

LO STANZOLOLO CARICATO SU SCAFFOLD DI OSSO BOVINO DEPROTEINIZZATO PROMUOVE LA RIGENERAZIONE OSSEA NEL RATTO

Ghiacci Giulia, *DDS*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma

Graiani Gallia, *BS, PHD*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma

Ravanetti Francesca, *MSc, PHD*

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università degli Studi di Parma

Galli Carlo, *DDS, PHD*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma

Lumetti Simone, *DDS, PHD*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma

Manfredi Edoardo, *DDS, PHD*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma

Cacchioli Antonio, *MSc, Prof.*

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università degli Studi di Parma

Sala Roberto, *DM, MSc, Prof.*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma

Macaluso Guido Maria, *DM, MSc, Prof.*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma

ABSTRACT

Questo studio ha valutato gli effetti della somministrazione locale di Stanozololo (ST) sulla rigenerazione ossea nel ratto. Difetti critici bilaterali sono stati creati nella calvaria di 26 ratti Wistar e sono stati riempiti rispettivamente con osso bovino deproteizzato+ST (test) o con il solo osso bovino deproteizzato (controllo). A 1 e 3 mesi sono stati valutati: osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT), biomateriale residuo (DBBM), tasso di apposizione minerale (MAR). Sono stati inoltre analizzati con immunohistochimica densità capillare, OSX/OC, ALP, COL1A1. L'espressione dei geni GAPDH, RUNX2, COL2A1, SP7, COL2A1, COL1A2, FN è stata valutata tramite RT-PCR. Ad 1 mese, NB è risultato significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo ($24.41\% \pm 4.14\%$ vs $15.01\% \pm 2.43\%$, $p < 0.05$), dato coerente con il MAR ($9.20\mu\text{m}/\text{day} \pm 0.37\mu\text{m}/\text{day}$ vs $6.50\mu\text{m}/\text{day} \pm 1.09\mu\text{m}/\text{day}$, $p < 0.05$). FT tendeva ad essere maggiore nel gruppo controllo ($45.53\% \pm 4.95$ vs $54.21\% \pm 4.83$, $p > 0.05$) mentre DBBM risultava simile tra i gruppi ($29.16\% \pm 4.14\%$ vs $30.78\% \pm 4.15\%$, $p > 0.05$). A 3 mesi, non erano presenti differenze morfometriche tra i gruppi ($p > 0.05$). Le valutazioni immunohistochimiche ed il profilo di espressione genica hanno consentito di confermare gli effetti positivi dello ST sul commitment osteoblastico e sulla deposizione di matrice ossea.

Parole chiave: *Ratto; Difetto critico; Innesti ossei; Rigenerazione ossea; Androgeni; Stanozololo*

Introduzione

L'atrofia dell'osso alveolare che segue la perdita di uno o più elementi dentali costituisce un comune reperto clinico e può rappresentare un ostacolo ad un'adeguata riabilitazione implantoprotesica. Tra le opzioni per l'aumento del volume osseo, la combinazione di scaffold osteoconduttivi con molecole in grado di promuovere la rigenerazione ossea rappresenta un ambito di crescente interesse scientifico, e diversi fattori (es. fattori di crescita, proteine morfogenetiche) sono stati ad oggi testati.

Gli steroidi androgeni svolgono importanti funzioni nella morfogenesi scheletrica e nel mantenimento dell'omeostasi ossea durante tutto il corso della vita [1][2][3][4]. Diversi esperimenti *in vitro* hanno mostrato

che essi sono in grado di promuovere il differenziamento e l'attività degli osteoblasti e di inibirne l'apoptosi [5][6][7][8][9][10][11]; al contempo, sono stati riportati effetti di inibizione del commitment e dell'azione degli osteoclasti [12][13]. Sperimentazioni su modelli animali hanno mostrato che gli androgeni contribuiscono alla maturazione dei condrociti, all'ossificazione metafisaria e alla crescita delle ossa lunghe [14][15]. La castrazione di ratti e topi è stata associata a riduzione della massa ossea sia corticale sia trabecolare [16][17][18][19][20], che poteva essere prevenuta attuando una terapia ormonale sostitutiva con somministrazione esogena di androgeni [21][22][23][24][25][26][27]. Analoghe evidenze si sono ottenute da sperimentazioni umane ed hanno portato all'uso clinico di steroidi androgeni o derivati per il mantenimento della massa ossea in casi di osteopenia o osteoporosi primaria o da limitata capacità androgenica autogena [28][29][30][31]. Nonostante siano noti gli effetti positivi degli androgeni sul metabolismo osseo, il loro utilizzo a fini rigenerativi è stato finora limitato a causa della scarsa maneggevolezza e dei potenziali effetti collaterali, in primis di virilizzazione e di alterazione del profilo lipidico, legati alla loro somministrazione sistemica. Per supplire a questi inconvenienti, sono stati introdotti steroidi sintetici con elevata azione anabolizzante e minimi effetti androgenici. Tra questi vi è lo Stanozololo (ST), composto non aromatizzabile derivata dal diidrotestosterone, che in sperimentazioni *in vitro* ha mostrato effetti positivi sulla proliferazione osteoblastica [32] e in studi clinici si è mostrato in grado di migliorare i livelli di densità ossea minerale e le proprietà di resistenza biomeccanica dell'osso [33][34].

Oltre al tipo di steroide utilizzato, la sostituzione della somministrazione sistemica con una somministrazione locale potrebbe consentire di ridurre le dosi di impiego e di ottenere un effetto anabolico focalizzato sull'osso, minimizzando gli effetti indesiderati. In un recente studio *in vitro*, l'uso di testosterone combinato a scaffold biodegradabile è stato associato ad un aumento della vitalità e della proliferazione osteoblastica, fornendo risultati incoraggianti per un approccio di somministrazione locale degli androgeni a scopo rigenerativo [35]. Lo ST è stato recentemente testato *in vivo* per via locale nel trattamento di patologie osteoarticolari: periodiche iniezioni intra-capsulari di farmaco hanno avuto effetti positivi sulla rigenerazione cartilaginea, consentendo il ripristino di una corretta anatomia funzionale articolare [36]. Tuttavia, l'applicazione di ST in combinazione a materiale da innesto non è ancora stata testata a livello dell'osso.

Scopo di questo studio è di analizzare gli effetti della somministrazione locale di ST sulla rigenerazione ossea in difetti critici di calvaria di ratto a 1 e a 3 mesi.

Materiali e Metodi

Preparazione del biomateriale. Cinquantadue blocchi di DBBM (Geistlich Bio-Oss[®] block 1x1x2, Geistlich Biomaterials) sono stati tagliati in dischi di diametro di 5 mm e 1.5 mm di larghezza in condizioni di sterilità, con una fresa a ruota diamantata. I dischi sono stati pesati con una bilancia di precisione (Mettler Toledo Analytical Balance AE240, Marshall Scientific) ed è stato eseguito un matching tra coppie di dischi. Un disco di ciascuna coppia è stato trattato con 150 ml di 0,1% ETOH + 100 nM ST (DBBM + ST, gruppo di test), mentre con 150 ml di 0,1% ETOH (DBBM, gruppo controllo). I dischi sono stati lasciati 20 minuti a temperatura ambiente per consentire l'adsorbimento dello ST, e quindi incubati a 50° C per 4 ore. Ogni disco è stato chiuso singolarmente e contrassegnato da un codice alfanumerico.

Procedure chirurgiche. Previa approvazione del Comitato Etico per la sperimentazione animale di Parma, 26 ratti Wistar maschi di 4 mesi sono stati inclusi nello studio. Quindici minuti prima dell'intervento, gli animali hanno ricevuto una somministrazione intramuscolare di 10 mg/kg enrofloxacin (Baytril, Bayer, Germania). L'anestesia è stata ottenuta con l'iniezione intraperitoneale di 30 mg/kg tiletamine cloridrato zolazepam cloridrato (Zoletil 100, Virbac, Francia). La cute della regione parietale del calvaria è stata rasata e disinfettata con iodio-povidone al 10%, poi è stata effettuata una incisione mediana a tutto spessore, estesa sagittalmente dalla linea bipupillare al processo occipitale. I lembi chirurgici sono stati sollevati delicatamente. Difetti critici standardizzati dal diametro di 5,0 mm sono stati creati bilateralmente sull'osso parietale. Il difetto da un lato è stato riempito con DBBM + ST (test) e il controlaterale con DBBM (controllo). Una sutura a due strati (Vycril 5-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Netherlands; Prolene 3-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Netherlands) è stata effettuata per consentire la guarigione per prima intenzione delle ferite, facendo attenzione a preservare periostio (Figura 1). Tutti gli interventi chirurgici sono stati eseguiti dallo stesso operatore. Dopo l'intervento, i ratti sono stati assegnati in modo casuale a un periodo di guarigione di 1 o 3 mesi. Per valutare il tasso apposizione minerale (MAR), a 23 e 24 giorni i ratti sono stati trattati con 10% Xylenol Orange (Sigma Aldrich, USA) alla dose di 30 mg/kg. Dal giorno 80 al 84, gli animali destinati al periodo di guarigione di 3 mesi sono stati trattati con Calcein Green 20 mg/kg (Sigma Aldrich, USA). Al termine del periodo sperimentale, i ratti sono stati sacrificati con un'iniezione intraperitoneale di pentobarbital 150 mg/kg ed i campioni biologici sono stati prelevati.

Figure 1.

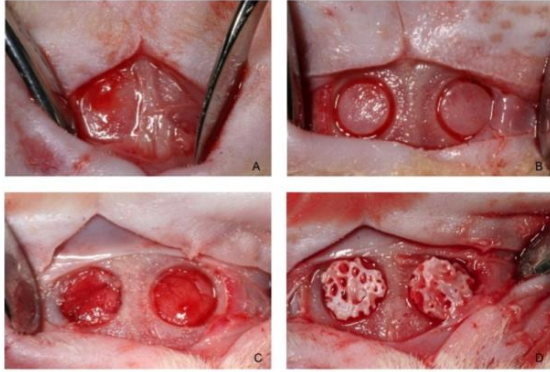


Figura 1. Procedure chirurgiche di innesto: A. scollamento del lebo a tutto spessore lungo la sutura sagittale; B. osteotomia bilaterale dell'osso parietale ottenuta per mezzo di fresa trephine dal diametro esterno di 5 mm; C. aspetto dei difetti critici bilaterali dopo osteotomia; D. difetti innestati con DBBM+ST (lato test) e DBBM (lato controllo). Fotografia ottica (Nikon D3x, 24.5 Megapixels).

Istomorfometria. I campioni di 18 ratti sono stati fissati in formalina al 10% per 48 ore, lavati in acqua corrente e decalcificati in acido etilendiamminotetracetico 0.5 M (EDTA) pH 7.4. I campioni sono stati quindi disidratati in una serie ascendente di alcol dal 70% al 100% (Carlo Erba reagents, Italy), chiarificati in xylene (Carlo Erba reagents, Italy) e inclusi in paraffina (Lab-O-Wax, Histoline). Sezioni seriali dello spessore di 5 μ m sono state ottenute con microtomo rotativo (RM -2155, Leika) in un piano parallelo alla sutura sagittale. Le sezioni centrali sono state colorate con ematossilina-eosina per la valutazione istomorfometrica, mentre sezioni adiacenti sono stati utilizzati per le valutazioni di immunoistochimica. La regione di interesse (ROI) da analizzare è stata determinata identificando i margini laterali del difetto intraosseo e le adiacenti aree periostali superiore ed inferiore. La quantità di formazione di nuovo osso (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM) sono stati calcolati come outcomes primari. Le immagini sono state analizzate grazie ad un microscopio ottico binoculare (Nikon Eclipse 90i, Tokyo, Giappone) collegato a macchina fotografica digitale (DS-5M Nikon, Japan). I dati sono stati analizzati con l'ausilio del software 2.1 NIS-Elements AR (Nikon, Japan).

Immunoistochimica. L'analisi immunoistochimica è stata condotta con microscopia ottica e a fluorescenza. Per la valutazione dei capillari, i campioni sono stati incubati con anticorpi anti-von Willebrandt Factor (vWF, policlonale di coniglio, Dako, Danimarca, 1:30), colorati con perossidati coniugata con streptavidina usando DAB come cromogeno, ed infine colorati con ematossilina. Le sezioni sono state esaminate con microscopia ottica a 1000X di ingrandimento con l'ausilio di un reticolo oculare millimetrato. Un totale di 20 campi all'interno di ogni ROI sono stati analizzati per calcolare la il numero di capillari/mm² di tessuto.

Gli osteoblasti sono stati valutati con anticorpo anti-Osterix (OSX; policlonale di coniglio, Santa Cruz, USA; 1:50), rivelate da anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con FITC (01:20 60', 37°C, Jackson Laboratories, USA) e colorazione con anticorpo anti-Osteocalcina (OC; policlonale di coniglio, Santa Cruz, USA) rivelata da anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con TRITC (01:20, 60', 37°C, Jackson Laboratories, USA). L'espressione della Fosfatasi Alcalina (ALP) è stata valutata con anticorpo anti-ALP (monoclonale di topo, Santa Cruz, USA) rivelate da anticorpo secondario anti-topo coniugato con FITC (1:20, 60', 37°C, Jackson Laboratories, USA). L'apposizione di Collagene-1 (COL1A1) è stata valutata con anticorpo anti-COL1A1 (policlonale di topo, Santa Cruz, USA) Cruz, USA) rivelato da anticorpo secondario

anti-topo coniugato con FITC (1:20, 60', 37°C, Jackson Laboratories). La colorazione dei nuclei cellulari è stata eseguita con DAPI 5mM (Sigma Aldrich, USA). I vetrini sono stati montati con medium di fluorescenza, Vectashield (VECTOR, USA). Cellule co-positive per OSX/OC ed elementi positivi per ALP e sono stati quantificati a 1000X di ingrandimento con microscopia a fluorescenza (n/mm^2). La positività per COL1A1 è stata valutata in fluorescenza con metodica semi-quantitativa, utilizzando il seguente sistema di unità arbitrarie: nessuna espressione visibile (score=0), 1-3 positività/ mm^2 (score=1), 4-6 positività/ mm^2 (score=2).

Espressione genica. I campioni di 6 ratti sono stati raccolti in azoto liquido per analizzare l'espressione dei geni GAPDH, RUNX2, COL2A1, SP7, COL2A1, COL1A2, FN. L'RNA è stato isolato utilizzando il kit TRIzol Reagent (Life Technologies, USA), secondo istruzioni del produttore ed i campioni sono stati quindi retrotrascritti a cDNA (Reverse Transcription System, Promega, USA). Primers specifici sono stati disegnati con il software Primer-Blast (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA) e sono state eseguite sui campioni RT-PCR (Rotor Gene TM 3000 versione 5.0.06, Corbett Reaserch). In breve, i cDNA sono stati amplificati fino a 40 cicli in un mix composto da 2X Platinum SYBERGreen qPCRsupermix-UDG (Invitrogen, USA), 5 pM primers e acqua RNasi-free. Per ogni gene amplificato è stata verificata la curva di melting e i dati sono stati analizzati con il metodo della curva standard relativa [37]. I dati sono stati normalizzati relativamente al quantitativo di cDNA di ogni campione misurato con Oligreen Assay Kit (OliGreen ssDNA Quantitation Reagent and OliGreen ssDNA Quantitation Kit, Molecular Probes, USA).

Analisi statistica. La distribuzione gaussiana dei dati è stata verificata con il test di normalità D'Agostino-Aearson omnibus. L'omogeneità de pesi dei dischi di DBBM e l'efficienza del matching tra campioni del gruppo test e campioni del gruppo controllo è stata valutata con t-test per dati appaiati. Le differenze tra test e controllo per quanto riguarda i parametri morfometrici, immunoistochimici e l'espressione genica sono state valutate con t-test per dati appaiati con correzione di Welch. $p < 0.05$ è stat considerato come livello di significatività statistica. I risultati sono riportati come media \pm SEM.

Risultati

Preparazione del biomateriale. Il peso dei dischi di DBBM utilizzati nel gruppo test (14.00 ± 0.64), non è risultato significativamente diverso dal gruppo controllo (13.79 ± 0.59 , $p > 0.05$). L'accoppiamento tra i campioni di prova test e controlli ha mostrato di essere efficace ($p < 0.0001$), con coefficiente di correlazione $r=0.92$.

Procedure chirurgiche. La mortalità intraoperatoria è stata inferiore al 10%. 14 animali sono stati assegnati al periodo di guarigione di 1 mese, e 12 animali a 3 mesi. Dopo l'intervento chirurgico, un ratto è morto per infezione della ferita, mentre tutti gli altri animali hanno mantenuto buone condizioni di salute.

Istomorfometria. Gli innesti hanno mostrato una buona integrazione nei tessuti circostanti e non sono stati rilevati segni di reazione immuno-infiammatoria né a 1 mese né a 3 mesi. Nessuno dei difetti ha mostrato una completa guarigione ai tempi sperimentali testati. Tessuti e vasi neoformati sono stati osservati a diretto contatto con la superficie del DBBM innestato, confermando le proprietà di osteoconduttività del biomateriale utilizzato. NB era significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo a 1 mese di osservazione ($24.41\% \pm 4.14\%$ vs $15.01\% \pm 2.43\%$, $p < 0.05$), mentre questa differenza non era più rilevabile a 3 mesi ($27.36\% \pm 1.76\%$ vs $27.38\% \pm 2.92\%$, $p > 0.05$). FT presentava una tendenza ad essere minore nel test vs controllo, sia a 1 mese ($45.53\% \pm 4.95$ vs $54.21\% \pm 4.83$, $p > 0.05$) sia a 3 mesi ($46.19\% \pm 2.99\%$ vs $47.62\% \pm 3.44\%$, $p > 0.05$). Il DBBM residuo è risultato molto simile nel test vs controllo ad 1 mese ($29.16\% \pm 4.14\%$ vs $30.78\% \pm 4.15\%$, $p > 0.05$) e a 3 mesi ($24.99\% \pm 2.51\%$ vs $23.28\% \pm 6.78$, $p > 0.05$). Un aumento complessivo di NB è stato osservato nel tempo all'interno del gruppo di controllo, mentre nel gruppo test questo parametro non ha subito variazioni rilevanti nel tempo; ciò indica che nel gruppo controllo la deposizione di osso è proseguita in modo consistente da 1 a 3 mesi, mentre nel gruppo test la porzione principale di osso neoformato a 1 mese era già stato depresso. I risultati sono mostrati nella Figura 2. L'analisi del MAR ha rivelato una consistente attività di rimodellamento osseo ai giorni 23-24, significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo ($9.20 \mu m/day \pm 0.37 \mu m/day$ vs $6.50 \mu m/day \pm 1.09 \mu m/day$, $p < 0.05$) (Figura 3, A-C). A 3 mesi, l'apposizione minerale è risultata molto rallentata e di entità simile tra i gruppi sperimentali ($7.07 \mu m/day \pm 1.24 \mu m/day$ vs $7.92 \mu m/day \pm 1.51 \mu m/day$, $p > 0.05$) (Figura 3, D-F).

Figure 2.

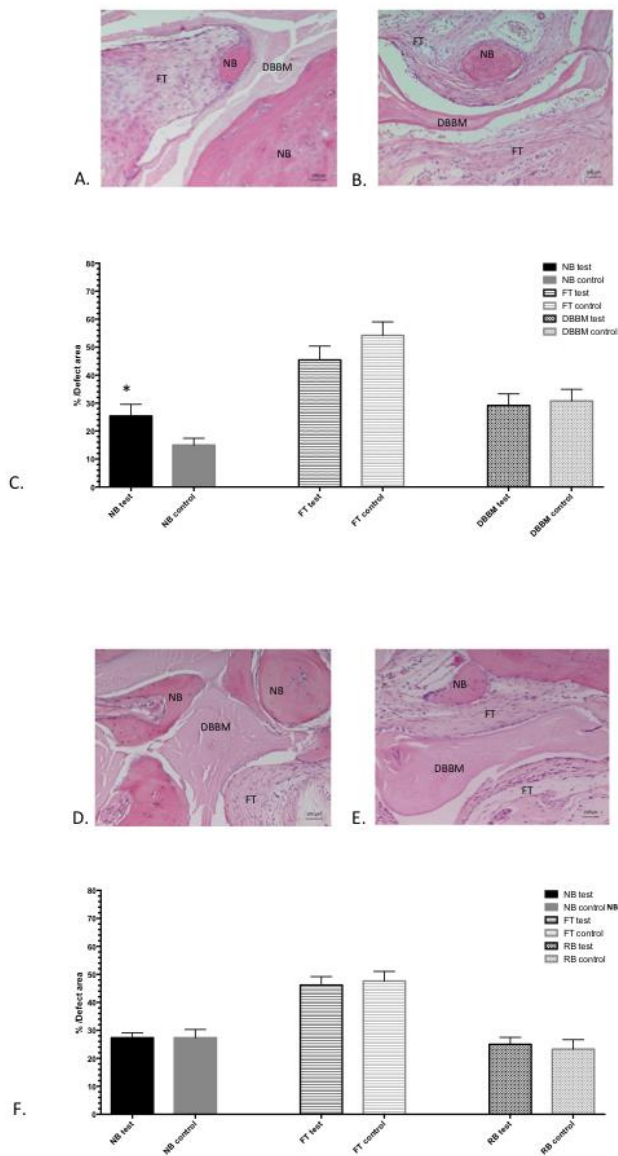


Figura 2. Valutazione istomorfometrica di osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM) in campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 mese (A-C) e a 3 mesi (D-F).

A-B; D-E. Aspetto istologico di un campione del gruppo test (A) e del gruppo controllo (B) a 1 mese; aspetto istologico di un campione del gruppo test (D) e del gruppo controllo a 3 mesi (E). Sono evidenziate con lettere corrispondenti aree di osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM). Colorazione con ematossilina eosina, microscopia ottica, ingrandimento originale 10X, scale bar 100 μ m.

C; F. Tabella che evidenzia i dati morfometrici di osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM) nei campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 mese (C) e a 3 mesi (F). I dati sono riportati come media \pm SEM ed espressi come percentuale rispetto alla ROI analizzata. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ($p > 0.05$).

Figure 3.

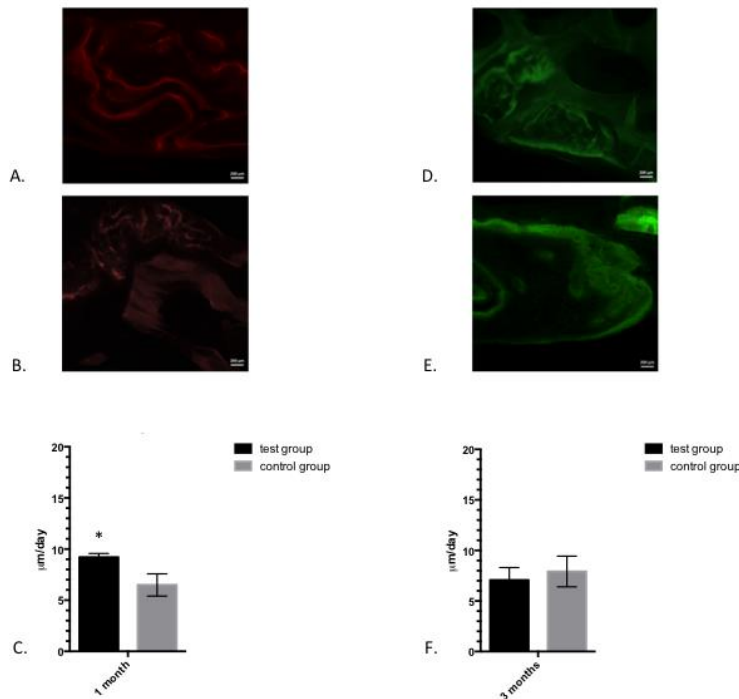


Figura 3. Valutazione del tasso di apposizione minerale (MAR) con le marcature fluorescenti Xylenol Orange (A-C) e Calcein Green (D-F).

A-B. Marcatura con Xylenol Orange che evidenzia consistenti aree di tessuto mineralizzato neoformato ai giorni 23-24 dall'intervento, sia nei campioni del gruppo test (A) sia in quelli del gruppo controllo (B). Microscopia a fluorescenza, ingrandimento originale 4X, scale bar 200 μm .

D-E. Marcatura con Calcein Green che evidenzia ampie zone di mineralizzazione ai giorni 80-84 dall'intervento compatibili con un rimodellamento osseo in corso sia nei campioni del gruppo test (D) sia in quelli del gruppo controllo (E). Microscopia a fluorescenza, ingrandimento originale 4X, scale bar 200 μm .

C; F. Tabella che riporta i valori del MAR in campioni del gruppo test e del gruppo controllo marcati con Xylenol Orange (C) e con Calcein Green (F). I dati sono riportati come media \pm SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ($p < 0.05$).

Immunohistochemical. La densità di capillari sanguigni del gruppo test non differiva dai controlli a 1 mese ($11.43 \text{ n/mm}^2 \pm 2.01 \text{ n/mm}^2$ vs $11.25 \text{ n/mm}^2 \pm 2.30 \text{ n/mm}^2$, $p > 0.05$), mentre a 3 mesi i campioni del gruppo test apparivano significativamente più vascolarizzati rispetto ai controlli ($28.26 \text{ n/mm}^2 \pm 5.62 \text{ n/mm}^2$ vs $9.84 \text{ n/mm}^2 \pm 2.01 \text{ n/mm}^2$, $p < 0.05$) (Figura 4). Elementi con co-positività per OSX/OC sono stati riscontrati in numero significativamente minore nel gruppo test vs controllo a 1 mese ($2.00 \text{ n/mm}^2 \pm 0.21 \text{ n/mm}^2$ vs $3.9 \text{ n/mm}^2 \pm 0.32 \text{ n/mm}^2$, $p < 0.05$), mentre un trend opposto è stato rilevato a 3 mesi ($2.05 \text{ n/mm}^2 \pm 0.27 \text{ n/mm}^2$ vs $1.01 \text{ n/mm}^2 \pm 0.20 \text{ n/mm}^2$, $p < 0.005$), dato principalmente legato ad una diminuzione delle positività nel gruppo controllo (Figura 5, A-B). Allo stesso modo, si è riscontrata una tendenza di ALP ad essere maggiormente espresso nel gruppo controllo a 1 mese ($8.83 \text{ n/mm}^2 \pm 3.80 \text{ n/mm}^2$ vs $12.14 \text{ n/mm}^2 \pm 6.29 \text{ n/mm}^2$, $p > 0.05$), mentre un trend opposto si è evidenziato a 3 mesi ($7.62 \text{ n/mm}^2 \pm 3.19 \text{ n/mm}^2$ vs $6.29 \text{ n/mm}^2 \pm 2.73 \text{ n/mm}^2$, $p > 0.05$) (Figura 5, C-D). L'analisi semi-quantitativa di COL1A1 ha rilevato maggiori positività nel gruppo controllo rispetto al test, ad entrambi i time-points (Figura 5, E-F).

Espressione genica. L'analisi dell'espressione genica ha permesso di rilevare variazioni di geni correlati al metabolismo cellulare, alla differenziazione osteogenica e all'attività di deposizione di matrice osteoide e connettivale. L'espressione di GAPDH, un enzima importante per il metabolismo energetico e la produzione di ATP e piruvato, è risultata significativamente maggiore nel test vs controllo a 1 mese (fold change test/control: 5.86 ± 3.52 , $p < 0.05$), mentre a 3 mesi non erano più riscontrabili differenze (fold change

test/control: 1.143 ± 0.62 , $p > 0.05$). Tale risultato può indicare un aumento del metabolismo cellulare ascrivibile all'effetto anabolico dello ST, evidente a 1 mese di osservazione, che scompare al time-point più prolungato. L'espressione significativamente maggiore osservato di RUNX2 nel gruppo test vs controllo a 1 mese (fold change test/control: 4.78 ± 2.36 , $p < 0.05$) depone per un commitment osteoblastico delle cellule, dato che questo gene è un fattore trascrizionale essenziale per il differenziamento a partire fine dalle prime fasi di commitment. Come per la GAPDH, a 3 mesi queste differenze di RUNX tra gruppo test e controllo non erano più osservabili (fold change test/control: 0.81 ± 0.36 , $p > 0.05$). Il pattern di espressione di SP7, un fattore trascrizionale osteo-specifico che collabora con RUNX2 al differenziamento osseo, era coerente con quella di RUNX2, con valori più alti riportati per i campioni test vs controlli a 1 mese (fold change test/control: 4.20 ± 3.23 , $p > 0.05$) e nessuna differenza tra i gruppi a 3 mesi (fold change test/control: 0.68 ± 0.29 , $p > 0.05$). E' stato interessante notare che l'espressione di COL2A1, un gene che codifica per un collagene tipico della cartilagine, era significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo 1 mese (fold change test/control: 5.52 ± 2.49 , $p < 0.05$): questa osservazione potrebbe indicare l'induzione di un'ossificazione di tipo encondrale nel gruppo test, sebbene istologicamente non si sia riscontrata la presenza di tessuto cartilagineo. A 3 mesi, le differenze nell'espressione di COL2A1 tra gruppi sperimentali non erano più rilevabili, outcome ascrivibile a una sostanziale riduzione dell'espressione di questo gene nei campioni del gruppo test (fold change test/control: 0.75 ± 0.27 , $p > 0.05$). I geni correlati all'apposizione di matrice fibrosa COL1A2 e FN si sono rivelati più espressi nel gruppo controllo vs test a 1 mese (COL1A2 fold change test/control: 0.01 ± 0.002 , $p < 0.05$; FN fold change test/control: 0.43 ± 0.64 , $p > 0.05$), mentre a 3 mesi, differenze di espressione tra gruppi non erano più osservabili (COL1A2 fold change test/control: 1.52 ± 1.29 , $p > 0.05$; FN fold change test/control: 0.64 ± 0.55 , $p > 0.05$), come è compatibile come una fase di guarigione più avanzata e stabilizzata. I dati di espressione genica sono riassunti nella Figura 6.

Figure 4.

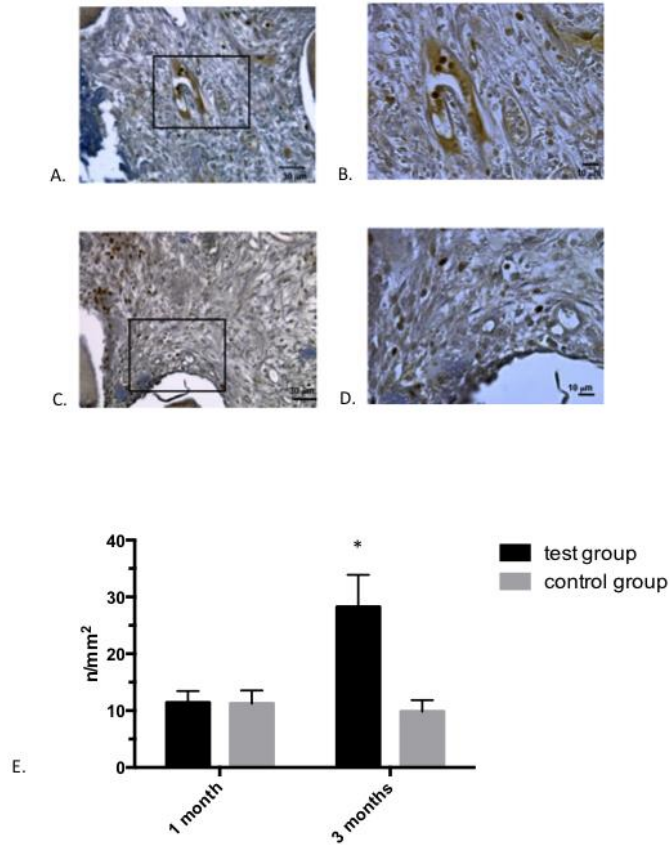


Figura 4. A-D. Capillari sanguigni riconoscibili dalla colorazione immunohistochimica marrone di FVIII rivelato da DAB in un campione del gruppo test (A-B) e del gruppo controllo (C-D) a 3 mesi. Microscopia ottica, ingrandimento originale 20X (A;C), 40X (B;D).

E. Tabella che riporta i valori di densità capillare nei campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 mese e a 3 mesi. I dati sono riportati come media \pm SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ($p > 0.05$).

Figure 5.

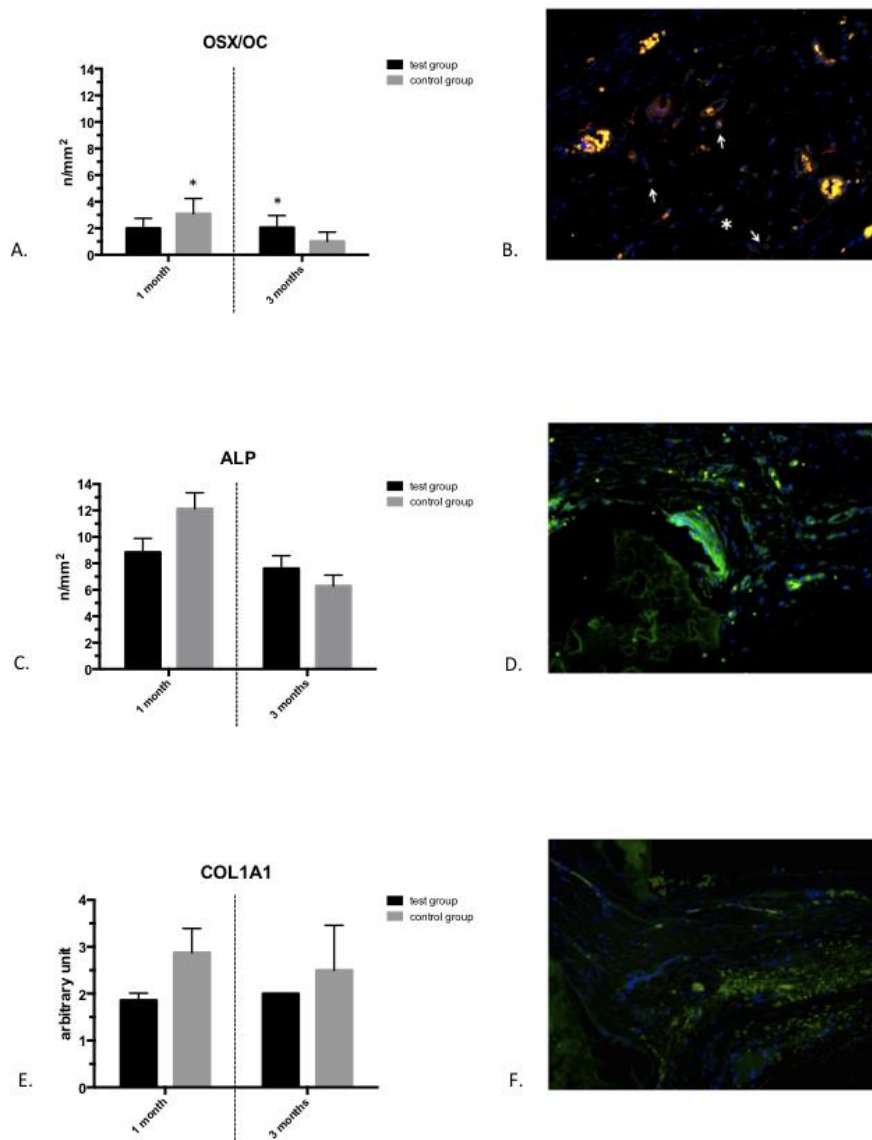


Figura 5. Quantificazione IHC e immagini microscopiche esemplificative a 3 mesi di elementi con co-positività per OSX/OC (A-B), positività per ALP (C-D), positività per COL1A1 (E-F). I dati sono riportati come media \pm SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ($p > 0.05$). La positività per OSX (B), ALP (D) e COL1A1 (F) è visualizzata con fluorescenza verde. La positività per OC (B) è visualizzata con fluorescenza rossa. La fluorescenza blu del DAPI (B, D, F) riconosce i nuclei cellulari. Le frecce bianche (B) indicano gli elementi con co-positività per OSX/OC. Microscopia a fluorescenza, ingrandimento originale 20X.

Figure 6.

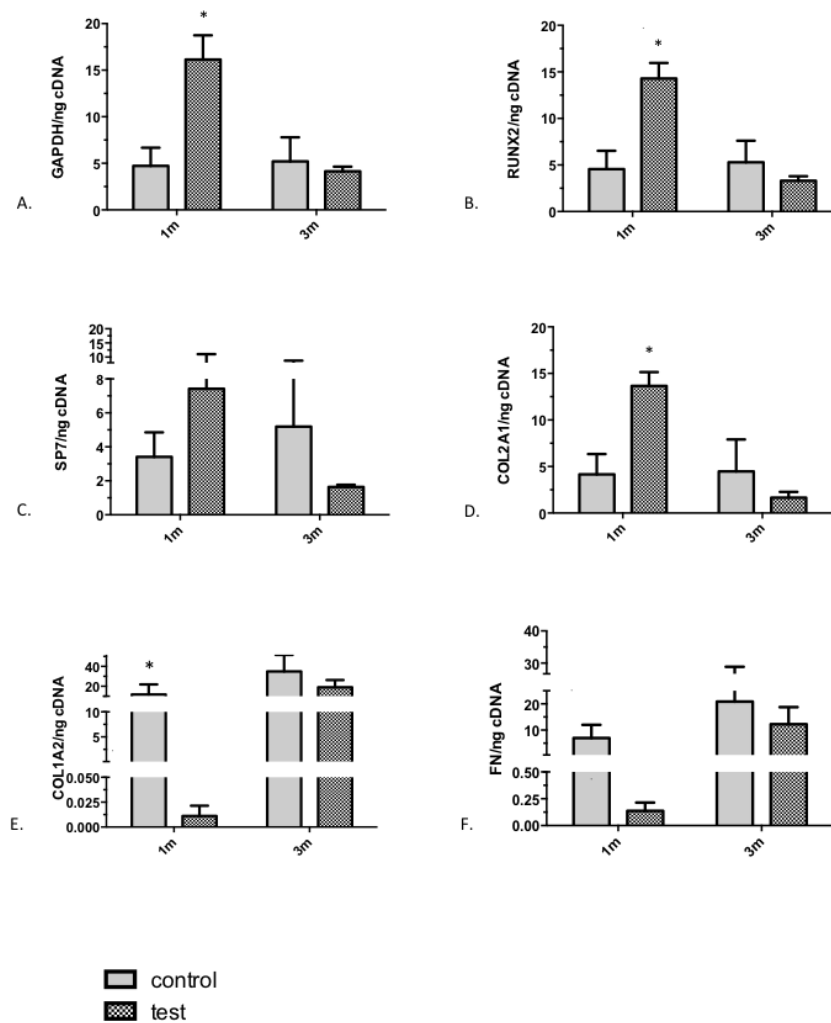


Figura 6. Valutazione con RT-PCR dell'espressione genica di GAPDH (A), RUNX2 (B), SP7 (C), COL2A1 (D), COL1A2 (E), FN (F) nei campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 e a 3 mesi. I dati sono normalizzati sul quantitativo relativo di cDNA in ogni campione e sono riportati come media \pm SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ($p < 0.05$).

Conclusioni

Questo studio ha permesso di rilevare l'efficacia della somministrazione locale di ST per promuovere la rigenerazione ossea *in vivo*. L'approccio di somministrazione locale utilizzato ha permesso di utilizzare basse dosi di ST in confronto a quelle utilizzate per via parenterale, e conseguentemente il rischio di effetti indesiderati è stato considerevolmente ridotto: precedenti studi di tossicità effettuati *in vivo* su modello di ratto hanno infatti riportato eventi avversi (tossicità epatica, ipertensione, ipertrofia cardiaca, comportamento aggressivo) in risposta a dosi di ST centinaia di volte superiori a quelle da noi impiegate [38] [39] [40] [41] [42].

La maggiore quantità di osso neoformato (NB) rilevato nei campioni del gruppo test vs controllo a 1 mese può essere infatti considerata indicativa di una stimolazione dell'osteogenesi indotta dal farmaco. Inoltre, l'elevato tasso di apposizione minerale (MAR) osservato nei campioni test a 1 mese ha rivelato la persistenza di un'attività di mineralizzazione della matrice a questo time-point [43]. È stata riportata in letteratura una regolazione positiva del metabolismo osseo mediata dallo ST, che aumenterebbe il rimodellamento osseo ed incrementerebbe la formazione ossea endocorticale [44]. L'analisi dell'espressione del gene GAPDH tramite RT-PCR ha supportato l'ipotesi di un aumento dell'attività metabolica cellulare come effetto dello ST a 1 mese. Allo stesso modo, la maggiore espressione di RUNX2 e SP7 nei campioni del gruppo test vs controllo ha mostrato evidenza di un commitment osteoblastico in corso, visto che questi geni sono essenziali fattori di trascrizione nel processo di transizione da cellule mesenchimali a condrociti e osteoblasti [45] [46]. Studi in animali hanno precedentemente dimostrato un'intensa espressione di RUNX2 e SP7 durante il processo di guarigione delle fratture sperimentalmente indotte [47]. L'espressione relativamente abbondante del gene COL2A1 nei campioni del gruppo test a 1 mese ha portato ad ipotizzare la presenza di una popolazione cellulare con caratteristiche condroblastiche, dato che questo gene codifica per una forma di collagene fibrillare tipica della cartilagine [48] [49]. Considerando anche che la sovraespressione di RUNX2 che abbiamo osservato nel gruppo test è stata precedentemente associata allo sviluppo di condrociti ipertrofici durante l'ossificazione endocranale [50] [51] e che l'aumento della GAPDH è stato correlato con uno shift metabolico indotto da ipossia durante la condrogenesi periostale e la formazione di osso endocranale [52], non possiamo escludere che nel nostro modello l'osteogenesi non sia avvenuta almeno in parte secondo questo meccanismo. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi indirizzati in modo specifico ad approfondire questa ipotesi. I campioni del gruppo controllo hanno mostrato evidenza di una più lenta integrazione dell'innesto a 1 mese, con NB e MAR significativamente inferiori rispetto al gruppo test ed elevata espressione di geni che contraddistinguono le fasi più precoci della guarigione delle fratture ossee e la deposizione di matrice connettivale fibrosa (i.e. COL1A2, FN) [53][54][55][56][57]. Le differenze morfometriche osservate ad 1 mese tra test vs controllo non sono risultate presenti a 3 mesi di osservazione; non possiamo escludere che a questo time-point lo ST sia stato completamente metabolizzato e conseguentemente rimosso dall'area del difetto. Stando a questa ipotesi, si potrebbe supporre che il fisiologico processo di guarigione della sede di innesto abbia portato la neoformazione ossea nel gruppo controllo ai livelli di quella del gruppo test. Alcune differenze tra test e controllo sono state rilevate quanto alla composizione dei tessuti neoformati: in particolare, i campioni del gruppo test hanno mostrato un progressivo incremento della densità capillare da 1 a 3 mesi, dato che evidenzia un tessuto vitale in attivo rimaneggiamento. D'altra parte, i campioni del gruppo controllo hanno presentato una densità capillare pressochè invariata nel tempo, suggerendo la presenza di un tessuto più stabilizzato. Similmente, la diminuzione delle positività IHC per OSX/OC e di ALP osservata nei campioni del gruppo controllo da 1 a 3 mesi potrebbe indicare una progressiva riduzione dell'osteogenesi a favore di una stabilizzazione cicatriziale della ferita chirurgica.

In conclusione, la somministrazione locale di ST ha migliorato la neoformazione ossea nella fase precoce di guarigione di difetti critici in calvaria di ratto. Stando ai nostri risultati, può anche essere ipotizzato un effetto più a lungo termine dello ST, che potrebbe mantenere attivo il rimodellamento tissutale, favorendo l'angiogenesi e riducendo la formazione di cicatrici. Ulteriori studi sono necessari per portare la somministrazione locale di androgeni nelle procedure cliniche di rigenerazione ossea.

Bibliografia

- [1] B. L. Clarke and S. Khosla, "Androgens and bone," *Steroids*, vol. 74, no. 3, pp. 296–305, Mar. 2009.
- [2] K. M. Wrenn, "Androgens and bone growth: it's location, location, location," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 5, no. 6, pp. 626–632, Dec. 2005.
- [3] R. Marcus, D. Leary, D. L. Schneider, E. Shane, M. Favus, and C. A. Quigley, "The contribution of

testosterone to skeletal development and maintenance: lessons from the androgen insensitivity syndrome,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 3, pp. 1032–1037, Mar. 2000.

[4] B. L. Riggs, S. Khosla, and L. J. Melton, “Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton,” *Endocr. Rev.*, vol. 23, no. 3, pp. 279–302, Jun. 2002.

[5] S. Kousteni, T. Bellido, L. I. Plotkin, C. A. O’Brien, D. L. Bodenner, L. Han, K. Han, G. B. DiGregorio, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, P. K. Roberson, R. S. Weinstein, R. L. Jilka, and S. C. Manolagas, “Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity,” *Cell*, vol. 104, no. 5, pp. 719–730, Mar. 2001.

[6] X. Chen, Y. Deng, Z. Zhou, Q. Tao, J. Zhu, X. Li, J. Chen, and J. Hou, “17beta-estradiol combined with testosterone promotes chicken osteoblast proliferation and differentiation by accelerating the cell cycle and inhibiting apoptosis in vitro,” *Vet. Res. Commun.*, vol. 34, no. 2, pp. 143–152, Feb. 2010.

[7] L. Wang, Y.-D. Wang, W.-J. Wang, Y. Zhu, and D.-J. Li, “Dehydroepiandrosterone improves murine osteoblast growth and bone tissue morphometry via mitogen-activated protein kinase signaling pathway independent of either androgen receptor or estrogen receptor,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 38, no. 4, pp. 467–479, Apr. 2007.

[8] C. H. Kasperk, J. E. Wergedal, J. R. Farley, T. A. Linkhart, R. T. Turner, and D. J. Baylink, “Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro,” *Endocrinology*, vol. 124, no. 3, pp. 1576–1578, Mar. 1989.

[9] D. J. Benz, M. R. Haussler, M. A. Thomas, B. Speelman, and B. S. Komm, “High-affinity androgen binding and androgenic regulation of alpha 1(I)-procollagen and transforming growth factor-beta steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells,” *Endocrinology*, vol. 128, no. 6, pp. 2723–2730, Jun. 1991.

[10] C. H. Kasperk, G. K. Wakley, T. Hierl, and R. Ziegler, “Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro,” *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 464–471, Mar. 1997.

[11] M. Takeuchi, H. Kakushi, and M. Tohkin, “Androgens directly stimulate mineralization and increase androgen receptors in human osteoblast-like osteosarcoma cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 204, no. 2, pp. 905–911, Oct. 1994.

[12] D. M. Huber, A. C. Bendixen, P. Pathrose, S. Srivastava, K. M. Dienger, N. K. Shevde, and J. W. Pike, “Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor,” *Endocrinology*, vol. 142, no. 9, pp. 3800–3808, Sep. 2001.

[13] L. Pederson, M. Kremer, J. Judd, D. Pascoe, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs, and M. J. Oursler, “Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 2, pp. 505–510, Jan. 1999.

[14] E. E. Joss, K. A. Zuppinger, and E. H. Sobel, “Effect of testosterone propionate and methyl testosterone on growth and skeletal maturation in rats,” *Endocrinology*, vol. 72, pp. 123–130, Jan. 1963.

[15] E. Howard, “Effects of steroids on epiphysiodiaphysial union in prepuberal mice,” *Endocrinology*, vol. 72, pp. 11–18, Jan. 1963.

[16] M. Gunness and E. Orwoll, “Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchietomy in mature rats,” *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 10, no. 11, pp. 1735–1744, Nov. 1995.

[17] L. Vandenput, J. V. Swinnen, S. Boonen, E. Van Herck, R. G. Erben, R. Bouillon, and D. Vanderschueren, “Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model,” *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 1462–1470, Sep. 2004.

[18] C. S. Wink and W. J. Felts, “Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 32, no. 1, pp. 77–82, 1980.

- [19] M. Verhas, A. Schoutens, M. L'hermite-Baleriaux, N. Dourov, A. Verschaeren, M. Mone, and A. Heilporn, "The effect of orchidectomy on bone metabolism in aging rats," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 39, no. 2, pp. 74–77, Aug. 1986.
- [20] R. G. Erben, J. Eberle, K. Stahr, and M. Goldberg, "Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 1085–1098, Jun. 2000.
- [21] G. K. Wakley, H. D. Schutte, K. S. Hannon, and R. T. Turner, "Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 325–330, Apr. 1991.
- [22] D. Vanderschueren, E. Van Herck, A. M. Suiker, W. J. Visser, L. P. Schot, and R. Bouillon, "Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency," *Endocrinology*, vol. 130, no. 5, pp. 2906–2916, May 1992.
- [23] J. H. Tobias, A. Gallagher, and T. J. Chambers, "5 alpha-Dihydrotestosterone partially restores cancellous bone volume in osteopenic ovariectomized rats," *Am. J. Physiol.*, vol. 267, no. 6 Pt 1, pp. E853–859, Dec. 1994.
- [24] V. Coxam, B. M. Bowman, M. Mecham, C. M. Roth, M. A. Miller, and S. C. Miller, "Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats," *Bone*, vol. 19, no. 2, pp. 107–114, Aug. 1996.
- [25] C. Martel, A. Sourla, G. Pelletier, C. Labrie, M. Fournier, S. Picard, S. Li, M. Stojanovic, and F. Labrie, "Predominant androgenic component in the stimulatory effect of dehydroepiandrosterone on bone mineral density in the rat," *J. Endocrinol.*, vol. 157, no. 3, pp. 433–442, Jun. 1998.
- [26] D. Vanderschueren, L. Vandenput, S. Boonen, E. Van Herck, J. V. Swinnen, and R. Bouillon, "An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement," *Endocrinology*, vol. 141, no. 5, pp. 1642–1647, May 2000.
- [27] V. Coxam, B. M. Bowman, M. Mecham, C. M. Roth, M. A. Miller, and S. C. Miller, "Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats," *Bone*, vol. 19, no. 2, pp. 107–114, Aug. 1996.
- [28] S. Bertelloni, G. I. Baroncelli, R. Battini, G. Perri, and G. Saggese, "Short-term effect of testosterone treatment on reduced bone density in boys with constitutional delay of puberty," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 10, no. 10, pp. 1488–1495, Oct. 1995.
- [29] A. M. Kenny, A. Kleppinger, K. Annis, M. Rathier, B. Browner, J. O. Judge, and D. McGee, "Effects of transdermal testosterone on bone and muscle in older men with low bioavailable testosterone levels, low bone mass, and physical frailty," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 58, no. 6, pp. 1134–1143, Jun. 2010.
- [30] C. Wang, R. S. Swerdloff, A. Iranmanesh, A. Dobs, P. J. Snyder, G. Cunningham, A. M. Matsumoto, T. Weber, and N. Berman, "Effects of transdermal testosterone gel on bone turnover markers and bone mineral density in hypogonadal men," *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 54, no. 6, pp. 739–750, Jun. 2001.
- [31] M. De Rosa, L. Paesano, V. Nuzzo, S. Zarrilli, A. Del Puente, P. Oriente, and G. Lupoli, "Bone mineral density and bone markers in hypogonadotropic and hypergonadotropic hypogonadal men after prolonged testosterone treatment," *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 24, no. 4, pp. 246–252, Apr. 2001.
- [32] R. Vaishnav, J. N. Beresford, J. A. Gallagher, and R. G. Russell, "Effects of the anabolic steroid stanozolol on cells derived from human bone," *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979, vol. 74, no. 5, pp. 455–460, May 1988.
- [33] J. Liao, T. Wu, Q. Li, B. Hu, L. Huang, Z. Li, L. Yuan, and S. Zhong, "Effects of stanozolol on bone mineral density and bone biomechanical properties of osteoporotic rats," *1 Jun Yi Xue Xue Bao Acad. J. First Med. Coll. PLA*, vol. 23, no. 11, pp. 1117–1120, Nov. 2003.
- [34] C. H. Chesnut, J. L. Ivey, H. E. Gruber, M. Matthews, W. B. Nelp, K. Sisom, and D. J. Baylink, "Stanozolol in postmenopausal osteoporosis: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action,"

Metabolism., vol. 32, no. 6, pp. 571–580, Jun. 1983.

[35] K. J. R. da Costa, J. J. Passos, A. D. M. Gomes, R. D. Sinisterra, C. R. M. Lanza, and M. E. Cortés, “Effect of testosterone incorporation on cell proliferation and differentiation for polymer-bioceramic composites,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 11, pp. 2751–2759, Nov. 2012.

[36] A. Spadari, N. Romagnoli, P. G. Predieri, P. Borghetti, A. M. Cantoni, and A. Corradi, “Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 94, no. 3, pp. 379–387, Jun. 2013.

[37] S. A. Bustin, “Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 25, no. 2, pp. 169–193, Oct. 2000.

[38] F. Matriciano, A. M. E. Modafferi, G. I. Togna, Y. Barone, G. Pinna, F. Nicoletti, and S. Scaccianoce, “Repeated anabolic androgenic steroid treatment causes antidepressant-reversible alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, BDNF levels and behavior,” *Neuropharmacology*, vol. 58, no. 7, pp. 1078–1084, Jun. 2010.

[39] M. Y. McGinnis, A. R. Lumia, M. E. Breuer, and B. Possidente, “Physical provocation potentiates aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids,” *Horm. Behav.*, vol. 41, no. 1, pp. 101–110, Feb. 2002.

[40] L. D. Boada, M. Zumbado, S. Torres, A. López, B. N. Díaz-Chico, J. J. Cabrera, and O. P. Luzardo, “Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats,” *Arch. Toxicol.*, vol. 73, no. 8–9, pp. 465–472, Nov. 1999.

[41] A. Beutel, C. T. Bergamaschi, and R. R. Campos, “Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 93, no. 1, pp. 43–48, Jan. 2005.

[42] S. Pieretti, M. Mastriota, P. Tucci, G. Battaglia, L. Trabace, F. Nicoletti, and S. Scaccianoce, “Brain nerve growth factor unbalance induced by anabolic androgenic steroids in rats,” *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 45, no. 1, pp. 29–35, Jan. 2013.

[43] D. J. Lee, R. Padilla, H. Zhang, W.-S. Hu, and C.-C. Ko, “Biological assessment of a calcium silicate incorporated hydroxyapatite-gelatin nanocomposite: a comparison to decellularized bone matrix,” *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 837524, 2014.

[44] M. N. Benéton, A. J. Yates, S. Rogers, E. V. McCloskey, and J. A. Kanis, “Stanozolol stimulates remodelling of trabecular bone and net formation of bone at the endocortical surface,” *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 81, no. 4, pp. 543–549, Oct. 1991.

[45] G. Karsenty, “Transcriptional control of skeletogenesis,” *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 9, pp. 183–196, 2008.

[46] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer, and B. de Crombrughe, “The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation,” *Cell*, vol. 108, no. 1, pp. 17–29, Jan. 2002.

[47] X. Li, H. Wang, E. Touma, E. Rousseau, R. J. Quigg, and J. T. Ryaby, “Genetic network and pathway analysis of differentially expressed proteins during critical cellular events in fracture repair,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 100, no. 2, pp. 527–543, Feb. 2007.

[48] J. F. Talts, A. Pfeifer, F. Hofmann, E. B. Hunziker, X. H. Zhou, A. Aszódi, and R. Fässler, “Endochondral ossification is dependent on the mechanical properties of cartilage tissue and on intracellular signals in chondrocytes,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 857, pp. 74–85, Oct. 1998.

[49] P. U. Rani, E. Stringa, R. Dharmavaram, D. Chatterjee, R. S. Tuan, and J. S. Khillan, “Restoration of normal bone development by human homologue of collagen type II (COL2A1) gene in Col2a1 null mice,” *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, vol. 214, no. 1, pp. 26–33, Jan. 1999.

[50] Y.-F. Dong, D. Y. Soung, E. M. Schwarz, R. J. O’Keefe, and H. Drissi, “Wnt induction of chondrocyte

hypertrophy through the Runx2 transcription factor,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 208, no. 1, pp. 77–86, Jul. 2006.

[51] H. Ding, T. Wang, D. Xu, B. Cha, J. Liu, and Y. Li, “Dexamethasone-induced apoptosis of osteocytic and osteoblastic cells is mediated by TAK1 activation,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Mar. 2015.

[52] P. J. Emans, F. Spaapen, D. A. M. Surtel, K. M. Reilly, A. Cremers, L. W. van Rhijn, S. K. Bulstra, J. W. Voncken, and R. Kuijjer, “A novel in vivo model to study endochondral bone formation; HIF-1alpha activation and BMP expression,” *Bone*, vol. 40, no. 2, pp. 409–418, Feb. 2007.

[53] K. S. Midwood, L. V. Williams, and J. E. Schwarzbauer, “Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 6, pp. 1031–1037, Jun. 2004.

[54] E. Oku, T. Kanaji, Y. Takata, K. Oshima, R. Seki, S. Morishige, R. Imamura, K. Ohtsubo, M. Hashiguchi, K. Osaki, K. Yakushiji, K. Yoshimoto, H. Ogata, H. Hamada, K. Izuhara, M. Sata, and T. Okamura, “Periostin and bone marrow fibrosis,” *Int. J. Hematol.*, vol. 88, no. 1, pp. 57–63, Jul. 2008.

[55] S. C. Heo, W. C. Shin, M. J. Lee, B. R. Kim, I. H. Jang, E.-J. Choi, J. S. Lee, and J. H. Kim, “Periostin accelerates bone healing mediated by human mesenchymal stem cell-embedded hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffold,” *PloS One*, vol. 10, no. 3, p. e0116698, 2015.

[56] D. S. Steinbrech, B. J. Mehrara, N. M. Rowe, M. E. Dudziak, J. S. Luchs, P. B. Saadeh, G. K. Gittes, and M. T. Longaker, “Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 105, no. 6, pp. 2028–2038, May 2000.

[57] S. Chujo, F. Shirasaki, S. Kawara, Y. Inagaki, T. Kinbara, M. Inaoki, M. Takigawa, and K. Takehara, “Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 203, no. 2, pp. 447–456, May 2005.

Riferimento

Giulia Ghiacci

E-mail: giulia.ghiacci@gmail.com