DERMAKOS
SUPPL. NCF

Bimestrale

Data 11-2009
Pagina 42/45
Foglio 1 / 4

www.ecostampa.it

• Silvia Guenzi

Rigenerazione cutanea

Attualità e prospettive

SONO ORMAI ENTRATI NELLA PRATICA CLINICA GLI IMPIANTI DI EPIDERMIDE OTTENUTA DA COLTURE IN VITRO DI CHERATINOCITI AUTOLOGHI ED È IN CRESCITA L'USO DI SOSTITUTI DI CUTE AUTOLOGA COLTIVATA SU MATRICI RIASSORBIBILI, CHE ATTIVANO LA RIGENENERAZIONE DEL TESSUTO CONNETTIVO. OLTRE ALLA TERAPIA CELLULARE, SONO IN CORSO SPERIMENTAZIONI DI TERAPIA GENICA PER LA CURA DI MALATTIE GENETICHE DELLA PELLE PER CUI FINORA NON ESISTONO CURE. L'IMPIANTO DI FIBROBLASTI AUTOLOGHI È UNA TECNICA A CUI RICORRERE ANCHE PER SCOPI DI BIORIVITALIZZAZIONE CUTANEA ANTIAGING, RISULTATA VALIDA E SENZA RISCHI

Negli ultimi anni la scoperta della presenza in vari organi e tessuti dell'adulto di **cellule staminali multipotenti**, che si possono far differenziare in diversi tipi di cellule mature mediante tecniche di ingegneria tessutale, ha permesso una serie di applicazioni in chirurgia plastica, dermatologia, ortopedia e oculistica.

La **medicina rigenerativa**, che si occupa dello sviluppo di terapie avanzate mirate alla ricostruzione di tessuti e organi irrimediabilmente danneggiati, si basa appunto sulla possibilità di coltivare in vitro cellule staminali autologhe, prelevate cioè da tessuti dello stesso paziente che necessita il trapianto, ottenendo nuovi tessuti da impiantare (terapia cellulare). Rientra nella medicina rigenerativa anche la **terapia genica**, trattamento clinico in cui le cellule staminali sono modificate geneticamente prima del trapianto, per correggere il difetto responsabile di una malattia genetica.

La crescita delle cellule staminali deve avvenire su un supporto artificiale (matrice o "*scaffold*"), in modo da riprodurre tridimensionalmente il tessuto o l'organo da impiantare.

Si deve utilizzare uno *scaffold* adatto, grazie al quale le cellule riescano a formare strutture stratificate: di solito il supporto è sostituito da una membrana in materiale biologico (collagene, acido ialuronico) che poi si dissove, lasciando solo il tessuto riprodotto.

Inoltre, è fondamentale riprodurre in coltura le condizioni che consentono alle cellule di moltiplicarsi e differenziarsi nel tipo di tessuto voluto. Per quanto riguarda la **riparazione di ustioni, ferite e lesioni cutanee**, la medicina rigenerativa ha fatto passi da gigante negli ultimi anni. Si è passati dai trapianti di cute allogenica, ai trapianti di cute autologa e di cheratinociti coltivati in vitro. Sono entrati nella pratica clinica anche gli impianti di derma, utilizzando matrici riassorbibili rivestite di fibroblasti o sostituti dermali che attivano la rigenenerazione del tessuto connettivo o "neoderma".

COLTIVAZIONE IN VITRO DI EPIDERMIDE AUTOLOGA

Poiché l'utilizzo di cute omologa da donatore (allotrapianto) può portare inconvenienti, tra cui rischi di rigetto e di tramissione di malattie infettive, gli studi si sono sempre più indirizzati verso l'autotrapianto e la cute bioingegnerizzata, a cui ricorrere per la terapia di ulcere, ustioni e interventi di chirurgia ricostruttiva. Per anni, i laboratori di ricerca di tutto il mondo hanno cercato di far crescere le cellule

Legislazione sulle terapie cellulari

Per limitare al massimo i rischi di trasmissione di infezione durante il trapianto di tessuti e cellule occorre garantirne la qualità e la sicurezza.

La **direttiva 2004/23/CE** definisce i parametri di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, l'analisi, la lavorazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule d'origine umana. I tessuti devono essere conservati nelle banche dei tessuti, strutture sanitarie pubbliche preposte alla conservazione e distribuzione dei tessuti stessi, che verranno in seguito trapiantati.

Secondo la direttiva europea, recepita dall'Italia nel 2004 con obbligo di adeguamento entro il 2012, i prodotti delle colture cellulari rientrano nella categoria dei **farmaci per terapie avanzate**. Pertanto le colture cellulari destinate all'applicazione clinica devono essere effettuate secondo le norme GMP (Good Manufacturing Practices), adottate dalle industrie farmaceutiche nella produzione dei farmaci. Perché un laboratorio possa diventare una "fabbrica" di cellule per terapie cellulari e offrire un servizio agli ospedali deve quindi ottenere la certificazione GMP, secondo quanto prescritto dall'EMEA, l'agenzia europea per i medicinali.

091375

Ritaglio stampa ad uso esclusivo del destinatario, non riproducibile.

Bioscience Institute

www.ecostampa.it

senza rischi di infezioni e in modo riproducibile. La svolta ha avuto luogo verso la fine degli anni '70, quando Rheinwald e Green hanno pubblicato un articolo che illustrava la tecnica di coltivazione in vitro dell'epidermide con metodica "*feeder-layer*" [1], che cominciò subito a essere adottata dai Centri ustioni in tutto il mondo. Dalla coltura di cheratinociti basali autologhi, ricavati da piccole biopsie di 2-4 cm² di cute sana effettuate sul paziente, si riescono a ottenere in due-tre settimane, grandi aree di epidermide o "lembi".

Colture di cheratinociti staminali

Come per la maggior parte degli epiteli in grado di autorinnovarsi, la capacità dell'epidermide di mantenere un costante turnover cellulare dipende dalla presenza nello strato basale di una popolazione di cheratinociti staminali con grande potenziale proliferativo, detti **olocloni**, che generano cellule che vanno incontro a differenziazione terminale dopo una quindicina di divisioni [2].
Nel corso degli ultimi anni la conoscenza della biologia degli olocloni, lo sviluppo di tecniche adeguate alla loro selezione, in base alla presenza o meno di specifici marcatori molecolari e alla differente capacità proliferativa [3], ne ha permesso l'applicazione in clinica. Gli olocloni sono multipotenti, cioè in grado di rigenerare tutti i tipi cellulari dei tessuti di origine, e, coltivati in laboratorio in condizioni adatte, danno origine a un epitelio stratificato che, trapiantato in pazienti con danni epiteliali anche estesi, è in grado di recuperare in modo permanente l'epidermide. «L'impiego delle **staminali epiteliali** per la riproduzione di tessuto cutaneo è ormai una realtà terapeutica, diversamente da altri ambiti in cui l'uso delle staminali è ancora in fase pre-clinica o al massimo in fase di sperimentazione clinica» spiega Nicolò Scuderi, direttore del Dipartimento di chirurgia plastica e ricostruttiva dell'Università La Sapienza di Roma, che da anni si occupa di rigenerazione cutanea. «Nei prossimi anni, ci si indirizzerà sempre più verso l'applicazione delle staminali epiteliali in protocolli di medicina rigenerativa per la ricostruzione di tessuti quali la mucosa uretrale, vaginale e del cavo orale, per cui sono già state condotte alcune sperimentazioni».

Ricostruzione completa di epidermide e derma

I lembi di epidermide coltivata in laboratorio risultano molto fragili e, inoltre, l'attecchimento di questi è ottimale solo quando i cheratinociti trovano un **letto dermico idoneo**, cioè ben vascolarizzato e privo di infezioni. Perciò la successiva ricerca si è indirizzata verso matrici che fungessero da supporto e che permettessero alle cellule di disporsi secondo l'architettura tipica delle pelle. Per la completa ricostruzione cutanea nei casi di grandi perdite di tessuti - come quelle che e si verificano nelle ulcere diabetiche, vascolari, da decubito e post-chirurgiche, nelle ustioni gravi di 2° e 3° grado - è necessario anche l'impiego di un **sostituto dermale** o **derma allogenico.** Poiché il derma è molto meno immunoreattivo dell'epidermide, soprattutto se crioconservato [4], negli ultimi decenni sono state messe a punto diverse metodiche che prevedono l'impiego di derma allogenico umano de-epidermizzato per ricostruire la componente dermica nelle perdite di sostanza a tutto spessore su cui impiantare il lembo di epidermide autologo ottenuto da cheratinociti espansi in vitro. Oggi è possibile ricostruire entrambi i componenti della cute – epidermide e derma - a partire dai cheratinociti e dai fibroblasti del paziente che necessita il trapianto, dopo coltura di queste cellule su supporti tridimensionali o *scaffold* biocompatibili. Negli ultimi anni si è notevolmente sviluppata la produzione commerciale di *scaffold* bio-assorbibili e di cute ingegnerizzata. Questa può essere suddivisa in componente epidermica (p.e. epidermide coltivata in vitro su garza o cheratinociti su strato di acido ialuronico esterificato), componente dermica (p.e. membrana a doppio strato di collagene e glicosamminoglicano) e graft composto.

Sostituti di cute autologa coltivata: limiti attuali e prospettive

I sostituti di cute coltivata (CSS) sono stati sempre più utilizzati in

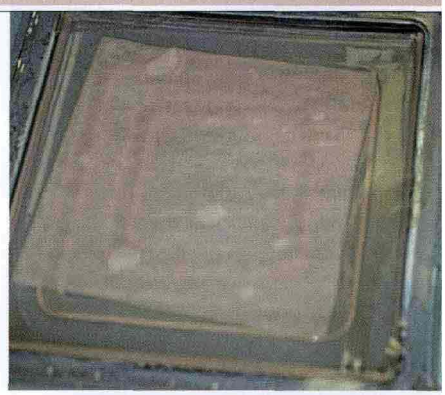

Figura 1 – Lembo di cute bioingegnerizzata (Hyaff 11®) pronto per il trapianto (8x8 cm).

dermatologia plastica, dai primi tentativi nel 1981 ad opera di O'Connor [5] fino ai più recenti lavori di Boyce del 2006 [6] e Nie del 2007 [7], per sostituire l'epidermide e il derma in procedure separate - si applicano prima i fibroblasti e circa una settimana dopo i cheratinociti - o per rimpiazzare entrambe le componenti cutanee in una singola procedura *"one step"*, che possa portare risultati simili a quelli degli autotrapianti di cute a medio spessore, permettendo di ridurre la quantità di cute che normalmente viene prelevata in caso di autotrapianto [8, 9, 10].
«La ricerca è attualmente impegnata su due questioni: l'individuazione di un biomateriale il più possibile adatto come *scaffold* e il superamento dei limiti anatomici dell'applicazione in vivo di CSS» riassume Scuderi. «Per quanto riguarda il biomateriale, si sono sviluppati sostitutivi cutanei su *scaffold* di acido ialuronico che sono risultati più adatti per far crescere i cheratinociti delle precedenti matrici di collagene». Il primo tentativo di ricostruire in vitro una cute autologa bioingegnerizzata utilizzando uno *scaffold* di acido ialuronico esterificato è stato descritto nel 1998 [11]; attualmente una delle matrici più usate per la coltura di cellule è quella realizzata con **derivati di acido ialuronico** (HYAFF 11). Questo biomateriale totalmente biodegradabile e immunologicamente inerte, favorisce l'adesione e l'organizzazione tridimensionale delle cellule, assicura stabilità e facilità di manipolazione, ed è anche particolarmente resistente alla contrazione dei materiali a base di collagene; inoltre gli *scaffold* a base di HYAFF 11 hanno dimostrato di permettere la crescita

091375

Ritaglio stampa ad uso esclusivo del destinatario, non riproducibile.

Bioscience Institute

DERMAKOS
SUPPL. NCF

Bimestrale

Data 11-2009
Pagina 42/45
Foglio 3 / 4

e il differenziamento di fibroblasti, cheratinociti e condrociti [12]. Man mano che le cellule producono la matrice extracellulare, il supporto si biodegrada, liberando acido ialuronico che contribuisce alla rigenerazione tessutale. «La cute autologa bioingegnerizzata provoca la **riattivazione dei processi di riparazione** della ferita e, rispetto alle terapie tradizionali, riduce i tempi di guarigione e l'invasività della terapia» afferma Scuderi. I limiti anatomici dei CSS che ancora rimangono, in confronto agli autotrapianti, includono l'ipopigmentazione e l'assenza di vasi sanguigni, ghiandole o follicoli.
«Noi abbiamo riportato l'uso clinico di un sostitutivo cutaneo ottenuto dalla co-coltivazione di cheratinociti, melanociti e fibroblasti in uno scaffold 3D di acido ialuronico esterificato HYAFF 11 (figura 1) che viene gradualmente riassorbito dopo impianto e sostituito da connettivo del paziente [13]» spiega Scuderi. «Un problema riscontrato in quasi tutti i casi è la perdita di cheratinociti è legata alla crescita eccessiva di fibroblasti: al momento della rimozione della medicazione l'attecchimento dei trapianti mediante CSS era paragonabile a quello degli autotrapianti, ma durante il follow-up, la perdita dello strato epiteliale variava significativamente (da 5 a 90%), a eccezione di un caso di totale attecchimento (figura 2)».
Il prossimo obiettivo della cute bioingegnerizzata sarà un sostitutivo

FIGURA 2 – IMMAGINE ISTOLOGICA DEL TESSUTO A 20 GIORNI DAL TRAPIANTO

cutaneo in cui derma ed epidermide siano combinate con **cellule endoteliali** dei vasi sanguigni che possano apportare l'adeguato nutrimento al nuovo tessuto: la vascolarizzazione è infatti essenziale per il completo attecchimento dei sostituti cutanei. In tal senso, è stata recentemente creata un'architettura derma-epidermide che include una rete di microcapillari in un biomateriale 3D [14, 15].

SPERIMENTAZIONI DI TERAPIA GENICA E TRATTAMENTO DELLA VITILIGINE

Le cellule staminali epidermiche sono state usate con successo nella prima sperimentazione clinica della terapia genica dell'**epidermolisi bollosa** (EB), malattia genetica della pelle che impedisce ai cheratinociti basali di aderire al derma sottostante e implica la formazione continua di vesciche, perdita di unghie e capelli. Presso il Centro di Medicina rigenerativa di Modena, è stato sviluppato un metodo per riparare i difetti genetici responsabili dell'EB nelle cellule staminali dell'epidermide prima di reintrodurle nel paziente in un'area sottoposta a disepitelizzazione mediante diatermochirurgia (terapia genica *ex vivo*) [16].
Sono in corso trial clinici di fase I e II, con l'obiettivo di validare le procedure *ex vivo*, di verificare la sicurezza del trattamento, la sopravvivenza a lungo termine delle cellule modificate geneticamente e la persistenza dell'espressione dei nuovi geni. Dopo un anno dal trattamento di un paziente affetto da una forma non letale della malattia, detta giunzionale (JEB), la valutazione del risultato nelle zone trapiantate ha confermato la completa rigenerazione e mantenimento della "nuova" epidermide, senza sviluppo di lesioni bollose. Questa sperimentazione sull'EB è particolarmente importante perché apre la strada all'applicazione della terapia genica per la cura di un gran numero di altre malattie genetiche della pelle per cui non esistono cure efficaci.
La **disepitelizzazione** mediante diatermochirurgia era stata già utilizzata con successo anche nella **ripigmentazione della vitiligine stabile**, ossia quella forma di vitiligine in cui le zone cutanee prive di pigmentazione restano stabili per almeno due anni. In questo caso, sono state effettuate co-colture di cheratinociti e melanociti autologhi, ottenuti da zone di cute normalmente pigmentata del paziente da trapiantare, che hanno generato lembi di epidermide normale poi applicati alle porzioni di cute da trattare, previamente disepitelizzate.
Il follow up nei tre anni successivi all'intervento ha indicato una percentuale di successo superiore al 70% [17]. Questo lavoro ha anche dimostrato che i cheratinociti giocano un indispensabile ruolo accessorio nella ripigmentazione: infatti, i melanociti umani normali crescono e si dividono poco in coltura, mentre in co-coltura con i cheratinociti si riproducono in numero sufficiente per il trattamento di ampie zone di vitiligine.

Conservazione e uso di cute alloplastica per i grandi ustionati

La pelle da donatore o "allo" viene conservata nelle banche di cute legate a ospedali, centri trapianti o grandi ustionati, mediante **crioconservazione** - che, congelando gradualmente la cute fino a - 80°C, ne mantiene intatta la vitalità tissutale per almeno due anni - oppure attraverso la **glicerolizzazione**, che consiste nell'immersione dei lembi di cute in soluzioni di glicerolo, in percentuali via via crescenti da 50 a 85%, e permette alla struttura di conservarsi integra per due anni a 4°C, anche se le cellule muoiono. Su tutta la pelle alloplastica vengono poi effettuati controlli qualità che ne garantiscono la sterilità e, nel caso della crioconservazione, il mantenimento della vitalità dopo lo scongelamento.
Il trapianto avviene in genere secondo la procedura ideata da Cuono et al. nel 1987 [19], che consiste nell'applicazione della pelle alloplastica crioconservata direttamente sulla lesione: dopo due settimane, viene eliminato lo strato superficiale della cute trapiantata che inizia a dare sintomi di rigetto, mentre il derma sottostante in genere attecchisce senza problemi, e si applica al suo posto l'epidermide autologa coltivata, che nel frattempo ha raggiunto le dimensioni volute.

www.ecostampa.it
091375
Ritaglio stampa ad uso esclusivo del destinatario, non riproducibile.
Bioscience Institute

www.ecostampa.it

Impianto di fibroblasti per il ringiovanimento cutaneo

Dall'ingegneria dei tessuti viene anche una tecnica per il ringiovanimento cutaneo basata sull'espansione e l'iniezione locale di **fibroblasti autologhi**, che sfrutta la naturale capacità di queste cellule del derma di produrre collagene ed elastina.
«Mentre gli altri sistemi finora disponibili, come i "filler", servono a stimolare i fibroblasti a produrre tali proteine, responsabili della compattezza e dell'elasticità della pelle, in questo caso si iniettano direttamente i fibroblasti, in modo da compensare la perdita progressiva di queste cellule dovuta all'invecchiamento» spiega il professor Scuderi. Inoltre, l'utilizzo di cellule autologhe esclude il pericoli di rigetto che possono verificarsi con prodotti o filler sintetici.
La tecnica – che consiste nel prelievo di un piccolo campione di cute prelevato da dietro l'orecchio del paziente da cui vengono estratti e coltivati in vitro i fibroblasti – permette di disporre in poco tempo di un elevato numero di cellule attive e vitali di cui una parte può essere re-impiantata subito per aumentare la produzione di collagene della pelle e ottenere una biorivitalizzazione, e una parte destinata alla conservazione in azoto liquido ("crioconservazione") per interventi futuri.
«La tecnica di crioconservazione dei fibroblasti autologhi viene praticata da anni negli Stati Uniti, mentre in Italia è ancora agli inizi, anche se in Europa è già possibile crioconservare i propri fibroblasti in una "banca della cute", come ad esempio quella presso il Bioscience Institute di San Marino» spiega il professore.
«Le cellule crioconservate potranno essere amplificate innumerevoli volte, permettendo di effettuare trattamenti estetici a distanza di anni senza bisogno di un nuovo prelievo; ma l'aspetto più interessante è che il congelamento in azoto liquido blocca l'età biologica dei fibroblasti all'epoca del prelievo, permettendo di disporre di fibroblasti con **vitalità e capacità riproduttiva** più elevate rispetto all'età del paziente da trattare».
Sia il prelievo di cute sia l'impianto di cellule viene effettuato in sede ambulatoriale. I test di sterilità, effettuati prima dell'impianto, evitano ogni rischio di infezione e l'uso di aghi di appena 2 mm di lunghezza, sufficienti per raggiungere il derma, limita notevolmente la formazione di ecchimosi ed eritemi, e rende la tecnica totalmente indolore.
Studi clinici hanno dimostrato che l'**impianto autologo di fibroblasti** è ben tollerato e valido nel migliorare i parametri dell'aging in accostamento alle tecniche di biorivitalizzazione fisica e chimica nei pazienti trattati [18].

Bibliografia

1. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and teh multiplication of cultured human epidermal keratinocyte. Nature 1977; 265: 421-424.
2. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84(8): 2302-2306.
3. Papini S et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. Stem Cells 2003; 21(4): 481-494.
4. Abbott W. Absence of antigenicity in freeze-dried skin allograft. Criobiology 1969; 6: 416.
5. O'Connor NE et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. Lancet 1981; 10 (8211): 75-78.
6. Boyce ST et al. Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns. J Trauma 2006; 60(4): 821-829.
7. Nie X et al. Cosmetic Improvement in Various Acute Skin Defects Treated With Tissue-engineered Skin. Artif Organs 2007; 31(9): 703-710.
8. Boyce ST, Warden GD. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. Am J Surg 2002; 183: 445-456.
9. Boyce ST et al. Cultured skin substitutes combined with Integra to replace native skin autograft and allograft for closure of full-thickness burns. J Burn Care Rehabil 1999; 20: 453-461.
10. Boyce ST et al. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. Ann Surg 2002; 235: 269-279.
11. Zacchi V et al. In vitro engineering of human skin-like tissue. J Biomed Mater Res 1998; 40: 187-194.
12. Campoccia D et al. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. Biomaterials 1998; 19: 2101-2127.
13. Scuderi N et al. The clinical application of autologous bioengineered skin based on a hyaluronic acid scaffold. Biomaterials 2008; 29(11): 1620-1629.
14. Supp DM, Wilson-Landy K, Boyce ST. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. FASEB J. 2002; 16(8): 797-804.
15. Tonello C et al. In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with a microcapillary network using biopolymer scaffolds. FASEB J. 2005; 19(11): 1546-1548.
16. Mavilio F., Pellegrini G. et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. Nature Medicine 2006; 19 Nov.
17. Guerra L, Capurro S et al. Treatment of "stable" vitiligo by timedsurgery and transplantation of cultured epidermal autografts. Arch Dermatol 2000; 136: 1380-1389.
18. Lovreglio R. Comunicazione 57° Congresso nazionale della Società Italiana di Chirurgia Plastica Ricostruttiva ed Estetica (Napoli, 24-27 settembre 2008)
19. Cuono CB et al. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. Plast Reconstr Surg 1987; 80: 626-637.

Ritaglio stampa ad uso esclusivo del destinatario, non riproducibile.

091375

Bioscience Institute