (40%) fino a scomparire nello strato superficiale costituito di solo collagene di tipo I in modo da “mimare” il comparto cartilagineo.
- La conformazione dello scaffold è in grado di promuovere la neo-formazione di tessuto cartilagineo e di tessuto osseo subcondrale in maniera guidata nel rispetto della struttura biochimica, morfologica e geometrica del comparto anatomico osteocartilagineo, pertanto può essere definito come scaffold con *proprietà biomimetiche*.



Gradiente 1: strato superficiale di collagene di tipo I

Gradiente 2: strato intermedio di collagene di tipo I/idrossiapatite in rapporto 60%-40%

Gradiente 3: strato profondo di collagene di tipo I/idrossiapatite in rapporto 30%-70%

- Gli elementi che conferiscono tali caratteristiche di biomimetismo al dispositivo possono essere così sintetizzate:
  - elevata porosità (oltre 80%);
  - dimensione dei pori e architettura interna adeguate all'alloggiamento delle cellule progenitrici per il successivo differenziamento in cellule competenti alla sintesi di matrice minerale o cartilaginea (osteoblasti e condrociti);
  - permeabilità ai fluidi biologici;
  - adeguate proprietà idrofiliche;
  - biocompatibilità;
  - biodegradazione.
- Il dispositivo si presenta come una struttura che presenta la possibilità di adattamento in funzione delle dimensioni della lesione e facile applicazione chirurgica.
- Lo scaffold che presenta queste caratteristiche è il MaioRegen.



**Scaffold MaioRegen prima dell'utilizzo in sala operatoria: si noti lo strato superficiale "liscio" costituito di solo Collagene e lo strato profondo "ruvido" composto in prevalenza di Idrossiapatite**



## STUDIO:

- È stato utilizzato lo scaffolds osteocondrale costituito da fibre collagene di tipo I nucleate con nanoparticelle di idrossiapatite in tre diversi gradienti per il trattamento di lesioni osteocondrali del condilo femorale della pecora.
- E' stata eseguita una lesione osteocondrale sul condilo femorale mediale ed una su quello laterale della zampa posteriore destra in sedici pecore, per un totale di trentadue lesioni.
- Le lesioni avevano un diametro di sette millimetri ed una profondità di nove millimetri.
- Gli animali sono stati assegnati a quattro diversi gruppi di trattamento:
  1. il primo gruppo è stato trattato con l'impianto dello scaffold osteocondrale cell-free (Fig. 11)
  2. il secondo con lo scaffold coltivato in vitro con condrociti autologhi
  3. il terzo gruppo con lo scaffold arricchito di PRP/(plasma ricco di piastrine, rilascia fattori di crescita) autologo
  4. gli animali in cui i difetti osteocondrali non sono stati trattati sono stati utilizzati come gruppo controllo.



Fig. 11: Impianto di MaioRegen su condilo femorale di pecora

## RISULTATI:

- In tutti i gruppi trattati si è constatato una buona integrazione dello scaffold osteocondrale con una buona continuità della superficie articolare. Si sono osservati risultati significativamente migliori nella rigenerazione ossea e cartilaginea nei gruppi in cui è stato utilizzato lo scaffold cell-free e lo scaffold con condrociti autologhi, senza differenze significative tra i due gruppi. Quando invece è stato utilizzato lo scaffold arricchito di PRP si è evidenziata una rigenerazione ossea incompleta ed una superficie cartilaginea irregolare.
- ➔ Si può quindi affermare che lo studio conferma le potenzialità di questo biomateriale nel trattamento delle lesioni focali del tessuto osteocondrale anche senza utilizzo di cellule coltivate.

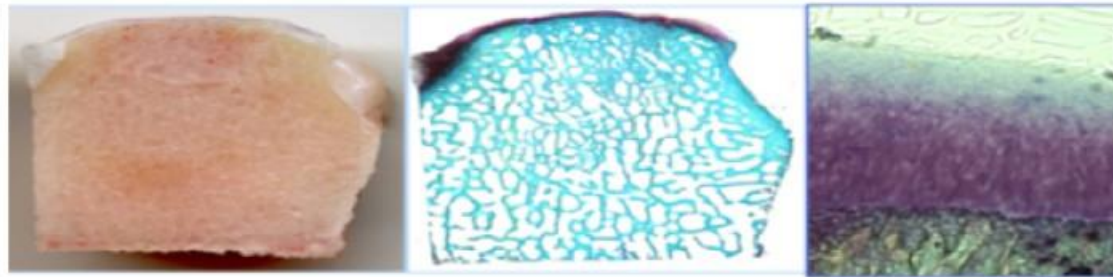


Fig. 12: Valutazione macroscopica ed istologica del MaioRegen impiantato cell-free su condilo femorale di pecora. Particolare istologico su tessuto cartilagineo neoformato



## BIBLIOGRAFIA

- Fergal J. *"Biomaterials & scaffolds for tissue engineering"* Materialstoday
- G.Dietmar, W.Hutmacher *" Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage"* Biomaterials
- E. Kon, M. Delcogliano, G. Filardo, D. Pressato, M. Busacca, B. Grigolo, G. Desando, M. Marcacci a *"Orderly Osteochondral Regeneration In A Sheep Model Using A Novel Nano Composite Multi-Layered Biomaterial "*, Injury
- Jean L.Drury David J.Mooney *" Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications"* Biomaterials

# Bioreattori

# Cosa è un bioreattore?

E' un dispositivo in grado di offrire un ambiente adeguato per la crescita di organismi biologici trasmettendo precisi stimoli alle cellule, sia di tipo chimico che meccanico.

# Funzione dei bioreattori

- Imitare le condizioni presenti nell'organismo così che sia favorita il più possibile la crescita cellulare.
- Stimolazione meccanica utilizzata per incrementare la differenziazione delle cellule staminali in uno specifico tipo di cellule.
- Migliorare la distribuzione spaziale delle cellule.

# Bioreattori per la cartilagine

Nel caso particolare della cartilagine i bioreattori cercano di riprodurre i carichi meccanici e pressori a cui solitamente questo tessuto è soggetto all'interno dell'organismo.

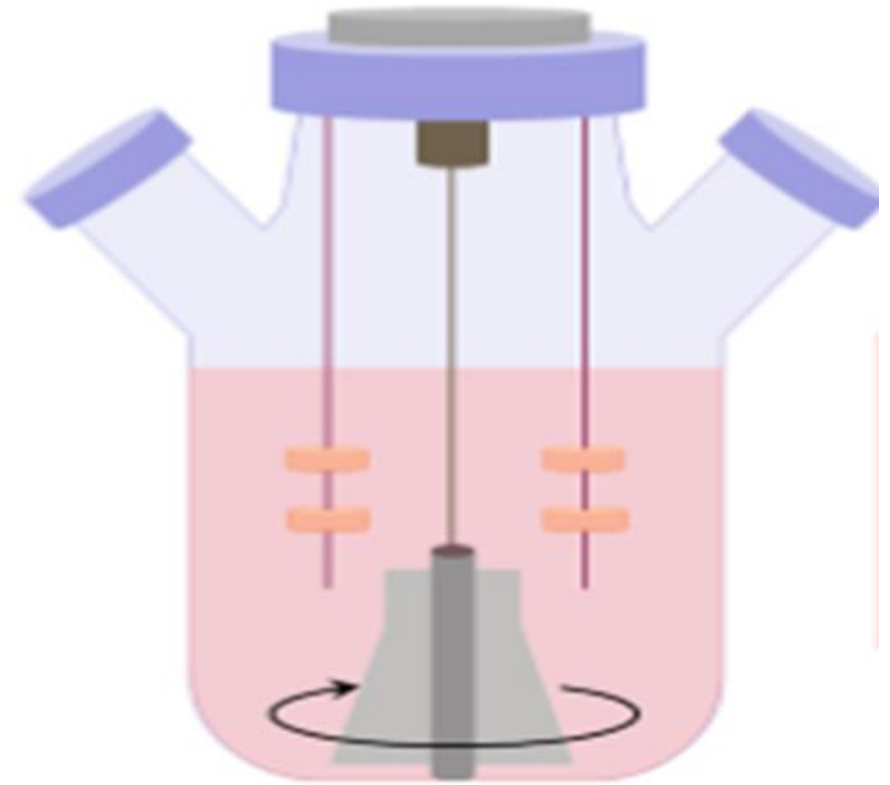
I vari bioreattori possono essere classificati in base al tipo di stress che applicano alle colture:

- Sistemi che applicano la forza di taglio
- Sistemi per la perfusione
- Sistemi per l'applicazione della pressione idrostatica
- Sistemi per l'applicazione della compressione

# Sistemi che applicano la forza di taglio

Ci sono diversi metodi per generare le forze di taglio:

- Fiasche rotanti: Si origina un flusso turbolento del mezzo di coltura sulla superficie dello scaffold creando uno stress di taglio. Permettono di diffondere l'ossigeno e i nutrienti all'interno del mezzo di coltura inducendo la crescita di tessuto.

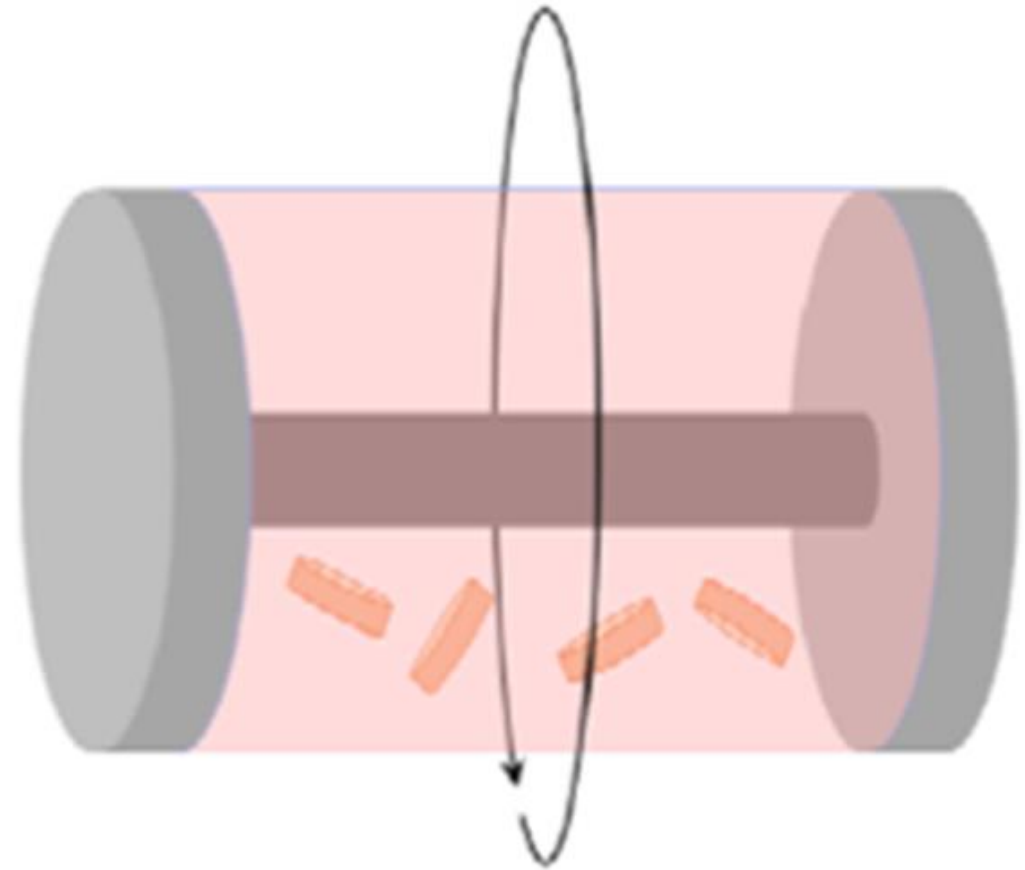




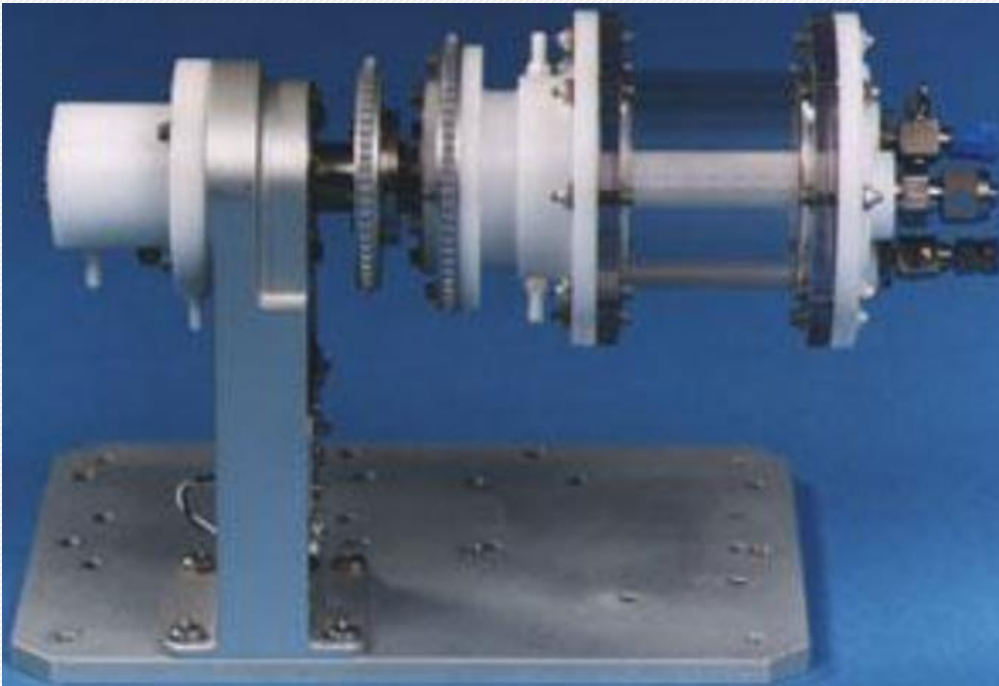
## Sistemi che applicano la forza di taglio

- Bioreattore a parete rotante:

I costrutti possono muoversi liberamente all'interno del mezzo di coltura ed il reattore, di policarbonato, possiede una forma cilindrica con un diametro di 5.75 cm ed un volume di 110 ml ad una velocità di 15-30 giri al minuto per mantenere il costrutto in sospensione.



# Bioreattore a parete rotante progettato dalla NASA



Il flusso del fluido di nutrimento riesce a contrastare la forza di gravità incoraggiando la crescita delle cellule in maniera naturale.

Il bioreattore cilindrico ospita un filtro che permette all'ossigeno e ai nutrienti di raggiungere il costrutto e al diossido di carbonio e ai prodotti di scarto di uscire dalla camera di coltura.

# Sistemi per la perfusione

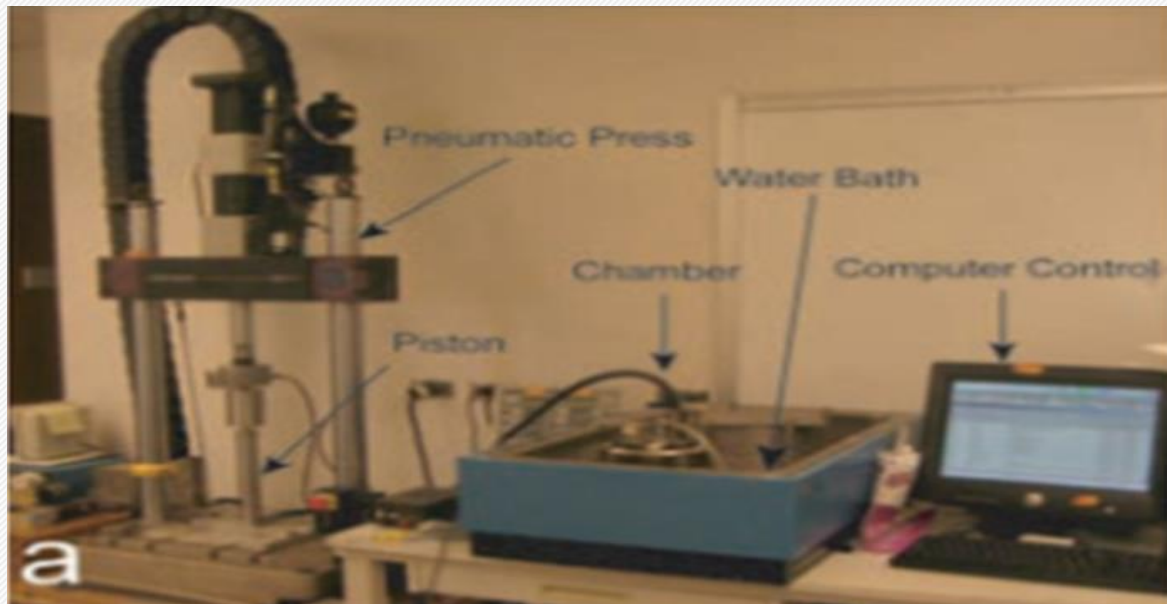
Le cellule vengono incorporate in una matrice polimerica o addirittura incapsulate in essa al fine di prevenire il loro distacco per effetto del flusso del mezzo di coltura.

La perfusione avviene con una velocità di flusso di 0.016 ml/min.

Vi è la presenza di filtri sterili nel serbatoio per permettere uno scambio di gas con l'atmosfera circostante.

# Sistemi per l'applicazione della pressione idrostatica

Si connette, attraverso un tubo di gomma, la camera riempita completamente di fluido ad un pistone che a sua volta risulta collegato ad una pressa idraulica controllata da un computer.



# Sistemi per l'applicazione della compressione

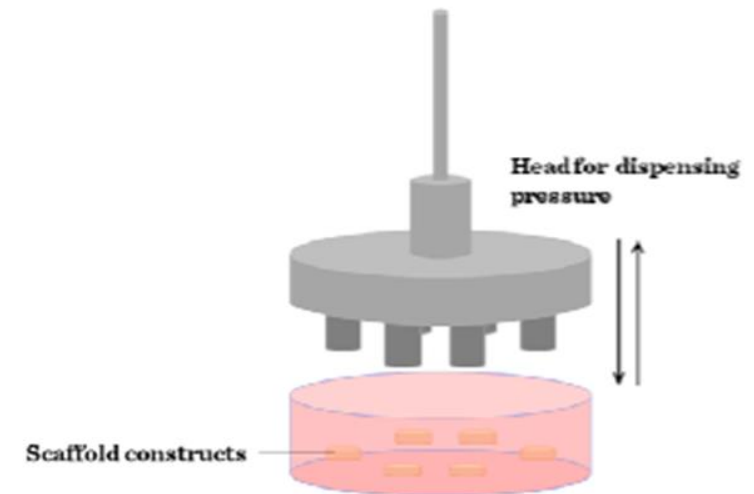
- ✓ Il carico compressivo applicato agli espianti di cartilagine può modulare la vitalità dei condrociti, l'espressione genica e la biosintesi di varie molecole componenti la matrice extracellulare.
- ✓ Il carico dinamico ha incrementato la sintesi di proteoglicani del 6-25% e la sintesi di proteine del 10-35%.
- ✓ Si sono osservati inoltre miglioramenti nella differenziazione condrogenica delle cellule staminali in seguito all'applicazione di una forza di compressione



# Sistemi per l'applicazione della compressione

Ci sono due metodi per l'applicazione della compressione, uno statico e uno dinamico:

- Compressione statica: si può applicare una forza di compressione monoassiale alle colture di cartilagine.
- Compressione dinamica: si può applicare attraverso un dispositivo dotato di due piastre che permette di coltivare contemporaneamente 12 costrutti. La grandezza della forza di compressione è una funzione della distanza tra le due piastre.



# Esiste un unico tipo di bioreattore per generare un tessuto perfetto?

Ogni tipo di tessuto che si voglia rigenerare in vitro e impiantare nell'organismo richiede una precisa struttura geometrica e, per questo, deve essere ricostruito in un adeguato tipo di bioreattore progettato appositamente.

Più sistemi di coltura sono stati progettati e sperimentati per l'ingegnerizzazione dello stesso tessuto biologico, ma non esiste un unico tipo di bioreattore che, in assoluto, riesca a riassumere in sé tutte le caratteristiche strutturali e funzionali atte a generare un tessuto perfetto.

# Bibliografia

- Schulz R.M., Bader A., “ Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes”, Eur Biophys J
- Lee C., Grad S., Wimmer M., Alini M., Chapter 1: “ Topics in tissue engineering”, Eds. N. Ashammakhi and R.L. Reis
- Partap S., Plunkett N.A., O’Brien F.J., chapter 16: “ Tissue Engineering”, Edited by Daniel Eberli
- Elder B.D., Athanasiou K.A., “Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration” , Tissue Engineering

ATMPs

# Aspetti regolatori

**Regolamento europeo CE 1394/2007 (prima applicazione nel dicembre 2008):**

**Introduzione di un nuovo approccio** su misura per la regolamentazione degli ATMPs **basato sul rischio** che consente flessibilità sui requisiti normativi.

L'**EMA** (Agenzia Europea per i medicinali) ed il **CAT**(Comitato per Terapie Avanzate), sono responsabili dell'autorizzazione all'immissione in commercio degli ATMPs in Europa.

**Istituzione del CAT** un comitato scientifico indipendente di esperti che ha il compito di valutare la qualità, la sicurezza e l'efficacia degli ATMPs secondo quanto prescritto dalla normativa.

**Scopo del CAT: “promuovere prodotti innovativi mantenendo elevati standard di autorizzazione al commercio”.**





# Aspetti regolatori

## Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives

Eve Hanna, Cécile Rémuzat, Pascal Auquier & Mondher Toumi

Il CAT gestisce due nuove procedure per le aziende sviluppatrici: la procedura di classificazione e la procedura di certificazione.

- **Procedura di classificazione:** determinare se un dato prodotto basato su geni, cellule o tessuti soddisfa i criteri scientifici che definiscono gli ATMP. La classificazione CAT fornirà certezza normativa circa il quadro giuridico applicabile e la guida scientifica da consultare durante lo sviluppo del prodotto.
- **Procedura di certificazione:** valutazione scientifica dei dati disponibili e dei dati non clinici. La valutazione dei dati della fase iniziale da parte del CAT, seguita dalla certificazione da parte dell'EMA, fornisce uno strumento alle aziende farmaceutiche medio-piccole per avviare negoziati con grandi società farmaceutiche o per attirare sostegno finanziario per l'ulteriore sviluppo del loro prodotto, compresa la conduzione di sperimentazioni cliniche. Il sistema di certificazione quindi mira a fornire un incentivo per lo sviluppo degli ATMP.

# Aspetti regolatori

Gli ATMPs devono soddisfare gli stessi requisiti scientifici e normativi degli altri medicinali. Lo sviluppo di un nuovo farmaco prevede degli studi di laboratorio, prima in vitro, poi in vivo sugli animali (**studi non clinici**).

Gli **studi clinici (sull'uomo)** vengono condotti **in conformità alla direttiva 2001/20/CE** nell'ordine:

- **Fase I** (studi di tossicità e di ricerca della dose massima non tossica)
- **Fase II** (studi di efficacia e di ricerca della dose efficace)
- **Fase III** (studi di efficacia comparativi in parallelo tra il nuovo prodotto ed il miglior trattamento esistente).

Solo il prodotto che mostri una chiara efficacia rispetto a farmaci esistenti potranno avere l'autorizzazione al commercio, dopo richiesta specifica di tale autorizzazione all'EMA.

# SpherOx

- SpherOx, sferoidi di condrociti autologhi (ACI), aggregati sferici di condrociti, associati alla matrice umana.
- Indicato per il trattamento di pazienti adulti con difetti cartilaginei articolari sintomatici del ginocchio superiori a  $2 \text{ cm}^2$  e minori di  $4 \text{ cm}^2$ .
- Dal paziente si preleva una piccola porzione di cartilagine sana. Questa viene formulata in laboratorio, con dei condrociti a dare degli sferoidi che poi vengono inseriti nel ginocchio malato per via artroscopica. Da 10 a 70 sferoidi vengono applicati per centimetro quadrato di difetto.

# SpherOx

## Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration

Catarina Madeira<sup>1</sup>, Aruna Santhagunam<sup>1</sup>, João B. Salgueiro<sup>2</sup>, and Joaquim M.S. Cabral<sup>1</sup>

- **Risultati:**

L'efficacia di SpherOx è stata valutata in due studi clinici, dove sono stati coinvolti pazienti tra i 18 ei 50 anni di età.

Nel **primo studio** (75 pazienti), di **Fase II**, le lesioni erano tra 4 e 10 cm<sup>2</sup>.

Nel **secondo studio** (102 pazienti), di **Fase III**, le lesioni erano più piccole, tra 1 e 4 cm<sup>2</sup>. I risultati, valutati con degli appositi questionari al fine di valutare la funzionalità, il dolore, la capacità di svolgere attività sportive piuttosto che ricreative, hanno permesso di concludere che, in entrambi gli studi, SpherOx aveva portato ad un significativo miglioramento delle condizioni dei pazienti ed anche della loro qualità di vita rispetto alle tradizionali tecniche di cura (microfrattura).

# Chondroelect

- Chondroelect è una sospensione impiantabile che contiene cellule cartilaginee autologhe espanse. Viene preparato appositamente per ogni singolo paziente e può essere utilizzato per trattare soltanto quel soggetto.
- **Somministrazione:** Con una biopsia viene prelevata della cartilagine dal ginocchio del paziente. Viene somministrato ai pazienti in una procedura di trapianto autologo di condrociti (ACI).

La sospensione viene inserita nel difetto della cartilagine del paziente. Una membrana biologica (come periostio autologo o Chondro-Gide ([Geistlich, Wolhusen, Switzerland]) viene quindi utilizzata come sigillo per mantenere le cellule in posizione mentre avviene la riparazione della cartilagine, assicurando una tenuta stagna.



## Impianto di condrociti: dati demografici

- Risultati ottenuti in uno studio che coinvolge 370 pazienti di 43 centri ortopedici in 7 paesi europei.
- I partecipanti erano pazienti trattati con ChondroCelect tra l'ottobre 2004 ed il luglio 2008.

## Clinical Outcomes of Characterized Chondrocyte Implantation

Johan Vanlauwe<sup>1</sup>, José Huylebroek<sup>2</sup>, Jan Van Der Bauwhede<sup>3</sup>, Daniël Saris<sup>4</sup>, Geert Veeckman<sup>5</sup>, Vladimir Bobic<sup>6</sup>, Jan Victor<sup>7</sup>, Karl Fredrik Almqvist<sup>7</sup>, Peter Verdonk<sup>8</sup>, Yves Fortems<sup>9</sup>, Nel Van Lommel<sup>10</sup>, and Ludo Haazen<sup>11</sup>

### Demographic

Age, mean (SD), y	33.7 (9.6)
Sex, % male	56.7
Weight, mean (SD), kg	77.1 (14.2)
Body mass index, mean (SD), kg/m <sup>2</sup>	25.0 (3.4)
Cartilage lesion size, mean (range), cm <sup>2</sup>	3.51 (0.25-20.0)
Cartilage lesion location, n (%)	
Medial femoral condyle	190 (43.3)
Patella	84 (19.2)
Lateral femoral condyle	66 (15.1)
Trochlea	39 (8.9)
Femoral condyle	32 (7.3)
Tibial plateau	13 (3.0)
Not specified	13 (3.0)
Single lesions	330 (87)
Multiple lesions	49 (13)

## Impianto di condrociti: eventi avversi

- Gli eventi avversi più comuni sono: artrofibrosi, mobilità articolare più ridotta e crepitii riportati nelle lesioni rotulee.
- Ogni chirurgo ha fornito un documento di raccolta degli eventi avversi per paziente. Per ognuno si riporta l'inizio e la data di conclusione, l'esito, la gravità e la relazione con ChondroCelect e l'azione intrapresa per contrastarlo.

Adverse events reported in $\geq 2\%$ of patients	% of patients
Knee pain	23.8
Joint effusion	8.6
Joint swelling	8.2
Joint crepitation	6.1
Muscle atrophy	6.1
Joint range of motion decreased	5.7
Tendon disorder	3.9
Joint lock	3.2
Therapeutic product ineffective	3.2
Bone swelling	2.9
Joint instability	2.9
Synovitis	2.9
Arthrofibrosis	2.5
Cartilage hypertrophy	2.1

# Impianto di condrociti: efficacia clinica

- Al termine dello studio è stata compilata una scala di **miglioramento (CGI-I)** ed **efficacia (CGI-E)** per ciascun paziente (Clinical Global Impression), con valutazione effettuata dal chirurgo.
- CGI-I:** scala categoriale in 7 punti con 3 categorie di miglioramento e 3 categorie di peggioramento (in minima parte, molto, moltissimo).
- CGI-E:** scala a 4 punti con le categorie "Molto buono", "moderato", "leggero" e "invariato o peggiorato".

**Table 4.** Clinical Global Impression–Improvement (CGI-I) and –Efficacy (CGI-E) According to Lesion Size Category

CGI-I	≤4 cm <sup>2</sup>	>4 cm <sup>2</sup>	Total	CGI-I	Single	Multiple	Total
Very much improved	47 (28.7%)	14 (28.6%)	61 (28.6%)	Very much improved	76 (31.9%)	6 (13.6%)	82 (29.1%)
Much improved	64 (39.0%)	23 (46.9%)	87 (40.8%)	Much improved	86 (36.1%)	23 (52.3%)	109 (38.7%)
Minimally improved	26 (15.9%)	10 (20.4%)	36 (16.9%)	Minimally improved	42 (17.6%)	5 (11.4%)	47 (16.7%)
No change	17 (10.4%)	1 (2.0%)	18 (8.5%)	No change	15 (6.3%)	5 (11.4%)	20 (7.1%)
Minimally worse	8 (4.9%)	1 (2.0%)	9 (4.2%)	Minimally worse	6 (2.5%)	5 (11.4%)	11 (3.9%)
Much worse	2 (1.2%)	0 (0.0%)	2 (0.9%)	Much worse	4 (1.7%)	0 (0.0%)	4 (1.4%)
Very much worse	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	Very much worse	2 (0.8%)	0 (0.0%)	2 (0.7%)
Total	164 (100%)	49 (100%)	213 (100%)	Total	231 (100%)	44 (100%)	275 (100%)
CGI-E	≤4 cm <sup>2</sup>	>4 cm <sup>2</sup>	Total	CGI-E	Single	Multiple	Total
Very good	59 (36.6%)	19 (38.0%)	78 (37.0%)	Very good	95 (39.9%)	12 (27.3%)	107 (37.9%)
Moderate	63 (39.1%)	21 (42.0%)	84 (39.8%)	Moderate	84 (36.2%)	18 (40.9%)	102 (36.2%)
Slight	19 (11.8%)	7 (14.0%)	26 (12.3%)	Slight	27 (11.7%)	6 (13.6%)	33 (11.7%)
Unchanged or worse	20 (12.4%)	3 (6.0%)	23 (10.9%)	Unchanged or worse	23 (11%)	8 (18.4%)	31 (11%)
Total	161 (100%)	50 (100%)	211 (100%)	Total	229 (100%)	44 (100%)	273 (100%)

# Impianto di condrociti: esito clinico

- Come si evince dai dati, la riparazione della cartilagine articolare con impianto di condrociti autologhi sembra essere ben tollerata ed efficace in una popolazione eterogenea di pazienti affetti da lesioni alla cartilagine.
- Il **rapporto beneficio/ rischio** complessivo dell'impianto di ChondroCelect nelle lesioni rotulee sembra quindi essere positivo.
- La **debolezza di questo studio** è l'assenza di un trattamento di controllo e la grande eterogeneità dei partecipanti e delle lesioni.



# Conclusioni: limiti degli ATMPs

- ✓ **Complessi studi clinici** per la valutazione dell'efficacia e della sicurezza, **elevatissimi costi e lunga durata**. Incentivi (come la riduzione delle tasse e nuove procedure) sono state istituite per assistere le imprese nello sviluppo degli ATMP.
- ✓ **Sistemi di somministrazione del prodotto** (ad esempio chirurgici, tramite cateteri o dispositivi specifici) molto diversi dalla via di somministrazione dei farmaci tradizionali (per via orale, endovenosa).
- ✓ **Dimostrazione dell'efficacia clinica, che potrebbe essere nota solo dopo molti anni.**



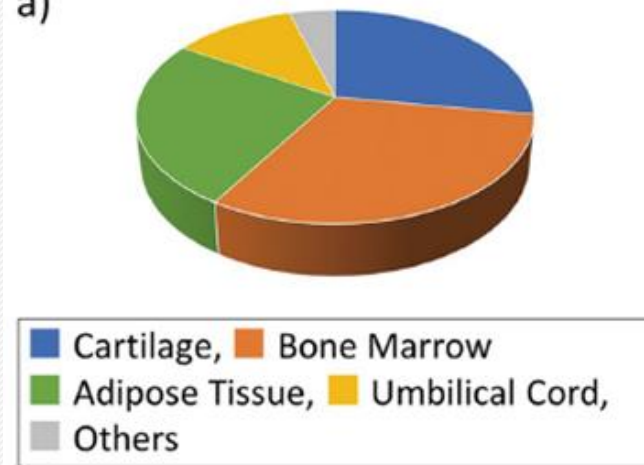
# Conclusioni: prospettive future degli ATMPs

- Negli ultimi dieci anni sono stati testati numerosi ATMPs per il trattamento delle lesioni della cartilagine negli studi clinici ed anche le procedure di classificazione CAT sono numerose suggerendo una vasta quantità di prodotti in fase di sviluppo.
- Tali prodotti rappresentano un campo di interesse in rapida crescita. Gli ATMPs possono potenzialmente curare condizioni croniche gravi e malattie oggi incurabili.

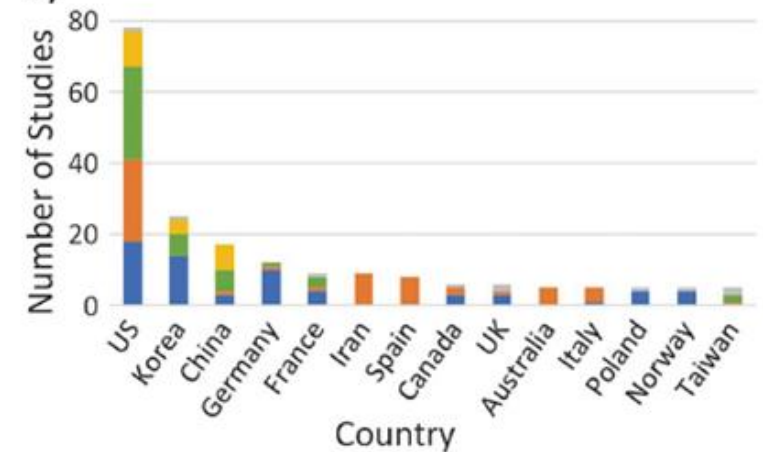
## Trends in clinical trials for articular cartilage repair by cell therapy

Takaharu Negoro<sup>1</sup>, Yuri Takagaki<sup>2</sup>, Hanayuki Okura<sup>1</sup> and Akifumi Matsuyama<sup>1,3</sup>

a)



b)



# Bibliografia

- Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. **Eve Hanna, Cécile Rémuzat, Pascal Auquier, Mondher Toumi.** 2016, Journal of Market Access & Health Policy.
- Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. **Catarina Madeira, Aruna Santhagunam, Joao B. Salgueiro, and Joaquim M.S. Cabral.** 2017, Cell Press.
- Clinical Outcomes of Characterized Chondrocyte Implantation. **Johan Vanlauwe, José Huylebroek, Jan Van Der Bauwhede, Daniël Saris, Geert Veeckman, Vladimir Bobic, Jan Victor, Karl Fredrik Almqvist.** 2011, Cartilage.
- Trends in clinical trials for articular cartilage repair by cell therapy. **Takaharu Negoro, Yuri Takagaki, Hanayuki Okura and Akifumi Matsuyama.** 2018, Regenerative medicine.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1394/2007 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 13 novembre 2007 sui medicinali per terapie avanzate.

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE

