

L'ingegnerizzazione tissutale delle cellule paratiroidi

F. IOVINO, G. ARMANO, P.P. AURIEMMA, R. SERGIO, G. DE SENA, V. CAPUOZZO,
F. ROSSO, G. MARINO, F. PAPALE, A. GRIMALDI, A. BARBARISI

RIASSUNTO: L'ingegnerizzazione tissutale delle cellule paratiroidi.

F. IOVINO, G. ARMANO, P.P. AURIEMMA, R. SERGIO, G. DE SENA, V. CAPUOZZO, F. ROSSO, G. MARINO, F. PAPALE, A. GRIMALDI, A. BARBARISI

Background. *L'ipoparatiroidismo postchirurgico rappresenta un'evenienza tutt'altro che rara dopo intervento di tiroidectomia totale e/o paratiroidectomia totale. I tentativi di trapiantare tessuto paratiroidico sono iniziati nel 1975 con Wells ed i risultati ancora oggi sono alquanto deludenti. Negli ultimi anni grazie a tecniche di ingegneria tissutale si cerca di costruire paratiroidi artificiali, capaci di secernere paratormone, disponibili per il trapianto in pazienti affetti da ipoparatiroidismo iatrogeno.*

Pazienti e metodi. *I paratiroidi sono stati ottenuti da paratiroidi di tre pazienti, uremici cronici in emodialisi, operati per iperparatiroidismo secondario. Le colture cellulari ottenute in RPMI sono state successivamente seminate sugli scaffold di collagene (supporti tridimensionali a lenta biodegradazione). Il collagene rappresenta la componente maggioritaria della matrice extracellulare e quindi costituisce un buon substrato su cui le cellule aderiscono e crescono. I terreni di coltura adeguatamente supplementati contenevano bassa concentrazione di calcio e quindi stimolavano in maniera fisiologica i paratiroidi a produrre paratormone in maniera costante. Le colture cellulari sono state osservate in microscopia ottica ed in ESEM e sono state sottoposte al test di vitalità MTT fino alla decima settimana. Inoltre è stata misurata la concentrazione di paratormone nel liquido colturale a varie settimane.*

Risultati. *Dopo 24 ore di coltura in RPMI le cellule estratte dalle paratiroidi umane erano quasi tutte adese e raggruppate in clusters tra di loro, a ricordare l'organizzazione ghiandolare. La popolazione cellulare era costituita prevalentemente da paratiroidi (90-95%). Seminate sugli scaffold collagenici, a 10 settimane le cellule mantengono una morfologia epithelial-like, arrivando a colonizzare la superficie dello scaffold, conservano una buona progressione proliferativa, associata alla produzione di paratormone.*

Conclusioni. *La scelta di utilizzare paratiroidi di pazienti affetti da iperparatiroidismo secondario ha certamente contribuito ad otte-*

SUMMARY: Tissue engineering of parathyroid gland.

F. IOVINO, G. ARMANO, P.P. AURIEMMA, R. SERGIO, G. DE SENA, V. CAPUOZZO, F. ROSSO, G. MARINO, F. PAPALE, A. GRIMALDI, A. BARBARISI

Background. *The postoperative hypoparathyroidism is a not rare complication after total thyroidectomy and/or total parathyroidectomy. Attempts to transplant parathyroid tissue began in 1975 with the work of Wells, but still today results are disappointing. However, with the development of tissue engineering techniques, some experimental approaches to build artificial parathyroid are being made. Bioengineered devices, actively secreting PTH, for transplant in patients with iatrogenic hypoparathyroidism is unavailable.*

Patients and methods. *Parathyroid cells were obtained from three chronic uremic patients in hemodialysis, operated for secondary hyperparathyroidism. Cell cultures in RPMI medium were subsequently seeded on collagen scaffold (three-dimensional matrix with slow biodegradation). Collagen is the major component of the extracellular matrix and thus is a good substrate for cell adhesion and growth. Culture media, with a low calcium concentration, were optimized to physiologically stimulate parathyroid hormone secretion. Cell cultures were morphologically observed in optical and electron (ESEM) microscopy and metabolically assayed by MTT method until the tenth week. Besides, concentration of parathyroid hormone in the culture medium has been measured for several weeks.*

Results. *After 24 hours of culture in RPMI, cells extracted from human parathyroid glands were nearly all adherent and organized in clusters to resemble the glandular organization. The cellular population consisted predominantly of parathyroid cells (90-95%). On collagen scaffolds, cells maintain an epithelial-like morphology also after 10 weeks, colonizing the scaffold surface and keeping a good proliferative rate with a discrete production of parathyroid hormone.*

Conclusion. *The use of parathyroid cells extracted from patients with secondary hyperparathyroidism was certainly an appropriate choice that enabled us to achieve these results, that albeit partial bode well for the experimental in vivo animal model. The bioengineered scaffolds when implanted in the subcutaneous can avoid the dispersion of pa-*

Seconda Università degli Studi di Napoli
Dipartimento di Scienze Anestesiologiche,
Chirurgiche e dell'Emergenza
(Direttore: Prof. A. Barbarisi)

Relazione presentata in occasione del "XXIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Endocrinologia"
Palermo, 24-26 giugno 2010

© Copyright 2010, CIC Edizioni Internazionali, Roma

nera questi risultati, che, seppur parziali ed in vitro, vanno sperimentati in vivo su modello animale. Il costrutto bioingegnerizzato in scaffold impiantabile nel sottocutaneo può evitare la temuta dispersione delle cellule paratiroidi impiantate e dunque favorire la loro agevole rimozione in caso di complicanze. La nostra ricerca ha avuto come obiettivi innanzitutto la realizzazione di colture cellulari di paratiroidi umani e successivamente la ingegnerizzazione in vitro di paratiroidi umane all'interno di scaffold tridimensionali collagenici.

rathyroid cells, assuring also the possibility to easily remove the implant in case of complications. Our research was aimed primarily to the optimisation of PTH secreting human parathyroid cells cultures and then to the in vitro engineering of human parathyroid glands in three-dimensional collagen scaffolds.

KEY WORDS: Trapianto paratiroidi - Ingegnerizzazione tissutale.
Parathyroid tissue transplantation - Tissue engineering.

Introduzione

La prima descrizione di trapianto paratiroideo nell'uomo risale al 1975, anni in cui Wells pubblicò un suo studio (2). L'ipoparatiroidismo dopo tiroidectomia totale o paratiroidectomia totale può essere prevenuto con l'autotrapianto ortotopico o ectopico del tessuto paratiroideo asportato. L'autotrapianto ortotopico prevede il reimpianto delle paratiroidi nel muscolo sternocleidomastoideo omolaterale, mentre quello ectopico prevede il reimpianto nel tessuto sottocutaneo o nel muscolo brachioradiale dell'avambraccio non dominante o in quello non interessato dalla fistola arterovenosa nei pazienti sottoposti a trattamento dialitico. Il tessuto paratiroideo da trapiantare viene prima "frammentato" e poi marcato con una clip metallica o con un filo non riassorbibile per un facile reperaggio nella sede dell'impianto qualora si sviluppasse patologia a carico del tessuto trapiantato. Nei casi in cui l'autotrapianto non è immediato il tessuto può essere crioconservato. Purtroppo dopo autotrapianto le percentuali di ripresa della funzionalità paratiroidea sono deludenti ed oscillano tra il 15% ed il 30% nelle varie casistiche (1). Gli insuccessi sono sostanzialmente dovuti alla necrosi delle cellule trapiantate per trauma meccanico eccessivo durante la fase di sminuzzamento del tessuto paratiroideo oppure per mancata vascolarizzazione dell'impianto (2, 3). Il trapianto ectopico da alcuni chirurghi è preferito in quanto consente una più semplice rimozione in caso di complicanze (4, 5). Le limitazioni attuali dell'autotrapianto ortotopico o ectopico di tessuto paratiroideo possono essere affrontate dall'ingegneria tissutale, che si avvale dei principi della scienza della vita e dell'ingegneria per realizzare sostituti biologici contenenti cellule viventi e funzionali per la rigenerazione, il mantenimento o il miglioramento delle prestazioni dei tessuti. Infatti nelle ultime decadi si sta cercando di costruire delle paratiroidi artificiali per risolvere l'ipoparatiroidismo postchirurgico. Le tecniche utilizzate seguono due vie differenti:

a) *in vitro*: la progettazione e la crescita dei tessuti av-

viene al di fuori del corpo e solo in un secondo momento si passa all'impianto dei tessuti artificiali sui tessuti danneggiati; tipico esempio è l'uso di cute "coltivata" per il trattamento di pazienti affetti da gravi ustioni o da ulcere diabetiche;

b) *in vivo*: tecnica che consiste nell'isolamento delle cellule dall'ambiente biologico naturale, nella semina di queste su scaffold e infine nell'impianto di questo sistema nel corpo del paziente.

Per scaffold si intende un supporto poroso tridimensionale realizzato in un materiale biocompatibile e biodegradabile sul quale far avvenire l'adesione iniziale delle cellule e la successiva ricrescita fino a formazione del tessuto. Durante la produzione della matrice extracellulare da parte delle cellule lo scaffold tende a biodegradarsi e a farsi sostituire dal tessuto biologico rigenerato.

L'ipotesi della nostra ricerca era di realizzare colture cellulari di paratiroidi umani ed ingegnerizzare in vitro delle paratiroidi artificiali all'interno di scaffolds collagenici (già sperimentati e collaudati nell'uomo per la rigenerazione dermica).

Pazienti e metodi

La prima fase della ricerca è stata incentrata sull'ottimizzazione del metodo di estrazione ed amplificazione in vitro dei paratiroidi umani. I campioni chirurgici provenivano da tre pazienti uremici cronici, in emodialisi, sottoposti a paratiroidectomia totale per iperparatiroidismo secondario. Il tessuto paratiroideo asportato è stato processato enzimaticamente per disgregare la struttura delle ghiandole e facilitare la fuoriuscita dei paratiroidi e la sospensione è stata centrifugata a 800 g. Il pellet risultante è stato lavato con RPMI e risospeso in un mezzo integrato (RPMI 1640 con 10% di siero fetale bovino, 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomina, e 2 mM L-glutamina). La quantità di cellule vitali è stata determinata con il test del trypan blu. Le colture proliferanti sono state mantenute in fiasche da 75 cm² e incubate in atmosfera umidificata 95% aria e 5% CO₂ a 37°C.

Dopo circa 15 giorni, la coltura è giunta a subconfluenza e le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione, lavate con PBS e risospese in mezzo integrato e ripiastrate alla densità di 1x10⁴ cm².

Le colture ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico (microscopia ottica ed elettronica, ESEM) e da un punto di vista funzionale (produzione di paratormone). La seconda fase ha riguardato la semina delle popolazioni di paratireociti su scaffolds collagenici (Integra, SIAD) ed anche in questa fase le cellule seminate sono state caratterizzate da un punto di vista sia morfologico che funzionale.

La vitalità e la proliferazione cellulare è stata valutata con il WST-8 test messo a punto dalla Dojindo (Japan), variante del metodo MTT (Mitochondrial Tetrazolium salt Test). Il dosaggio del paratormone è stato effettuato su aliquote dei terreni di coltura dei paratireociti a vari tempi di crescita. I valori di PTH nei brodi di coltura cellulare sono stati normalizzati rispetto al numero di cellule in coltura, ricorrendo alla valutazione delle proteine totali mediante il saggio Bio-rad. Esperimenti di variazione nella produzione di PTH in funzione del calcio extracellulare sono stati effettuati incubando le popolazioni cellulari in terreni di coltura sia a basso (0,5 mM) che ad alto contenuto di calcio (2,0 mM).

Risultati

Dopo 24 ore di coltura in RPMI supplementato, le cellule estratte dalle paratiroidi umane erano quasi tutte adese, molte di esse raggruppate in clusters che ricordavano l'organizzazione ghiandolare. Erano presenti due popolazioni cellulari: una a morfologia epithelial-like predominante (i paratireociti, circa 90-95%) ed una endothelial-like (cellule dell'endotelio vasale, 5-10%). Questi dati dimostrano che le nostre condizioni estrattive generano una co-cultura composta da paratireociti e cellule dell'endotelio vasale. Per quanto riguarda la morfologia delle cellule seminate sulle matrici collageniche tridimensionali, dopo 10 settimane di incubazione mantengono ancora una morfologia epithelial-like, arrivando a colonizzare completamente la superficie dello scaffold.

Il test MTT Wst-8 è stato effettuato sia sulle colture bidimensionali (flasca) che su quelle tridimensionali (Integra). La Figura 1 mostra la vitalità/proliferazione delle cellule estratte a vari tempi di coltura. In particolare la co-cultura in piastra evidenzia un buon livello di progressione proliferativa nel range temporale da 0 a 10 settimane, dimostrando che anche dopo 10 settimane di coltura le cellule sono ancora vitali. La Figura 2 mostra la vitalità/proliferazione delle cellule pilastrate sulle matrici collageniche tridimensionali (Integra) a vari tempi. In particolare, anche dopo 10 settimane di incubazione le cellule conservano anche in ambiente 3D una buona progressione proliferativa. L'andamento della produzione di PTH nelle colture bidimensionali è regolato dalla concentrazione di calcio nel terreno. È stato osservato che a basse concentrazioni di calcio i paratireociti conservano la capacità di secernere il PTH con un andamento abbastanza costante nel tempo. Tuttavia verso la 10 settimana di coltura si evidenzia una leggera tendenza alla diminuzione della produzione di PTH. In presenza di elevate concentrazioni di calcio la secrezione del PTH si riduce notevolmente nel tempo fino ad azzerarsi com-

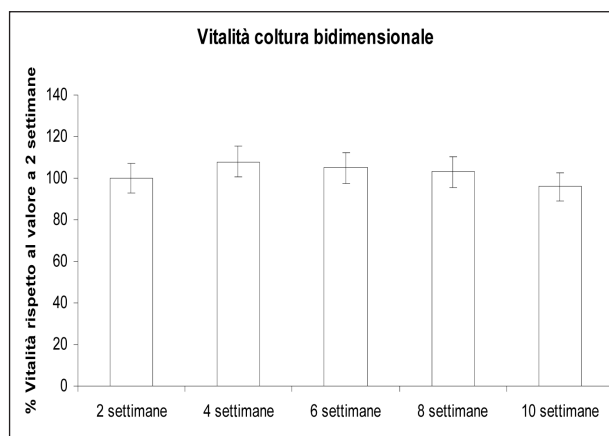


Fig. 1 - Grafico vitalità/proliferazione cellulare delle colture bidimensionali (flasca).

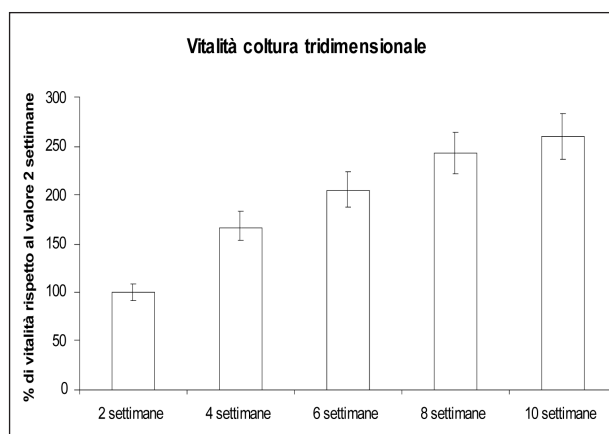


Fig. 2 - Grafico vitalità/proliferazione cellulare delle colture tridimensionali (scaffold collagenico, Integra).

pletamente tra l'ottava e la decima settimana (Fig. 3). Tali risultati sono stati confermati anche nelle colture tridimensionali (Fig. 4).

Discussione e conclusioni

La scelta di uno scaffold tridimensionale a base di collagene bovino è stata di fondamentale importanza nello sviluppo di questo studio sperimentale per le seguenti ragioni:

- il collagene rappresenta la componente maggioritaria della matrice extracellulare e, come ampiamente noto, è un substrato sul quale le cellule epiteliali crescono appropriatamente;
- la matrice tridimensionale Integra della SIAD è stata ampiamente testata nella rigenerazione dei tessuti dermici umani in numerosi applicazioni cliniche;

La matrice una volta impiantata ha una bassa velocità di biodegradazione riuscendo a rimanere nel sito di im-

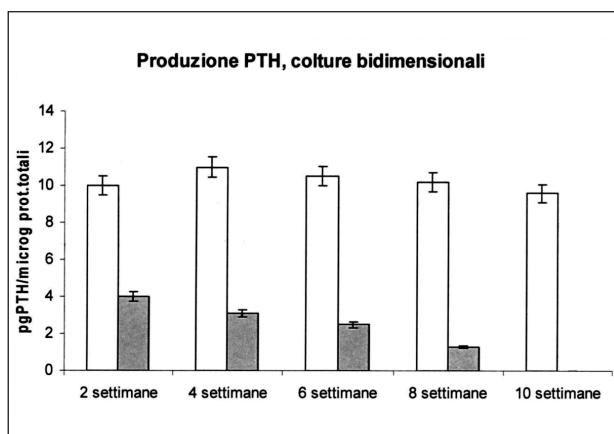


Fig. 3 - Produzione di PTH in colture bidimensionali. Le barre bianche si riferiscono ai paratiroidi umani coltivati in RPMI supplementato con 0.5 mM di calcio. Le barre grigie si riferiscono ai paratiroidi umani coltivati in RPMI supplementato con 2.0 mM di calcio. Dati normalizzati rispetto alla quantità di cellule in coltura.

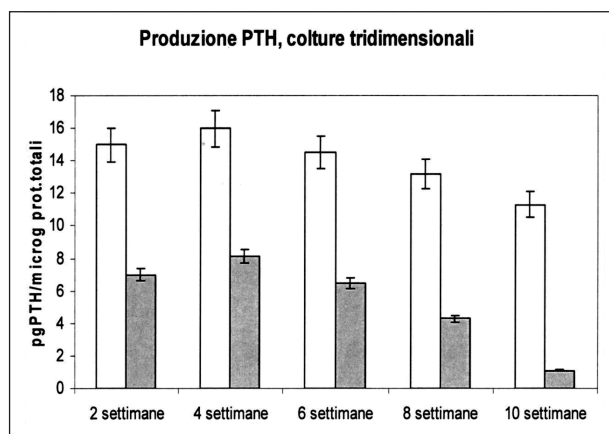


Fig. 4 - Produzione di PTH in colture tridimensionali. Le barre bianche si riferiscono ai paratiroidi umani coltivati in RPMI supplementato con 0.5 mM di calcio. Le barre grigie si riferiscono ai paratiroidi umani coltivati in RPMI supplementato con 2.0 mM di calcio. Dati normalizzati rispetto alla quantità di cellule in coltura.

pianto anche per 5-6 mesi, senza originare reazioni da corpo estraneo né formazioni di capsula fibrotica che potrebbe isolare metabolicamente l'impianto. Infine evita la temuta dispersione delle cellule impiantate e permette un'agevole rimozione in caso di complicanze.

Insieme dei dati ottenuti dimostrano che è possibile sviluppare una coltura di paratiroidi umani su matrici collagene tridimensionali in grado di mantenere una discreta spinta proliferativa associata alla capacità di produrre PTH fino a 10 settimane. Ancora più interessante è la capacità del sistema di rispondere allo stimolo fisiologico (Ca^{++} extracellulare) modulando la produzione dell'ormone stesso in funzione dello stimolo.

Confrontando i nostri dati in termini di vitalità cellulare e produzione di PTH con quelli di altri lavori presenti in letteratura (6-8), si evince che in passato è sta-

to un grosso problema individuare condizioni colturali in grado di soddisfare questi due parametri. Probabilmente la scelta del terreno RPMI, ricco in fosfati, associato alla presenza di cellule dell'endotelio vasale nella coltura hanno stimolato la capacità proliferativa dei paratiroidi umani e mantenuta la fisiologica funzione di produzione del PTH. Senza dubbio anche la scelta di estrarre i paratiroidi da pazienti affetti da iperparatiroidismo secondario ha notevolmente contribuito all'ottenimento di questo risultato.

Questi risultati, sebbene parziali e riferiti ad un modello "in vitro", ci incoraggiano per un avanzamento dello studio verso la sperimentazione "in vivo" su modelli animali per poi poter realizzare nel futuro delle paratiroidi artificiali disponibili per il trapianto in pazienti affetti da ipoparatiroidismo iatrogeno.

Bibliografia

- Güller U, Schönholzer C, Martinoli S. Recurrent hyperparathyroidism in kidney failure patients after total parathyroidectomy and autotransplantation. Case report and review of the literature]. *Swiss Surg.* 2000;6(4):179-81.
- Chapelle T, Meuris K, Roeyen G, De Greef K, Van Beeumen G, Bosmans JL, Ysebaert D. Simultaneous kidney-parathyroid allotransplantation from a single donor after 20 years of tetany: a case report. *Transplant Proc.* 2009 Mar;41(2):599-600.
- Wells SA Jr, Gunnells JC, Gutman RA, Shelburne JD, Schneider AB, Sherwood LM. The successful transplantation of frozen parathyroid tissue in man. *Surgery.* 1977 Jan;81(1):86-90.
- Ross AJ 3rd, Dale JK, Gunnells JC, Wells SA Jr. Parathyroid transplantation: fate of a long-term allograft in man. *Surgery.* 1979 Apr;85(4):382-4.
- Echenique-Elizondo M, Amondarain JA, Vidaur F, Olalla C, Arribe F, Garrido A, Molina J, Rodrigo MT. Parathyroid subcutaneous pre-sternal transplantation after parathyroidectomy for renal hyperparathyroidism. Long-term graft function. *World J Surg.* 2007 Jul;31(7):1403-9. Epub 2007 May 22.
- Sakaguchi K, Santora A, Zimring M, Curcio F, Aurbach GD, Brandi ML. Functional epithelial cell line cloned from rat parathyroid glands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987;84:3269-3273.
- Valimaki S, Hoog A, Larsson C, Farnebo LO, Branstrom R. High Extracellular Ca Hyperpolarizes Human Parathyroid Cells via Ca-activated K Channels. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2003;278, No. 50, pp. 49685-49690.
- MC Roussanne, J Gogusev, B Hory, P Duchambon, JC Souberbille, B Nabarra, D Pierrat, E Sarfati, TD Eke, AS Bourdeau. Persistence of Ca²⁺-Sensing Receptor Expression in Functionally Active, Long-Term Human Parathyroid Cell Cultures. *J Bone Miner Res* 1998;13:354-362.