



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MORFOLOGICHE,

FISIOLOGICHE E DELLO SPORT

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE PER LA SALUTE

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE MORFOLOGICHE

XXV CICLO

**ANALISI MORFOLOGICA DELLA MUCOSA ORALE
CHERATINIZZATA UMANA NORMALE DOPO
ESPOSIZIONE A STIMOLI ESOGENI**

BIO/16

Tutor: Prof.ssa Elena Bianca Donetti

Coordinatore: Prof.ssa Laura Vizzotto

Dott.ssa Alice Gualerzi

Matricola: R08703

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

ABSTRACT	4
INTRODUZIONE.....	5
MUCOSA ORALE UMANA.....	5
<i>Anatomia della cavità orale</i>	<i>5</i>
<i>Anatomia microscopica della mucosa orale</i>	<i>7</i>
<i>Differenziazione terminale nell'epitelio orale.....</i>	<i>11</i>
<i>Adesione intercellulare nell'epitelio orale</i>	<i>17</i>
MODELLI SPERIMENTALI PER LO STUDIO DELLA MUCOSA ORALE UMANA	24
FUMO DI SIGARETTA	27
<i>Composizione del fumo di sigaretta</i>	<i>27</i>
<i>Evidenze cliniche: patologie del cavo orale legate all'abitudine al fumo</i>	<i>30</i>
<i>Evidenze sperimentali: fumo di sigaretta e cellule epiteliali</i>	<i>32</i>
ALENDRONATO DI SODIO	34
<i>Chimica e farmacodinamica dei bifosfonati.....</i>	<i>34</i>
<i>Evidenze cliniche: osteonecrosi delle ossa mascellari indotta da bifosfonati</i>	<i>37</i>
<i>Evidenze sperimentali: bifosfonati e cellule epiteliali.....</i>	<i>39</i>
SCOPO DEL LAVORO	41

FUMO DI SIGARETTA	42
METODI.....	44
<i>Esposizione cronica al fumo di sigaretta</i>	<i>44</i>
<i>Esposizione acuta al fumo di sigaretta.....</i>	<i>44</i>
<i>Processazione e analisi morfologica dei campioni</i>	<i>45</i>
RISULTATI	49
<i>Esposizione cronica al fumo di sigaretta</i>	<i>49</i>
<i>Esposizione acuta al fumo di sigaretta.....</i>	<i>57</i>
DISCUSSIONE.....	64
ALENDRONATO DI SODIO.....	67
METODI.....	68
RISULTATI	70
DISCUSSIONE.....	80
CONCLUSIONI.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	85
APPENDICE A	95
RINGRAZIAMENTI.....	103

ABSTRACT

Cigarette smoke and alendronate are two different exogenous stimuli involved in the pathogenesis of oral diseases, but their actual role in altering the epithelial barrier and function has not been thoroughly investigated, yet.

To evaluate the morphological chronic effect of both agents, biopsies of normal human keratinized oral mucosa are collected respectively from smoking women (n = 5) and from osteoporotic women undergoing chronic oral therapy with alendronate (n = 6). Both groups are compared to age and sex-matched controls. The acute effects of smoke are investigated in a three-dimensional model of human oral mucosa organotypic cultures (n = 5) after exposure to the mainstream smoke coming from one single cigarette. Morphological analysis by light and transmission electron microscopy is performed on all considered samples.

Chronic smoke and chronic alendronate treatment affect keratinocyte terminal differentiation and intercellular adhesion impairing desmosomal molecular composition and morphology, in a stress specific and time exposure related manner. Desmoglein 3 and desmoglein 1 distribution are altered respectively after chronic smoke and chronic alendronate treatment. Epithelial proliferation is also impaired in the alendronate treated group. On the contrary, after three hours from cigarette smoke exposure, the first significant response of the oral epithelium comes from the immediately suprabasal keratinocytes, without impairment of the epithelial junctional apparatus and apoptosis induction.

The collected data highlight differences in the acute and chronic response of the oral epithelium to cigarette smoke. Moreover, reported results support the crucial signaling role of desmosomal cadherins in the oral epithelium and introduce a new issue in oral biology: the specific response of human oral mucosa to different physico-chemical stresses.

INTRODUZIONE

MUCOSA ORALE UMANA

Anatomia della cavità orale

La cavità orale è la prima parte del canale alimentare ed è costituita dal vestibolo della bocca, delimitato anteriormente dalle labbra, lateralmente dalle guance e posteriormente dalla faccia posteriore dell'arcata alveolodentale, e dalla cavità orale propriamente detta, più ampia e situata fra il vestibolo della bocca e l'istmo delle fauci (Figura 1).

Il vestibolo della bocca risulta delimitato superiormente e inferiormente dai solchi vestibolari superiore e inferiore, lungo la linea di riflessione della mucosa delle guance e delle labbra nella gengiva (o mucosa alveolare). La cavità vestibolare comunica all'esterno attraverso la rima buccale ed è uno spazio virtuale quando i denti delle arcate superiore e inferiore sono a contatto, mentre diviene spazio reale con il movimento di labbra e guance. A livello della cavità vestibolare sfociano i dotti delle ghiandole salivari minori accolte nella tonaca mucosa della cavità orale e il dotto di Stenone delle ghiandole parotidi (Anastasi et al., 2012).

La cavità orale propriamente detta si presenta come una cavità ovoidale con l'asse maggiore a direzione antero-posteriore, più slargata posteriormente. È delimitata anteriormente dalla faccia posteriore delle arcate alveolodentali e lateralmente dalle guance. Posteriormente si continua con la faringe in corrispondenza dell'istmo delle fauci e del palato molle. Il palato duro ne costituisce la volta (Standring, 2009).

La cavità orale presenta una struttura a tonache sovrapposte, con la tonaca mucosa di rivestimento più luminale poggiante su una tonaca sottomucosa connettivale seguita da tessuto muscolare o osseo. Per la particolare struttura e funzione della cavità orale, l'identificazione di un confine netto fra tonaca mucosa di rivestimento e tessuti sottostanti è in generale piuttosto difficoltosa e la proporzione fra le varie tonache può variare notevolmente tra diverse aree della cavità in base al tipo di sollecitazioni a cui una regione è sottoposta.

La tonaca sottomucosa è presente nelle zone della cavità in cui è necessaria flessibilità fra

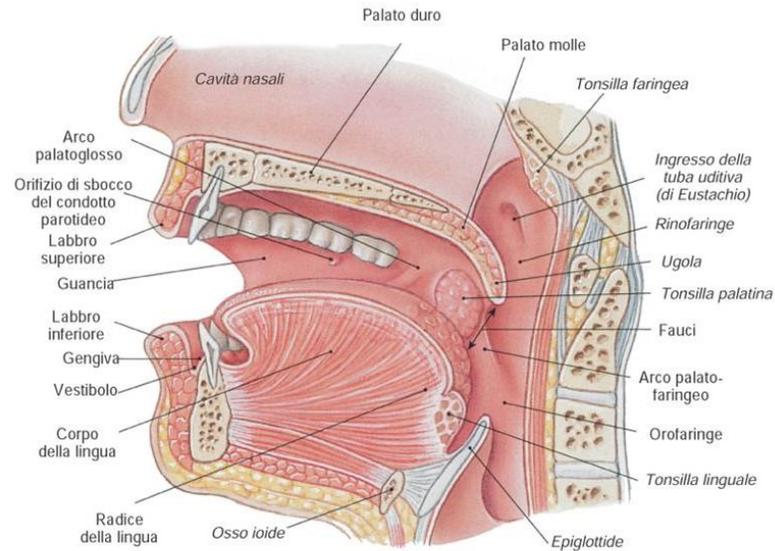


Figura 1. Anatomia della cavità orale in sezione sagittale. Da Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. *Anatomia Umana*; Edises.

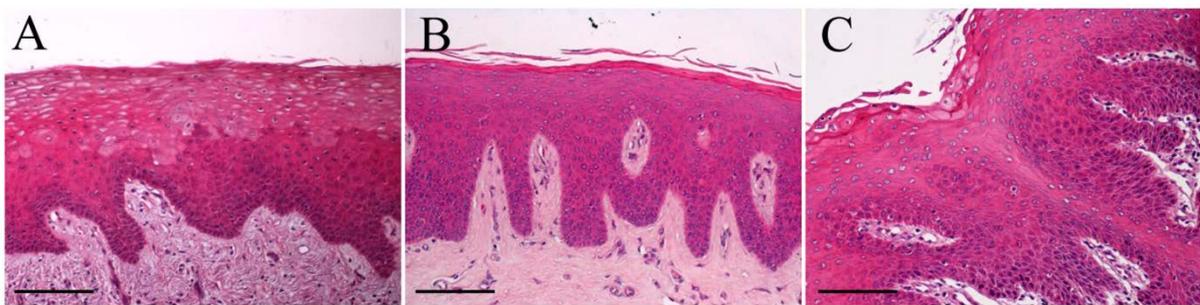


Figura 2. Fotografie ottenute al microscopio ottico in campo chiaro relative a sezioni in paraffina di mucosa orale umana di rivestimento (A), masticatoria (B) e specializzata (C) dopo colorazione con ematossilina e eosina. In C è inquadrata una papilla filiforme del dorso della lingua. Barre = 50 μ m. Fotografie ottenute nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*.

mucosa e muscolo/osso sottostante, come in corrispondenza di guance, labbra e alcune parti del palato duro. A livello di gengive e rafe mediano del palato, la sottomucosa è assente e la mucosa orale è direttamente ancorata al periostio costituendo il cosiddetto mucoperiostio, rigido e inflessibile. Dove presente, la sottomucosa è costituita da connettivo lasso fibroso riccamente innervato e irrorato da vasi sanguigni in cui sono presenti anche adipociti e ghiandole esocrine mucose minori (Squier and Kremer, 2001).

Anatomia microscopica della mucosa orale

La mucosa di rivestimento della cavità orale si continua con la pelle a livello dei margini labiali e con la mucosa faringea all'istmo delle fauci. In generale è caratterizzata da un compartimento connettivale definito lamina propria su cui poggia un epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato.

La **lamina propria** è a diretto contatto con la sottomucosa o con la tonaca muscolare ed è suddivisibile in uno strato papillare immediatamente al di sotto dell'epitelio e uno strato reticolare più profondo che ospitano terminazioni nervose e capillari necessari per la sopravvivenza delle cellule connettivali e dei cheratinociti (Bairati, 1997).

In corrispondenza di palato, guance e pavimento della lingua sono alloggiate le ghiandole salivari minori. Si tratta di ghiandole esocrine a secrezione mista che mantengono umida e lubrificata la superficie buccale e secernono mucine, amilasi, fattore di crescita epiteliale e sostanze ad azione antimicrobica. Noduli di tessuto linfoide sono riscontrabili a livello delle invaginazioni dell'epitelio nel connettivo della lamina propria (Squier and Kremer, 2001).

Nella lamina propria sono presenti cellule autoctone e migranti e la matrice extracellulare comprende fibre collagene, fibre elastiche, glicoproteine e polisaccaridi a struttura ramificata in quantità variabili nei diversi distretti della cavità orale. Grazie alla disposizione intrecciata della componente fibrillare della porzione reticolare, il tessuto risulta più compatto rispetto al connettivo papillare (Dalle Donne et al., 2011). La sostanza fondamentale della matrice extracellulare è costituita da materiale amorfo semifluido, una soluzione acquosa di sali inorganici e glicoproteine non strutturali, proteoglicani, enzimi, vitamine, ormoni, polisaccaridi e protocollagene prodotti soprattutto dai fibroblasti (Dalle Donne et al., 2011).

Fra epitelio orale e lamina propria connettivale si interpone la **membrana basale**, una struttura complessa costituita da tre diversi strati: *lamina lucida* e *lamina densa* che risultano rispettivamente elettronegativa e elettronepositiva all'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione, e *lamina reticolare*, relativamente trasparente agli elettroni, in continuità con il tessuto connettivo della lamina propria.

La membrana basale rappresenta un supporto di tipo meccanico per l'epitelio e costituisce una barriera selettiva che permette lo scambio di nutrienti e cataboliti fra epitelio e connettivo. Integrità e continuità della membrana basale sono essenziali nel garantire legame e interazione fra epitelio orale e lamina propria poiché essa svolge un ruolo importante nel controllo della crescita e del differenziamento delle cellule epiteliali, come testimoniato dalla proporzionalità inversa che correla spessore della membrana basale e grado di cheratinizzazione dell'epitelio (Adams, 1976).

L'**epitelio orale** è definito *stratificato* poiché i cheratinociti, la popolazione cellulare prevalente dell'epitelio, si dispongono in più strati sovrapposti. Negli strati profondi i cheratinociti sono di forma cubica o cilindrica, mentre negli strati più superficiali assumono una forma appiattita dalla quale deriva la definizione dell'epitelio orale come *pavimentoso*. Infine, l'epitelio orale è definibile come *cheratinizzato* per il tipico processo di maturazione a cui vanno incontro le cellule epiteliali che comporta modificazioni strutturali, metaboliche e nel contenuto citosolico. In base a differenze strutturali dovute a specifici requisiti funzionali, è possibile distinguere tre aree distinte all'interno del cavo orale: mucosa di rivestimento, mucosa masticatoria e mucosa specializzata (Andersen and Mackenzie, 1986).

La *mucosa orale di rivestimento* è localizzata in corrispondenza di palato molle, superficie ventrale della lingua, pavimento della cavità orale e processi alveolari ad esclusione delle gengive. Di colore rosso, è caratterizzata da epitelio cheratinizzato non corneificato poggiate su una lamina propria di tessuto connettivo lasso con abbondanti fibre elastiche per garantire la flessibilità necessaria all'articolazione delle parole e alla deglutizione (Figura 2A). La *mucosa masticatoria* riveste le regioni maggiormente soggette a forze meccaniche come gengive e palato duro. All'esame macroscopico appare di colore rosa ed è costituita da epitelio cheratinizzato corneificato e connettivo fibroso denso (Figura 2B). Infine, la *mucosa specializzata* riveste i due terzi anteriori del dorso della lingua ed è caratterizzata da epitelio cheratinizzato corneificato e non corneificato che ospita le papille linguali (Figura 2C) (Squier and Kremer, 2001).

Nel caso di un epitelio cheratinizzato corneificato l'interfaccia epitelio-connettivo presenta avvallamenti ravvicinati che ampliano la superficie di interazione fra i due tessuti soddisfacendo l'esigenza di un forte ancoraggio e di intensi scambi, mentre la presenza di

proiezioni connettivali nell'epitelio, le papille, ampie, poco profonde e distanti fra loro è tipica dell'epitelio cheratinizzato non corneificato della mucosa di rivestimento (Adams, 1976).

Nell'epitelio orale circa il 90% della popolazione cellulare è composta da cheratinociti, mentre il restante 10% è rappresentato da melanociti, cellule di Langerhans, cellule di Merkel e cellule del sistema immunitario (principalmente linfociti e macrofagi), distinguibili all'analisi ultrastrutturale per la scarsità di tonofilamenti citosolici e per la mancanza, con l'eccezione delle cellule di Merkel, delle tipiche strutture giunzionali dei cheratinociti, i desmosomi (Squier and Kremer, 2001).

I **melanociti** sono cellule che originano dalla cresta neurale e si localizzano preferenzialmente nello strato basale dell'epitelio. Sono deputati alla sintesi di melanina e dal punto di vista ultrastrutturale e istologico sono del tutto simili ai melanociti epidermici. Come questi ultimi mancano di tonofilamenti e non presentano desmosomi che li connettono ai cheratinociti adiacenti (Figura 3A). Nei soggetti dalla pelle chiara, i melanociti orali contengono al loro interno solo melanosomi immaturi striati di piccole dimensioni e, nonostante la loro presenza a livello della mucosa orale, è stato suggerito che solo una parte dei melanociti orali è attivamente coinvolta nella sintesi di melanina (Barrett and Scully, 1994). Il ruolo dei melanociti orali non è stato ancora chiaramente delineato, ma la loro attività risulta intensificata in numerose condizioni patologiche o in seguito a stimolazione cronica da agenti esterni, per esempio nei soggetti fumatori, quando si riscontra iper-pigmentazione della mucosa orale.

Le **cellule di Merkel** sono localizzate in corrispondenza dello strato basale dell'epitelio, in prossimità di una terminazione nervosa (Figura 3B). A livello ultrastrutturale si caratterizzano per la presenza di granuli elettrondensi nella porzione di citosol rivolta verso la terminazione assonica e la superficie cellulare è caratterizzata da protrusioni digitiformi che sembrano avere un ruolo nella funzione meccanocettiva di queste cellule (Watanabe, 2004). A differenza dei melanociti, le cellule di Merkel presentano tonofilamenti, in particolare esprimono le isoforme di cheratina (K) K7, K8, K18, K19 e K20, quest'ultima espressa esclusivamente dalle cellule di Merkel degli epiteli pavimentosi stratificati normali (Righi et al., 2006). Inoltre sono connesse con i cheratinociti adiacenti tramite desmosomi. I granuli elettrondensi contengono

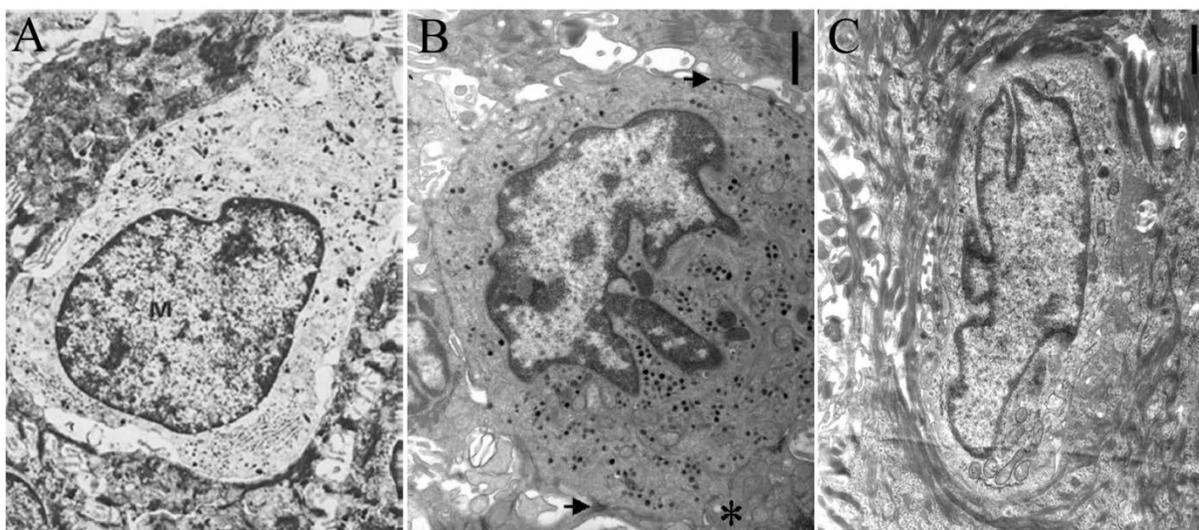


Figura 3. Fotografie ottenute al microscopio elettronico a trasmissione di melanocita (A), cellula di Merkel (B) e cellula di Langerhans (C) nell'epitelio orale. In B le frecce nere indicano i desmosomi che connettono la cellula di Merkel ai cheratinociti adiacenti, l'asterisco è in corrispondenza della terminazione assonica. A: da Hedin CA and Larsson A.(1984) *Journal of Periodontal Research* 19, 177-190. Ingrandimento originale 6400X. B e C: fotografie ottenute nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*. Barre = 1 μ m.

sostanze a funzione endocrina e paracrina con una possibile funzione regolatrice sulla proliferazione dei cheratinociti adiacenti. Nell'epitelio orale le cellule di Merkel sono particolarmente abbondanti nelle aree sottoposte a continui stress meccanici e subiscono modificazioni nella distribuzione e nel numero in seguito a lesioni. In particolare, alcuni stati infiammatori cronici portano ad un aumento nel loro numero a livello della mucosa orale, suggerendo un ruolo nei processi riparativi dell'epitelio orale (Righi et al., 2006).

Le **cellule di Langerhans** sono cellule del sistema immunitario derivanti da cellule dendritiche mieloidi in grado di riconoscere e processare gli antigeni con cui vengono a contatto nell'epitelio. Se attivate, migrano verso i linfonodi distrettuali per indurre una risposta linfocitaria all'antigene. Nelle sezioni istologiche colorate con ematossilina ed eosina, appaiono come cellule chiare poiché, come altre popolazioni cellulari diverse dai cheratinociti, la mancanza di giunzioni forti con le cellule epiteliali ne determina la contrazione durante la processazione per la microscopia ottica. Il metodo di riconoscimento per eccellenza è invece la microscopia elettronica a trasmissione, che permette di identificarle chiaramente grazie alla particolare forma lobata del nucleo e ai caratteristici granuli di Birbeck necessari per l'endocitosi mediata da recettore (Figura 3C) (Barrett et al., 1996). Complessivamente tendono a essere più abbondanti nell'epitelio non corneificato rispetto

all'epitelio corneificato (Adams, 1976) e si localizzano preferenzialmente a livello degli strati spinoso e granuloso (Barrett et al., 1996). Nonostante il loro ruolo in numerose patologie orali sia ancora da approfondire, è stato dimostrato il coinvolgimento delle cellule di Langerhans nelle prime fasi delle gengiviti, nel Lichen Planus e nella risposta immunitaria a numerosi allergeni e patogeni coinvolti anche nell'insorgenza della parodontite (Cutler and Jotwani, 2006).

Differenziazione terminale nell'epitelio orale

I cheratinociti proliferano nello strato profondo dell'epitelio in cui sono presenti nel loro stato più indifferenziato e migrano poi verso la superficie formando gli strati sovrapposti dell'epitelio e andando incontro a un processo di maturazione, definito *differenziazione terminale*.

Esistono due modalità principali di differenziamento che portano alla formazione di epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato non corneificato o corneificato (Figura 4). Le differenze riguardano soprattutto le modalità di addensamento e orientamento dei filamenti intermedi di cheratina nelle cellule degli strati superficiali dell'epitelio, mentre le cellule dello strato basale presentano caratteristiche comuni dal punto di vista della composizione e organizzazione dei tonofilamenti, della dimensione e degli organelli presenti (Adams, 1976). Le cellule di ciascuno strato epiteliale hanno raggiunto lo stesso grado di maturazione e hanno quindi caratteristiche strutturali e funzionali comuni (Bragulla and Homberger, 2009; Standring, 2009).

L'epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato non corneificato (Figure 4A e 4B) è localizzato a livello della mucosa di rivestimento dell'epitelio buccale e presenta uno *strato basale* proliferante profondo sovrastato dal compartimento della differenziazione a sua volta suddivisibile in uno *strato intermedio* di grandi cellule poligonali e uno *strato disteso* di cellule appiattite, giunte al loro massimo grado di maturazione (Andersen and Mackenzie, 1986). Durante il processo di differenziazione terminale, i cheratinociti dell'epitelio non corneificato migrano verso la superficie e diminuiscono progressivamente la loro attività

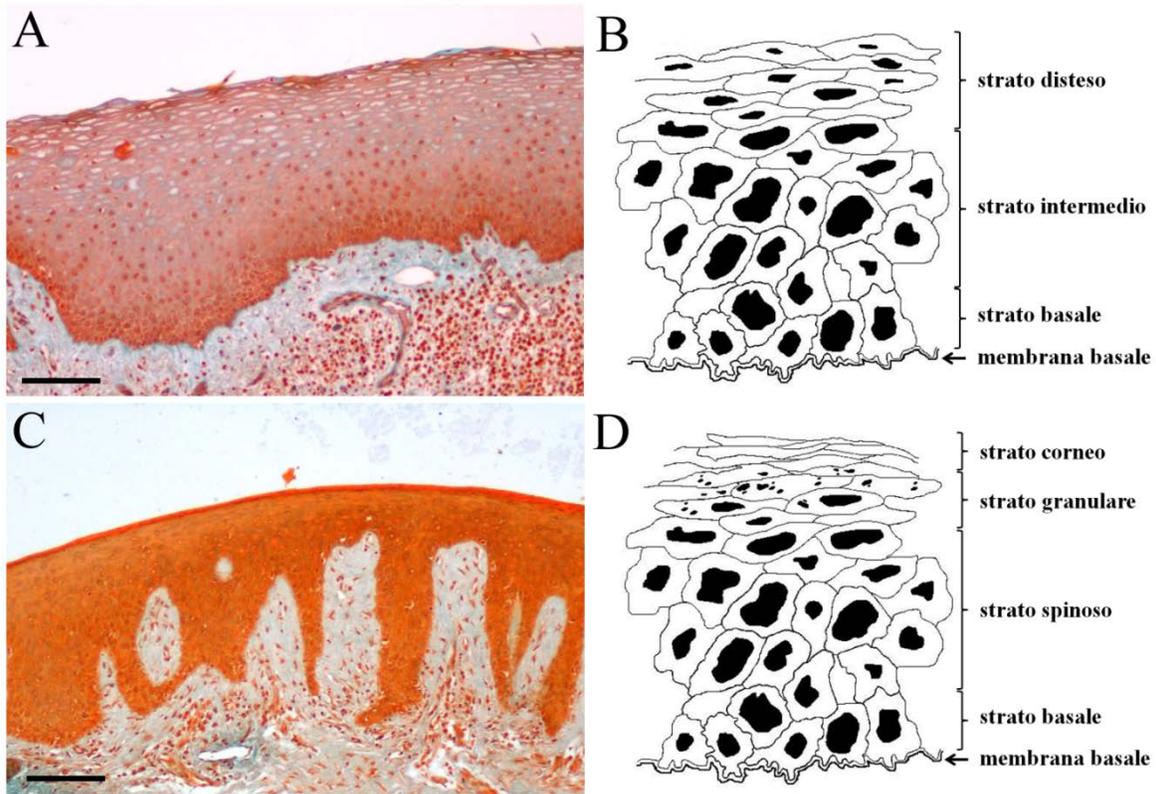


Figura 4. Fotografie e rappresentazioni schematiche di mucosa orale umana di rivestimento (A e B) e masticatoria (C e D). A e C: sezioni in paraffina dopo colorazione tetracromica di Dane-Herman. Barre = 50 μ m. Fotografie ottenute nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*. In B e D sono evidenziate la stratificazione e la suddivisione in compartimenti dell'epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato non corneificato (B) e corneificato (D).

metabolica, pur conservando organelli cellulari e nuclei in tutti gli strati. Le differenze strutturali riscontrabili fra lo strato intermedio e quello disteso sono per lo più quantitative, i filamenti intermedi di cheratina risultano scarsamente impaccati anche negli strati più superficiali e sono presenti abbondanti granuli di glicogeno e granuli rivestiti di membrana (Andersen and Mackenzie, 1986). Il ricambio cellulare garantito dalle cellule proliferanti dello strato basale è molto rapido e risulta più elevato rispetto all'epitelio cheratinizzato corneificato (Adams, 1976).

Nella mucosa masticatoria di palato duro, gengiva e mucoperiostio, l'**epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato corneificato** (Figure 4C e 4D) è caratterizzato da cellule superficiali prive o con residui di nuclei e organelli. Le cellule migrano dalla profondità verso la superficie e subiscono cambiamenti a livello della membrana plasmatica, modificano la

propria forma e contenuto citosolico diventando cellule appiattite contenenti un'alta percentuale di prodotti di sintesi tra cui le cheratine (Adams, 1976; Andersen and Mackenzie, 1986).

In questo tipo di epitelio procedendo dalla membrana basale verso gli strati più superficiali troviamo lo *strato basale*, lo *strato spinoso*, lo *strato granulare* e lo *strato corneo*, ciascuno con specifiche caratteristiche morfo-funzionali.

Lo *strato basale* è un monostrato di cheratinociti di forma cubica o cilindrica con asse maggiore perpendicolare alla superficie epiteliale. In questo strato sono anche presenti un numero limitato di cellule staminali dell'epitelio riconoscibili con reazioni di immunolocalizzazione per l'espressione della proteina p63, un fattore trascrizionale espresso nelle cellule epiteliali con elevata capacità clonogenica e proliferativa e necessario per il mantenimento del normale turn-over epiteliale (Vanbokhoven et al., 2011). Tali cellule hanno il compito di preservare l'informazione genetica e mantenere il potenziale proliferativo del tessuto dando origine ai cheratinociti basali con attività metabolica elevata e in grado di dividersi velocemente. La proliferazione delle cellule basali garantisce il rinnovamento continuo dei cheratinociti epiteliali compensando la perdita di cellule per desquamazione dalla superficie (Hume and Potten, 1983). I cheratinociti dello strato basale mediano l'ancoraggio dell'epitelio alla membrana basale sottostante grazie agli emidesmosomi. Queste giunzioni sono localizzate sulla porzione basale della membrana plasmatica dei cheratinociti basali dove le isoforme di integrina $\alpha 4\beta 6$ mediano l'interazione con le glicoproteine presenti nella lamina lucida della membrana basale. Gli emidesmosomi devono il loro nome alla struttura morfologicamente simile ai desmosomi, importanti giunzioni fra cheratinociti adiacenti, nonostante sostanziali differenze a livello molecolare (Jerome-Morais et al., 2009).

Le cellule dello *strato spinoso* perdono un asse cellulare maggiore di facile identificazione, assumendo forme poligonali variabili, e si dispongono in più strati sovrapposti. Il nome di questo compartimento deriva dai prolungamenti citosolici fra cheratinociti adiacenti, definiti spine, visibili nei preparati istologici e caratterizzati dalla presenza di numerose giunzioni intercellulari, i desmosomi (Adams, 1976). L'attività metabolica dei cheratinociti spinosi è molto elevata e comporta l'accumulo di prodotti di sintesi nel citoplasma, in particolare tonofilamenti di cheratina che rendono il citosol delle cellule spinose elettrondenso all'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione.

I cheratinociti dello *strato granulare* hanno forma appiattita con il loro asse maggiore parallelo alla superficie dell'epitelio. Passando dalla strato spinoso a quello granulare si ha una progressiva diminuzione del numero di organelli deputati a un metabolismo attivo, mentre il citoplasma è caratterizzato dall'abbondanza di prodotti di sintesi (Andersen and Mackenzie, 1986; Squier and Kremer, 2001). In particolare il citosol si riempie di granuli di cheratoialina contenenti sostanze amorfe ricche di gruppi sulfidrilici che costituiscono i precursori delle strutture tipiche dello strato corneo più superficiale (Adams, 1976). Esistono almeno tre diverse tipologie di granuli distinguibili per localizzazione e contenuto. I più abbondanti e ubiquitari presentano forma regolare e sono dispersi nel citosol. Contengono una matrice densa che ospita al suo interno altri piccoli granuli utili poi all'ispessimento della membrana delle cellule degli strati superiori. Nella mucosa orale con elevato grado di cheratinizzazione sono anche presenti granuli con forma irregolare associati ai tonofilamenti e granuli più allungati e a struttura lamellare, visibili al microscopio elettronico a trasmissione, che hanno lo scopo di rinforzare la superficie cellulare apicale (Adams, 1976). Nella zona di passaggio fra strato granulare e corneo i granuli si addensano nella porzione apicale della cellula, pronti per essere estrusi nello spazio intercellulare dove contribuiscono a formare una barriera semipermeabile che limita il passaggio di sostanze negli spazi intercellulari da e verso gli strati più profondi dell'epitelio (Andersen and Mackenzie, 1986; Squier and Kremer, 2001).

Lo *strato corneo* è morfologicamente molto diverso dagli strati sottostanti poiché i corneociti migrano verso la superficie dell'epitelio come un'unica unità e non come singole cellule. Le cellule di questo strato, definite anche lamelle cornee, sono caratterizzate da tonofilamenti strettamente addensati circondati da una matrice proteica ricca di istidina derivante dai granuli di cheratoialina. A seconda della presenza o assenza di residui di nuclei e organelli si parla rispettivamente di epitelio pavimentoso stratificato paracheratinizzato o ortocheratinizzato. Pur essendo costituito da cellule che hanno perso l'abilità di dividersi, lo strato corneo è metabolicamente molto attivo e svolge essenziali funzioni di protezione, comunicazione e scambio (Pouillot et al., 2008).

Lo strato corneo è il primo a dover fronteggiare un insulto esterno e per questo la sua integrità è presupposto essenziale per la funzione di barriera protettiva negli epitelii stratificati (Presland and Jurevic, 2002). Al compito difensivo contribuisce l'idrofobicità delle lamelle cornee risultante da un processo attivo di disidratazione dei cheratinociti che determina un

progressivo impaccamento dei tonofilamenti, indipendentemente dalle condizioni dell'ambiente esterno (Adams, 1976). Inoltre, la membrana plasmatica dei corneociti ricca di glicosil-ceramidi e sfingolipidi costituisce una barriera lipidica finemente regolata dall'azione di numerosi enzimi. In particolare, le desaturasi convertono acido linoleico e linolenico in acidi grassi poli-insaturi a lunga catena che portano alla formazione delle ceramidi; le idrolasi agiscono in modo simile alle idrolasi lisosomiali e contribuiscono al rimodellamento lipidico; altri enzimi rimuovono il glucosio dalle glicosil-ceramidi; le esterasi e proteasi chimotripsino-simili collaborano alla rimozione di microorganismi e alla desquamazione delle lamelle superficiali insieme alla fosfatasi acida, prodotta nello strato granulare e in grado di agire sulle giunzioni fra corneociti una volta liberata nello spazio extracellulare. Allo stesso tempo inibitori delle proteasi, pH acido e il rapporto fra colesterolo solfato e colesterolo regolano l'attività di questi enzimi (Pouillot et al., 2008).

Alla resistenza meccanica e idrofobicità dello strato corneo collaborano anche proteine legate ai lipidi sul lato citosolico della membrana plasmatica e sintetizzate progressivamente durante il processo di cheratinizzazione dell'epitelio. Tra esse troviamo involucrina, loricrina, filaggrina, tricoialina, cistatina- α e proteine desmosomiali che svolgono non solo un ruolo strutturale, ma mediano anche la trasduzione di segnali intracellulari (Presland and Jurevic, 2002). Queste proteine formano legami crociati fra loro e si ancorano, grazie all'azione delle transglutaminasi, ai filamenti intermedi di cheratina citosolici. L'intera struttura raggiunge la stabilità durante il passaggio dallo strato granulare allo strato corneo prendendo il nome di *cornified envelope* (Bragulla and Homberger, 2009). Alcune proteine, come loricrina e involucrina, sono ricche di residui amminoacidici di lisina e glutamina facilmente ossidabili da gruppi carbonilici e rappresentano per questo un'importante riserva antiossidante. Insieme a catalasi e superossidodismutasi esse sono la principale difesa dallo stress ossidativo dello strato corneo (Presland and Dale, 2000; Presland and Jurevic, 2002; Pouillot et al., 2008).

Il **citoscheletro** dei cheratinociti è costituito da microtubuli, filamenti actinici e filamenti intermedi di cheratina, la famiglia di proteine citosoliche più abbondante. Mentre i microtubuli sono coinvolti nello spostamento di organelli e vescicole nel citoplasma e nella divisione mitotica, i filamenti actinici e intermedi sono coinvolti nel determinare la forma, la motilità, la resistenza e la rigidità strutturale delle cellule.

I filamenti di actina si localizzano per la maggior parte subito al di sotto della membrana plasmatica a costituire il cosiddetto cortex cellulare direttamente connesso alle giunzioni aderenti fra cheratinociti adiacenti.

I filamenti intermedi di cheratina si accumulano nel citoplasma dando il nome ai cheratinociti e costituendo mediamente il 30-40% delle loro proteine citosoliche. Le cheratine forniscono supporto meccanico alla cellula costituendo un'imponente rete tridimensionale che si ancora a livello della membrana citoplasmatica in corrispondenza di desmosomi e emidesmosomi. Tale rete è finemente regolata nella sua organizzazione per ottimizzare le funzionalità cellulari, svolgendo un ruolo essenziale nel controllare il traffico degli organelli citosolici, la motilità e divisione cellulare, nonché la trasduzione di segnali. Si tratta di una rete dinamica e flessibile nonostante la capacità di conferire resistenza e forza alla cellula. Questo dualismo è garantito da un ciclo continuo di assemblaggio e depolimerizzazione dei filamenti che originano alla periferia della cellula e si allungano in direzione del nucleo (Windoffer et al., 2011). La flessibilità della struttura dei filamenti di cheratina e la loro interazione con proteine coinvolte nella risposta cellulare rapida (come le heat shock proteins) permettono l'adattamento della rete citoscheletrica a variazioni delle condizioni cellulari e la collaborazione alla trasduzione di segnali inter- e intra-cellulari.

Le caratteristiche acide o basiche proprie delle isoforme di cheratina espresse nella cellula permettono la formazione di eterodimeri che interagiscono a costituire filamenti singoli o fasci di tonofilamenti. Nell'epitelio cheratinizzato, a un maggior grado di cheratinizzazione delle cellule epiteliali corrisponde un aumento nella quantità di fasci di cheratina e una riduzione progressiva della plasticità dei tonofilamenti. La formazione dei fasci è influenzata da numerosi fattori fra cui la presenza di proteine associate ai filamenti intermedi e modificazioni post-traduzionali come fosforilazione, taglio proteolitico (per esempio mediato da caspasi), formazione di ponti disolfuro o glicosilazione. (Bragulla and Homberger, 2009; Windoffer et al., 2011). Le modificazioni post-traduzionali sono essenziali nella riorganizzazione del citoscheletro di cheratina in risposta a stimoli esterni e la fosforilazione su residui di serina e treonina regola la distribuzione in filamenti citosolici solubili o fasci insolubili ed ha un ruolo cruciale nel determinarne il turnover tramite ubiquitinazione, degradazione proteosomica o autofagica (Karantza, 2011).

Negli epitelii stratificati le isoforme maggiormente espresse sono le coppie K5/K14 nello strato basale, K1/K10 e K4/K13 negli strati differenziati soprabasali rispettivamente degli epitelii stratificati cheratinizzati corneificati e non corneificati (Presland and Jurevic, 2002). Mutazioni relative alla coppia K5/K14 comportano ridotta resistenza agli stress meccanici e lisi delle cellule dello strato basale con conseguente distacco fra gli strati epiteliali come si registra per esempio nella pelle nell'epidermolisi bullosa. L'importanza di questa coppia di cheratine è anche dimostrata dalla morte prematura di topi knockout per questi geni subito dopo la nascita (Karantza, 2011).

La coppia K1/K10 è invece coinvolta nel determinare la stabilità e resistenza meccanica degli strati soprabasali degli epitelii stratificati poiché costituiscono la struttura base su cui avviene la formazione dei cornified envelope. L'interazione fra filaggrina e filamenti intermedi comporta l'orientamento parallelo alla superficie epiteliale dei fasci di cheratina, guidando anche la variazione nell'orientamento dei cheratinociti granulari rispetto alle cellule dello strato spinoso. È interessante notare come in topi knockout per K1/K10, le proteine tipiche dei cornified envelope siano up-regolate nel tentativo di compensare il difetto citoscheletrico e preservare la funzionalità della barriera epiteliale (Wallace et al., 2012).

In caso di sollecitazione meccanica, gli epitelii stratificati tendono a ridurre l'espressione di K10 e favorire invece la produzione di K16. Tale isoforma è caratteristica di cellule attive nella riparazione di un danno tessutale e iperproliferanti (Presland and Dale, 2000; Bragulla and Homberger, 2009).

Adesione intercellulare nell'epitelio orale

Negli epitelii stratificati, complessi sistemi giunzionali garantiscono non solo l'efficiente adesione fra cheratinociti adiacenti, ma sono coinvolti anche nella trasduzione di segnali fra le cellule dell'epitelio. I principali sistemi giunzionali sono i *desmosomi* (macula adhaerens), le *giunzioni aderenti* (zonula adhaerens) e le *giunzioni occludenti* (zonula occludens).

Desmosomi e giunzioni aderenti condividono alcune caratteristiche strutturali: in entrambi i tipi di giunzione è infatti possibile riconoscere una placca citoplasmatica sub-plasmalemmale a cui si ancorano filamenti citoscheletrici, mentre glicoproteine transmembrana mediano il contatto diretto fra le cellule (Holthofer et al., 2007).

In particolare i **desmosomi** sono le giunzioni più abbondanti negli epitelii pavimentosi stratificati e garantiscono resistenza agli stress meccanici grazie alla notevole forza di adesione data da multiple interazioni non covalenti fra le proteine che li compongono. Sono coinvolti nell'organizzazione del citoscheletro, nella trasduzione di segnali intra- e intercellulari e nei processi di differenziazione e morfogenesi tessutale (Kottke et al., 2006; Green and Simpson, 2007). A differenza delle cellule degli epitelii semplici, i cheratinociti presentano desmosomi sull'intera superficie cellulare (Holthofer et al., 2007).

All'analisi ultrastrutturale i desmosomi appaiono come placche elettrondense tripartite e simmetriche, strettamente associate alla membrana citoplasmatica di cellule adiacenti e ai tonofilamenti di cheratina (Figura 5) (Adams, 1976; Green and Simpson, 2007). Sono strutture dinamiche che possono variare di dimensione pur mantenendo un aspetto costante. I desmosomi di maggiori dimensioni sono desmosomi maturi, presenti in genere nei cheratinociti in uno stadio avanzato di differenziazione e nei tessuti sottoposti a intensi stress meccanici. Presentano placche simmetriche molto evidenti ed è possibile distinguere anche una linea mediana interposta fra le membrane plasmatiche adiacenti. Tale struttura è invece assente nei desmosomi più immaturi, di piccole dimensioni in cui anche la placca desmosomiale risulta assottigliata e la cui forza di adesione è ridotta (Holthofer et al., 2007). A livello dello strato corneo i desmosomi maturano e si convertono in corneodesmosomi, desmosomi modificati e degradati progressivamente per favorire il distacco dei corneociti superficiali dall'epitelio. A livello ultrastrutturale i corneodesmosomi presentano una struttura elettrondensa omogenea fra le membrane adiacenti dei corneociti, perdendo la struttura tripartita tipica dei desmosomi maturi. Oltre a svolgere la funzione di adesione, i corneodesmosomi diventano parte integrante dei cornified envelope con cui formano legami crociati sul versante citosolico (Ishida-Yamamoto et al., 2011).

I vari componenti dei desmosomi possono essere complessivamente raggruppati fra i costituenti citosolici della placca desmosomiale o fra le caderine desmosomiali transmembrana (Figura 5A). Le proteine della placca desmosomiale sono le *proteine armadillo* (placoglobina e placofiline) e le *plachine* (desmoplachina). La placoglobina si ancora direttamente alla coda citoplasmatica delle caderine desmosomiali, mentre le placofiline mediano l'ancoraggio delle cheratine alla placca. La placoglobina è anche coinvolta nell'interazione fra desmosomi e giunzioni aderenti per la sua capacità di sostituire

la β -catenina all'interno delle giunzioni aderenti. In particolare, il legame fra placoglobina e la caderina classica delle giunzioni aderenti (E-caderina) è requisito essenziale per la formazione dei desmosomi (Jamora and Fuchs, 2002). Le desmoplachine invece legano i filamenti intermedi con la loro porzione C-terminale e le altre proteine desmosomiali con il dominio N-terminale e sono componenti essenziali dei desmosomi in diversi tessuti (Kitajima, 2002; Kottke et al., 2006).

Le *caderine desmosomiali* sono glicoproteine transmembrana che appartengono alla superfamiglia delle proteine di adesione intercellulari calcio dipendenti e formano ponti fra cellule adiacenti instaurando legami omofilici ed eterofilici (Holthofer et al., 2007). Alle caderine desmosomiali appartengono le famiglie delle *desmogleine* (Dsg) e delle *desmocolline* (Dsc) di cui sono note rispettivamente 4 e 3 diverse isoforme (Kottke et al., 2006). Ogni isoforma è codificata da un gene diverso la cui espressione è associata allo stato differenziativo dei cheratinociti e può variare in base alla necessità di maggiore adesione intercellulare, riflettendo un ruolo importante nella morfogenesi e nell'omeostasi tissutale (Kottke et al., 2006). Dsg2 e Dsc2 sono ubiquitarie, ma presenti soprattutto negli epitelii semplici, mentre Dsg1/3/4 e Dsc1/3 sono espresse prevalentemente negli epitelii stratificati (Green and Simpson, 2007). Nella mucosa orale la Dsg3 è l'isoforma predominante, indipendentemente dal grado di cheratinizzazione dell'epitelio. La Dsg1 invece è molto abbondante nelle cellule soprabasali dell'epidermide, mentre nell'epitelio orale i livelli di Dsg1 sono minori rispetto alla Dsg3 e la Dsc1 è assente (Presland and Dale, 2000; Donetti et al., 2005), dimostrando come le analogie morfologiche fra le due tipologie di epitelii pavimentosi stratificati sottendano differenze strutturali e molecolari consistenti. Di più recente identificazione è la corneodesmosina, glicoproteina espressa a livello dei corneodesmosomi nello strato corneo (Green and Simpson, 2007).

Anomalie nella sintesi delle caderine desmosomiali porta allo sviluppo di patologie come per esempio il Pemfigo (Presland and Dale, 2000), mentre nel carcinoma delle cellule squamose alla testa e al collo la perdita di espressione di Dsg1 e Dsg3 è stata associata a prognosi peggiore della patologia (Teh et al., 2011). Al contrario, l'over-espressione della Dsg3 porta a normalizzazione del fenotipo tumorale con riduzione della capacità migratoria e di invasione delle cellule neoplastiche (Chen et al., 2007). Indagini recenti sulla relazione fra desmosomi e

proliferazione epiteliale dimostrano infine che la diminuzione della Dsg3 comporta come effetto secondario la riduzione della divisione cellulare (Mannan et al., 2011).

Per la stretta interazione fra filamenti intermedi e proteine desmosomiali, studi recenti hanno messo in luce come topi knockout per le isoforme K1/K10 di cheratina comportino la formazione di desmosomi immaturi e di piccole dimensioni (Wallace et al., 2012).

Un aspetto molto interessante riguardante i desmosomi è la loro capacità di mantenere il loro ruolo strutturale pur adattandosi in base alle attività cellulari durante, per esempio, la migrazione, la divisione e la rigenerazione tessutale. I desmosomi maturano progressivamente durante la differenziazione terminale dei cheratinociti reclutando un maggior numero di proteine, subendo modificazioni post-traduzionali e assumendo dimensioni maggiori. Al contempo variazioni nella composizione molecolare e nell'espressione di specifiche isoforme di caderine desmosomiali permette di modulare la forza di adesione dei desmosomi (Holthofer et al., 2007). Si tratta quindi di un meccanismo a più fasi e finemente regolato a partire dalla formazione della giunzione all'interno di vescicole intracellulari fino all'evoluzione in corneodesmosomi (Green and Simpson, 2007). Nelle prime fasi di formazione dei desmosomi, il calcio svolge un ruolo essenziale nell'indurre la formazione della giunzione sia promuovendo l'interazione fra caderine desmosomiali sia influenzando l'azione di uno dei principali regolatori dei desmosomi, la proteina chinasi C (isoforma α). Tuttavia, con la progressiva maturazione, i desmosomi perdono la dipendenza dal calcio e diventano altamente stabili, in una condizione definita di iperadesione (Cirillo et al., 2010)

Le **giunzioni aderenti** costituiscono solidi punti di contatto fra cellule adiacenti e sono la prima tipologia di giunzioni che si forma fra i cheratinociti. Hanno un ruolo di primaria importanza nella morfogenesi tessutale e la mancata formazione di giunzioni aderenti efficienti inibisce l'assemblaggio dei desmosomi con cui le giunzioni aderenti mantengono un'interazione continua grazie soprattutto alla mediazione della placoglobina (Kitajima, 2002). L'organizzazione strutturale delle giunzioni aderenti è simile ai desmosomi, benché a livello ultrastrutturale risultino meno facilmente identificabili per la mancanza della struttura tripartita tipica dei desmosomi e per l'ancoraggio meno evidente dei filamenti citoscheletrici di actina alle proteine della placca (Figure 6A e 6B).

La componente transmembrana è rappresentata dalle *caderine classiche* (negli epiteli E-caderina e P-caderina) (Figura 6A) che avviano la formazione della giunzione interagendo nella loro porzione extracellulare e, a differenza delle caderine desmosomiali, hanno un'interazione solo di tipo omofilico (Saito et al., 2012). Una volta formato il contatto fra cellule adiacenti, le caderine tendono a raggrupparsi rafforzando la giunzione, grazie anche all'interazione con le proteine che legano la loro porzione citosolica. Il dominio citoplasmatico della E-caderina presenta infatti siti di legame per numerose proteine che ne regolano la trascrizione, l'endocitosi e la degradazione, mediano segnali intracellulari e controllano l'organizzazione del citoscheletro di actina (Hartsock and Nelson, 2008). Numerosi studi hanno rivelato come il calcio sia un regolatore essenziale della formazione e della stabilità delle giunzioni aderenti. La regolazione delle giunzioni aderenti in risposta alle variazioni nelle concentrazioni di calcio extracellulare è infatti mediata da una complessa via di segnalazione che comprende un recettore del calcio sulla membrana plasmatica (Calcium Sensing Receptor) e la proteina RhoA. La localizzazione in membrana della E-caderina e quindi la formazione della giunzione aderente sono favorite in condizioni di elevate concentrazioni di calcio extracellulare (Tu et al., 2012).

Le proteine di connessione con il citoscheletro di actina sono rappresentate da *p120*, α - e β -*catenina* e *placoglobina* (nota anche come γ -catenina) (Presland and Dale, 2000). β -catenina e p120 legano direttamente la porzione intracellulare delle caderine, mentre la α -catenina media l'interazione fra β -catenina e i filamenti di actina. La placoglobina è solitamente considerata proteina della placca desmosomiale, tuttavia per la sua alta analogia con la β -catenina può sostituirla all'interno delle giunzioni aderenti (Hartsock and Nelson, 2008). La β -catenina ha un ruolo cruciale nella formazione delle giunzioni aderenti poiché l'interazione fra E-caderina e β -catenina avviene già a livello del reticolo endoplasmatico ed è essenziale per il trasporto della E-caderina alla membrana plasmatica. Inoltre, la β -catenina media la trasduzione di segnali e può regolare le modificazioni delle giunzioni in risposta a stimoli esterni (Hartsock and Nelson, 2008). Può infatti svolgere rispettivamente la funzione di proteina di adesione all'interno delle giunzioni aderenti o di fattore anti-apoptotico e stimolo per la migrazione e proliferazione cellulare in base alla localizzazione di membrana o nucleare. In caso di localizzazione nucleare la β -catenina può interagire con diversi fattori trascrizionali determinando l'aumento o la diminuzione del rimodellamento delle giunzioni aderenti

(Jamora and Fuchs, 2002; Nelson and Nusse, 2004; Polette et al., 2007). Alterazioni nella via di segnalazione nota come Wnt- β -catenina sono spesso le prime fasi che portano alla trasformazione in senso tumorale dei cheratinociti nel carcinoma orale delle cellule squamose. In particolare la presenza di β -catenina nucleare risulta aumentata in cheratinociti orali displasici e neoplastici, mentre si evidenzia una contemporanea diminuzione di espressione della E-caderina (Yamada et al., 1997; Yogesh et al., 2011; Chaw et al., 2012).

A differenza dei sistemi giunzionali precedentemente descritti, la **giunzioni occludenti** non mostrano all'analisi ultrastrutturale nessuno spazio intercellulare fra cheratinociti adiacenti (Figure 6B e 6C). Si osservano invece punti di contatto (kissing points) fra membrane plasmatiche adiacenti che formano una barriera idrofobica semipermeabile in grado di selezionare le molecole che possono penetrare nell'epitelio per via paracellulare in base alla carica e al peso molecolare. Questo permette il mantenimento di un gradiente ionico nell'epitelio e di un microambiente in grado di modulare le funzionalità cellulari. Tuttavia, i meccanismi che regolano la selettività epitelio-specifica di tale barriera non sono stati ancora chiariti (Tsukita et al., 2008). Le giunzioni occludenti sono costituite da una serie di proteine transmembrana assemblate in modo diverso a seconda del citotipo e comprendono l'*occludina*, le *claudine*, la *tricellulina* e le proteine *JAM* (Junctional Adhesion Molecules) associate a proteine citosoliche che ne costituiscono la placca citoplasmatica (Langbein et al., 2002) (Figura 6C).

Mentre l'*occludina* è considerata marcatore delle giunzioni occludenti mature (Brandner, 2009), la *tricellulina* è la proteina transmembrana di più recente scoperta e si localizza in particolare nei punti di contatto fra tre cellule adiacenti collaborando alla formazione di una giunzione ancora più stabile (Tsukita et al., 2008). In generale *occludina*, proteine *JAM* e *tricellulina* hanno una funzione modulatrice sulle giunzioni occludenti ma non sono in grado da sole di formare una giunzione stabile. Studi eseguiti su topi knockout per l'*occludina* hanno infatti dimostrato che la formazione delle giunzioni è comunque possibile grazie alla mediazione della famiglia delle *claudine* che costituiscono la vera struttura portante delle giunzioni occludenti con le 24 proteine che la compongono (Tsukita et al., 2008).

Fra le proteine citosoliche delle giunzioni occludenti le isoforme 1, 2 e 3 della *zonula occludens* (ZO) sono considerate i principali regolatori spazio-temporali della formazione

delle giunzioni occludenti. Alcune proteine come ZO-1 a livello citoplasmatico possono interagire direttamente o indirettamente tramite l' α -catenina con i filamenti actinici suggerendo un'interazione con le giunzioni aderenti, essenziale nella trasmissione di segnali all'interno della cellula e nella regolazione reciproca dei sistemi giunzionali (Matter and Balda, 2003). Nell'epitelio orale corneificato l'occludina si localizza a livello degli strati granulare e corneo, mentre proteine quali ZO-1 e claudina-1 sono presenti anche negli strati più profondi. Molte di queste giunzioni, occludenti o contenenti proteine ad esse correlate, si collocano negli spazi inter-desmosomiali della membrana plasmatica dei cheratinociti contribuendo alla stabilità della citoarchitettura epiteliale (Langbein et al., 2002).

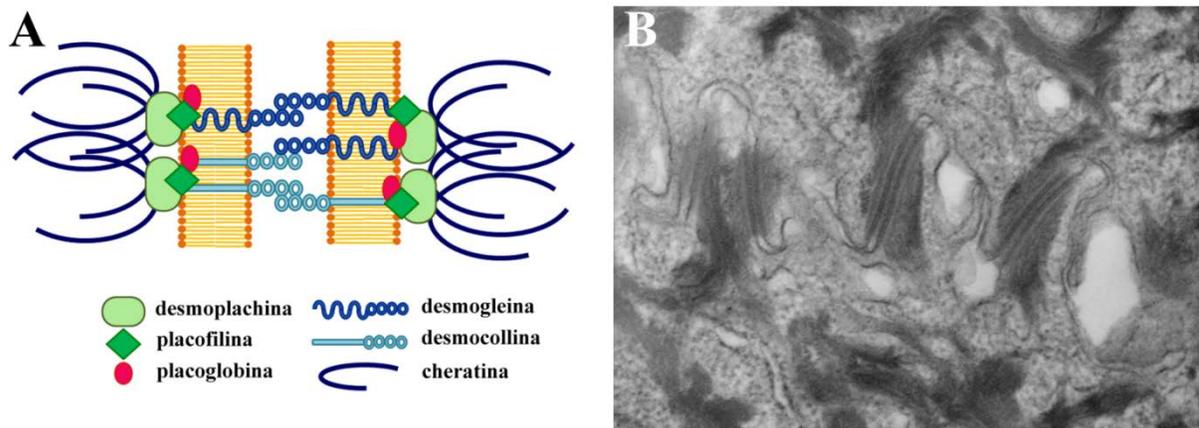


Figura 5. A: Rappresentazione schematica della struttura di un desmosoma fra cheratinociti adiacenti. B: Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione di un desmosoma a livello dello strato spinoso dell'epitelio orale. Ingrandimento originale 40000X. Fotografia ottenuta nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*.

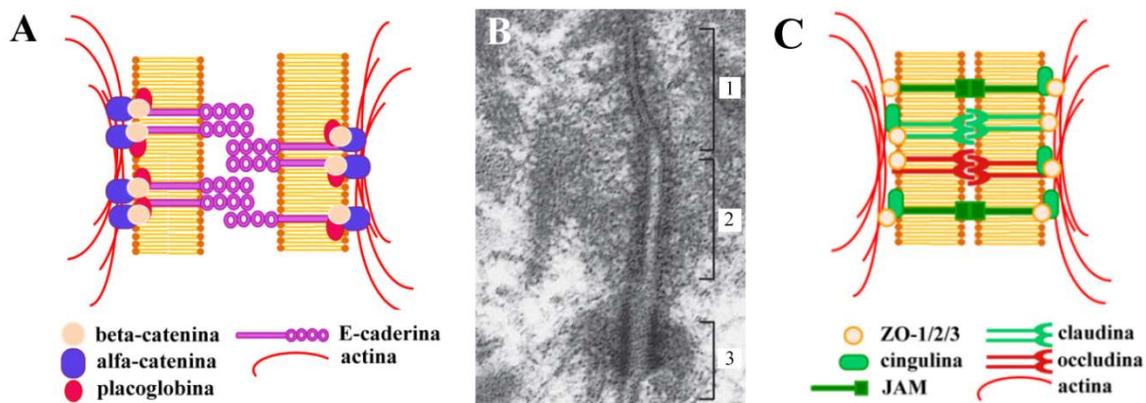


Figura 6. A e C Rappresentazione schematica della struttura di giunzioni aderenti (A) e occludenti (C) fra cheratinociti adiacenti. B: Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione di giunzioni occludenti (1), aderenti (2) e desmosomi (3) in una cellula epiteliale. Modificato da Stevens A, Lowe J. *Istologia Umana*; Casa Editrice Ambrosiana.

MODELLI SPERIMENTALI PER LO STUDIO DELLA MUCOSA ORALE UMANA

Negli ultimi decenni, sono stati messi a punto diversi modelli sperimentali tridimensionali per lo studio della mucosa orale umana che superassero le limitazioni legate all'utilizzo di linee cellulari, colture primarie o modelli in vivo sia a scopo di ricerca, sia per finalità legate alla pratica clinica. I modelli in vivo, oltre alle limitazioni legate ai problemi etici dell'utilizzo di animali da laboratorio, presentano differenze legate alla diversa anatomia orale poiché nell'uomo, ma non nei più comuni animali da laboratorio, sono riconoscibili gradi variabili di cheratinizzazione dell'epitelio nelle diverse regioni della cavità orale (Adams, 1976).

Modelli in vitro basati su monostrati epiteliali si sono dimostrati utili e versatili nella ricerca di base in biologia orale per lo studio delle interazioni fra cheratinociti e cellule mesenchimali, del microambiente e dei meccanismi molecolari. Si tratta però di modelli delicati, difficili da maneggiare e che non permettono di valutare fenomeni complessi legati all'adattamento tessutale e alla riorganizzazione delle principali proteine strutturali dell'epitelio orale che richiedono invece modelli tridimensionali. Per ovviare a queste limitazioni, i cheratinociti orali sono stati coltivati su membrane permeabili all'interfaccia aria-liquido, condizione sperimentale che facilita la formazione di più strati sovrapposti. Il risultato ottenuto è spesso caratterizzato da segni iniziali di differenziamento, dalla formazione di una membrana basale e dalla produzione di diverse isoforme di cheratina (Rosdy and Clauss, 1990). Tuttavia, quando questi modelli tridimensionali sono ottenuti da cellule derivate da carcinoma delle cellule squamose, la differenziazione non rispecchia quella tipica della mucosa orale cheratinizzata e i modelli sono più utili per studi di biocompatibilità che non per analisi strutturali dell'epitelio orale.

Avanzamenti nella messa a punto di modelli sperimentali sono stati ottenuti utilizzando i fibroblasti e la matrice da essi prodotta come substrato per la crescita dei cheratinociti, avvalendosi così del ruolo essenziale dei fibroblasti stessi nell'influenzare il differenziamento e la vitalità delle cellule epiteliali (Moharamzadeh et al., 2007). La riproduzione della mucosa orale richiede però non solo l'utilizzo di fibroblasti coltivati su un supporto biocompatibile e

cheratinociti in grado di crescere in strati sovrapposti, ma anche di una membrana basale di ancoraggio spesso difficile da riprodurre in vitro.

La scelta di un supporto per la crescita delle cellule naturale o artificiale, della popolazione cellulare più adatta a riprodurre un fenotipo epiteliale e del terreno ottimale per la loro crescita e il loro differenziamento non sono spesso sufficienti a riprodurre fedelmente la struttura, il processo differenziativo e l'omeostasi tipica dell'epitelio orale umano. Per superare queste limitazioni e studiare la risposta precoce della mucosa orale a stress esogeni, nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* è stato standardizzato un modello sperimentale di espianiti ottenuti da interventi chirurgici mininvasivi di mucosa orale cheratinizzata corneificata umana (Donetti et al., 2009). Tale modello prevede la messa in coltura del frammento bioptico in un sistema Transwell (Corning Incorporated Life Sciences Lowell, MA, USA) caratterizzato da una membrana in poliestere porosa (Figura 7). Il campione viene coltivato in incubatore umidificato a 37°C 5% CO₂ in uno stato di semi-immersione in terreno di coltura completo (Tabella A1) per mimare la condizione fisiologica della mucosa orale umana che, a differenza della pelle, non è direttamente esposta all'aria, ma è sempre mantenuta umida. In questo modo è possibile preservare la struttura tridimensionale dell'epitelio e le interazioni epitelio-mesenchimali fondamentali per la corretta maturazione/differenziazione dei cheratinociti. Inoltre, la mucosa orale è mantenuta vitale con concentrazioni minime di fattori di crescita nel terreno di coltura che potrebbero da un lato prolungare il tempo di vita del frammento bioptico in coltura, ma rischiano di alterare il fisiologico turnover dei cheratinociti orali e i complessi meccanismi cellulari e tissutali presenti nella mucosa orale.

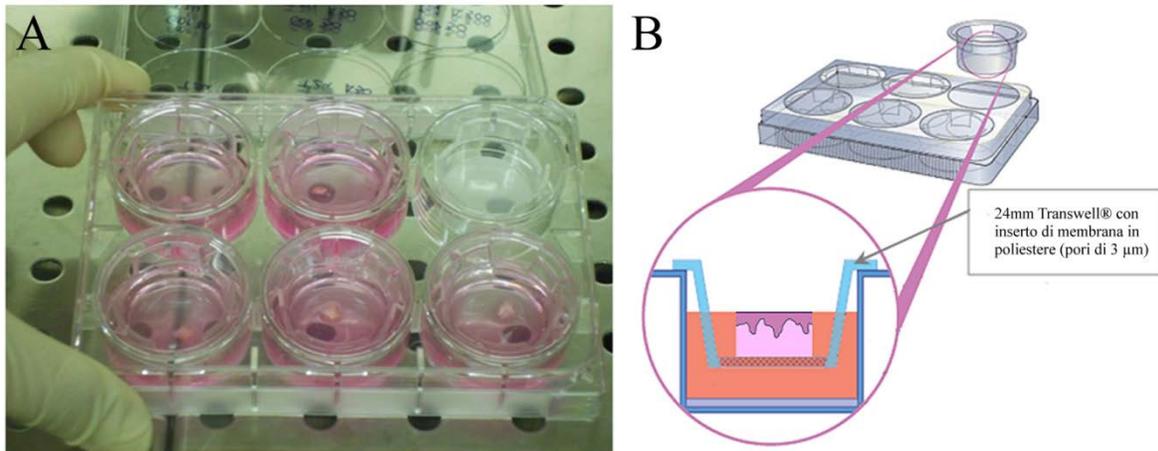


Figura 7. A: Fotografia (A) e rappresentazione schematica (B) del sistema Transwell® utilizzato nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* per la coltura di biopsie di mucosa orale umana normale. Le biopsie sono collocate sulla membrana di poliestere del pozzetto con il compartimento epiteliale verso l'alto in uno stato di semi-immersione nel terreno di coltura completo preparato come descritto in Tabella A1. B: modificato da www.corning.com/lifesciences.

FUMO DI SIGARETTA

Composizione del fumo di sigaretta

Il fumo di sigaretta è una miscela di composti chimici derivanti dalla combustione dei componenti della sigaretta come carta, foglie di tabacco, additivi e coloranti utilizzati per rendere il prodotto più gradevole ai consumatori.

Nel fumo di sigaretta sono identificabili due diverse fasi: una *fase gassosa* che attraversa il filtro e una *fase solida*, solo parzialmente trattenuta dal filtro (Figura 8A). Entrambe le fasi sono caratterizzate dall'abbondanza di radicali liberi. I radicali della porzione gassosa del fumo di sigaretta derivano in parte dalla reazione di combustione e in parte da reazioni chimiche spontanee che avvengono nel fumo stesso e che spesso coinvolgono l'ossido di azoto. Queste reazioni chimiche spontanee sono considerate la causa dell'inattesa lunghezza dell'emivita dei radicali del fumo di sigaretta (Pryor et al., 1993).

La combustione che dà origine al fumo di sigaretta si realizza ad elevatissime temperature. Il tabacco che brucia all'estremità della sigaretta supera i 900 °C, il fumo che raggiunge il soggetto fumatore (corrente di fumo principale) raggiunge circa i 30 °C, mentre la corrente di fumo secondaria che si allontana dalla sigaretta si raffredda progressivamente disperdendosi nell'aria (Figura 8B). L'alta temperatura a cui avviene la combustione è un fattore essenziale nel determinare la composizione del fumo di sigaretta, poiché facilita la generazione di composti altamente reattivi che innescano reazioni chimiche a catena e favorisce anche la volatilizzazione di molti ioni metallici e la loro interazione con altri composti volatili (Domagala-Kulawik, 2008; Thielen et al., 2008; Pappas, 2011).

Nella fase gassosa del fumo di sigaretta la nicotina costituisce il componente più abbondante. È un alcaloide naturale che causa la dipendenza dal fumo, nonostante la sua rapida degradazione ed eliminazione dall'organismo, ed è stato per questo uno dei composti presenti nel fumo più a lungo studiati.

Tra i prodotti di combustione ad oggi identificati si ritrovano numerosi composti aromatici policiclici (per esempio benzo- α -pirene), aldeidi tra cui formaldeide e acetaldeide, chetoni, fenoli, ammine azotate, composti radioattivi come il polonio-210, ossido di carbonio e di azoto e moltissimi altri con effetti citotossici e mutageni. In particolare, i composti chimici noti come gli analiti di Hoffman (Hoffmann and Hoffmann, 1997) sono considerati fra i

composti con il potere carcinogenico più elevato e per questo sono tra i più studiati per gli effetti nocivi sulla salute insieme a radicali dell'ossigeno e radicali organici (Bartalis et al., 2009).

Il materiale particolato contenuto nella fase solida è il cosiddetto catrame (Cigarette Tar) che, unendosi al vapore acqueo dell'aria, raggiunge sotto forma di aerosol i polmoni dei soggetti fumatori. La maggior parte della componente particolata ha un diametro compreso fra 0,1 e 1,3 μm , ma è presente anche una porzione di particolato ultrafine (diametro $\leq 0,1 \mu\text{m}$) che penetra in profondità nei polmoni dove può essere facilmente fagocitato dalle cellule e entrare nel circolo sanguigno (Pappas, 2011). La componente particolata è considerata responsabile dell'attivazione di cellule del sistema immunitario come leucociti, macrofagi e cellule dendritiche che collaborano alla reazione immunologica di sensibilizzazione ad allergeni di natura organica, iper-responsività nonché infiammazione delle vie aeree (Pappas, 2011). È importante notare come numerosi composti presenti nel fumo di sigaretta fra cui la nicotina hanno un'azione immunosoppressiva, mentre metalli e glicoproteine del tabacco sono altamente immunostimolanti e ciò determina una reazione al fumo complessa da parte dell'organismo (Zee, 2009).

La moltitudine di composti presenti nel fumo di sigaretta e la stretta dipendenza fra la sua composizione e gli additivi usati per il trattamento delle foglie di tabacco, della carta, del filtro nonché coloranti e composti utili per modificare il sapore della sigaretta stessa hanno imposto alla comunità scientifica di trovare uno standard per lo studio degli effetti del fumo. Un valido strumento sono le Research Cigarettes dell'Università del Kentucky di cui sono disponibili informazioni dettagliate sulla natura dei composti presenti nel fumo e le loro concentrazioni, garantendo una consistente riduzione nella variabilità introdotta nei diversi sistemi sperimentali utilizzati per lo studio del fumo di sigaretta (<http://www.ca.uky.edu/refcig/>).

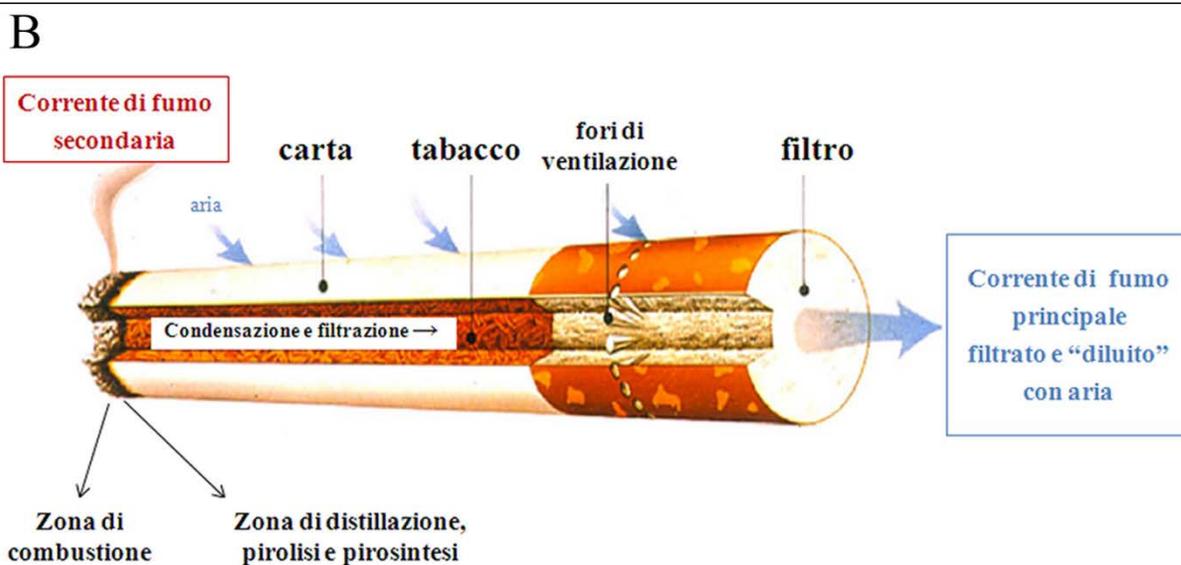
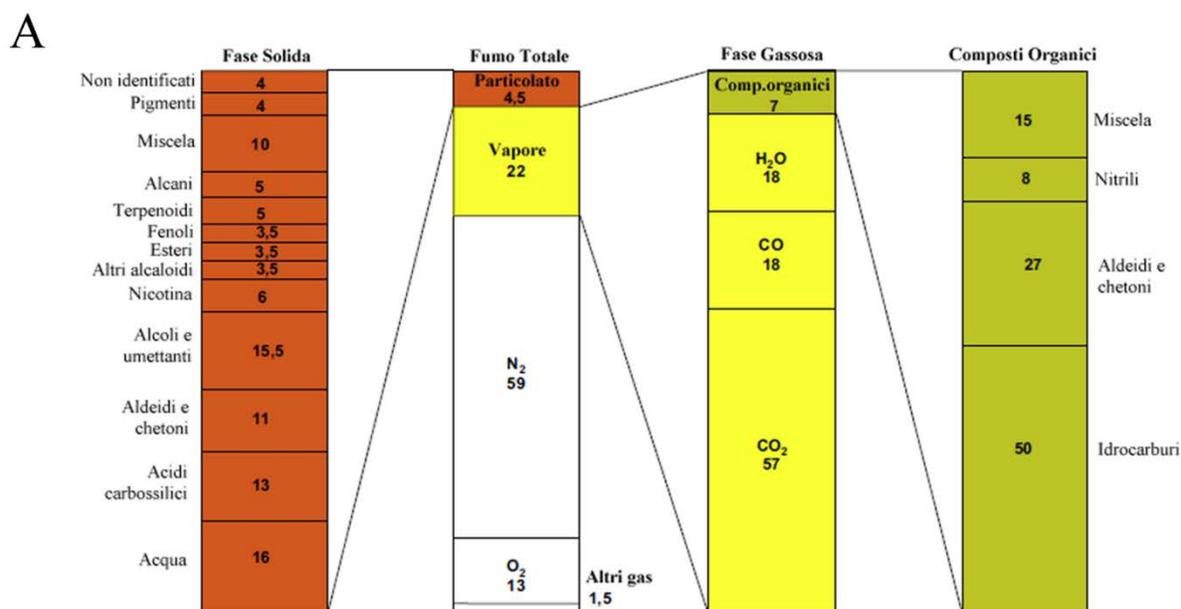


Figura 8. A: Schema riassuntivo della composizione chimica del fumo di sigaretta con indicazione delle principali classi di composti presenti nelle fasi gassosa e solida. B: Rappresentazione schematica di una sigaretta con l'indicazione delle zone di combustione, distillazione, pirolisi e piro sintesi e della diluizione e filtrazione della corrente principale di fumo grazie ai fori di ventilazione nel filtro posto ad un'estremità della sigaretta. A e B: modificate da Thielen et al. (2008) *Experimental and Toxicologic Pathology* 60, 141–156.

Evidenze cliniche: patologie del cavo orale legate all'abitudine al fumo

Il fumo di sigaretta costituisce un'importante fonte di stress per il tessuto epiteliale orale ed è stato inserito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nell'elenco delle cinque principali cause di morte nel mondo (WHO, 2009). Ogni anno il tabacco uccide circa 6 milioni di persone, di cui 600000 a causa di patologie dovute all'esposizione al fumo passivo. Si prevede che questo numero salirà a 8 milioni nel 2030, arrivando quindi a causare l'80% circa delle morti nei Paesi a basso e medio reddito (Report dell'Organizzazione Mondiale della Sanità: <http://www.who.int/tobacco/economics/background/en/index.html>).

Da un punto di vista clinico, le lesioni benigne e maligne a carico del cavo orale riconducibili all'uso di tabacco sono numerose e spesso concomitanti in uno stesso paziente (Mirbod and Ahing, 2000a e 2000b). In genere, si tratta di patologie che coinvolgono la superficie epiteliale alterandone la pigmentazione o lo spessore, ma nei fumatori oltre i 45 anni di età sono comuni anche l'infiammazione e la metaplasia dei dotti delle ghiandole salivari minori (Taybos, 2003). Quest'ultima condizione, la ridotta vascolarizzazione e la diminuzione della saturazione dell'ossigeno nell'emoglobina dei fumatori creano un microambiente favorevole alla crescita di batteri anaerobi nella cavità orale e aumentano il rischio di sviluppare la *malattia parodontale*. Si tratta di un'infezione opportunistica della microflora orale, favorita dall'abitudine al fumo come dimostra un'incidenza tre volte superiore nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori (Taybos, 2003; Zee, 2009). Nei fumatori, inoltre, la terapia di tale patologia, sia che essa comporti intervento chirurgico o procedure rigenerative, risulta essere più complessa e con prognosi meno favorevole rispetto ai soggetti non fumatori. Uno dei motivi è l'alterazione della capacità delle cellule del sistema immunitario di reagire all'infezione. Il fumo infatti determina uno stato di sensibilizzazione dell'immunità cellulare e un'infiammazione latente che rende l'organismo meno efficiente nel combattere l'infezione batterica (Scott and Singer, 2004). Spesso è riscontrabile anche una reazione eccessiva da parte del sistema immunitario che può portare alla distruzione del tessuto parodontale sano (Scott and Singer, 2004; Zee, 2009). Quest'ultimo dato spiega anche l'alta incidenza di rossore, emorragia e infiammazione delle gengive nei soggetti fumatori. In particolare, è stata dimostrata una stretta correlazione fra l'abitudine al fumo e *lesioni ulcerative delle gengive*

che comporta necrosi tessutale molto dolorosa e favorisce infezioni batteriche e virali della mucosa, dovute anche al rallentamento del processo di guarigione dei danni epiteliali riscontrabile nei fumatori (Bouquot and Schroede, 1992).

Una delle patologie benigne più comuni nei fumatori è la *melanosi* (Figura 9A), ossia l'aumentata pigmentazione della mucosa orale indotta dai composti presenti nel fumo di tabacco e in particolare dalla nicotina che si accumula in modo preferenziale nei tessuti contenenti melanina e ne stimola la produzione (Yerger and Malone, 2006). Il fumo di sigaretta sembra colpire principalmente la pigmentazione a livello della mucosa masticatoria e regredisce molto lentamente in caso di cessazione dell'abitudine al fumo (Mirbod and Ahing, 2000a).

Meno frequente nei fumatori di sigaretta, ma facilmente riscontrabile in coloro che fumano la pipa, la *stomatite nicotinicca* (Figura 9B) è una lesione premaligna che compare sul palato sotto forma di rossore e assume poi l'aspetto di una lesione biancastra puntinata di rosso a causa della cheratinizzazione delle mucosa circostante i dotti delle ghiandole salivari minori che risultano infiammati e dilatati. Questo tipo di alterazione della mucosa orale e delle ghiandole in essa presenti, sono attribuibili al calore più che ai composti chimici irritanti del fumo di tabacco e l'unico trattamento possibile consiste nello smettere di fumare (Mirbod and Ahing, 2000a; Taybos, 2003).

Nei forti fumatori, l'*aspetto villosa della lingua* è determinato dall'ipertrofia delle papille filiformi o dalla ritardata desquamazione della superficie dorsale della lingua (Bouquot and Schroede, 1992).

Tra le lesioni premaligne, la *leucoplachia* (Figura 9C) appare come una regione bianca dovuta a eccessiva e anomala cheratinizzazione dell'epitelio che spesso persiste nei soggetti fumatori anche dopo l'interruzione dell'esposizione al fumo. Nel 3-6% dei casi la leucoplachia va incontro a trasformazione tumorale (Mirbod and Ahing, 2000a).

La *displasia* dell'epitelio orale è invece una lesione neoplastica che coinvolge l'epitelio senza invadere il tessuto connettivo sottostante ed è per questo definita anche carcinoma in situ. Può apparire come una zona bianca o rossa della mucosa a seconda che sia dovuta rispettivamente a iper-cheratosi o atrofia dell'epitelio (Mirbod and Ahing, 2000b).

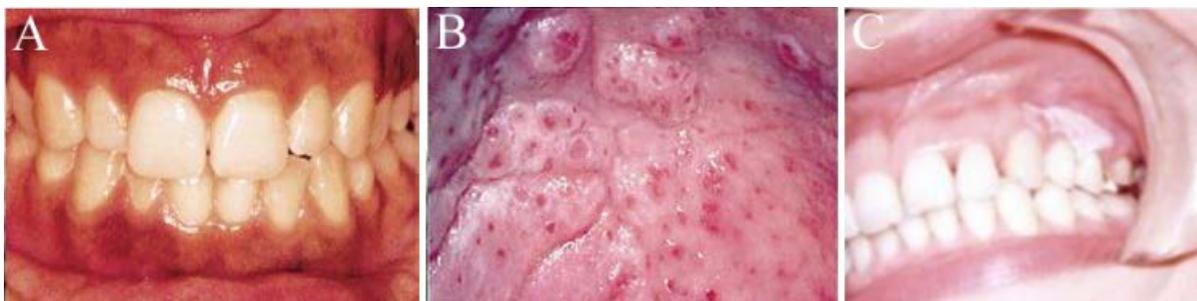


Figura 9. Fotografie di melanosì (A), stomatite nicotinicà (B) e leucoplachia (C) a carico della mucosa orale in soggetti fumatori. A e B: modificate da Mirbod and Ahing (2000). *Journal of the Canadian Dental Association* 66, 252-256. C: da Amagasa T et al. (2011) *International Journal of Clinical Oncology* (2011) 16:5-14

Infine, il *carcinoma delle cellule squamose* è la tipologia più comune di tumore orale che compare nei soggetti fumatori con un'incidenza quattro volte superiore rispetto ai non fumatori e cresce ulteriormente se l'abitudine al fumo è associata all'alcol (Taybos, 2003).

Evidenze sperimentali: fumo di sigaretta e cellule epiteliali

La miscela di molecole che compone il fumo di sigaretta è stata a lungo studiata e ossidanti come aldeidi volatili e radicali liberi dell'ossigeno rappresentano alcune delle principali cause di danno a livello biomolecolare, per la loro capacità di causare danni a lipidi, proteine, carboidrati e DNA all'interno delle cellule. È stata infatti dimostrata la correlazione fra fumo di sigaretta e aberrazioni cromosomiche (Shani et al., 2010), alterazioni del trascrittoma (Boyle et al., 2010) e induzione di apoptosi o necrosi (Wickenden et al., 2003).

Ad oggi, solo pochi gruppi di ricerca si sono focalizzati sull'effetto del fumo in toto sulle cellule epiteliali, mentre la maggior parte valuta la risposta dei cheratinociti a singoli composti. Studi in vitro su cheratinociti epidermici ed orali umani immortalizzati e in linee tumorali hanno dimostrato che l'esposizione prolungata alla nicotina è in grado di inibire la proliferazione (Lee et al., 2005). È stato inoltre riportato che la nicotina agisce, con un effetto dose-dipendente, sulla riorganizzazione dei filamenti citoscheletrici di cheratina inducendo la corneificazione in cheratinociti umani (Theilig et al., 1994). La correlazione fra nicotina e il processo di differenziazione terminale è stata confermata anche su un modello di mucosa orale ricostruita esposta per due settimane alla nicotina in cui risultano alterate la normale citoarchitettura, stratificazione e cheratinizzazione epiteliale (Kwon et al., 1999; Lee et al., 2005). Uno studio effettuato in vivo in ratti sottoposti a trattamento cronico sistemico con

nicotina ha riportato danno tessutale, atrofia e disorganizzazione della membrana plasmatica a carico dei cheratinociti dello strato basale, con conseguente compromissione dell'integrità della mucosa orale (Caldeira et al., 2007).

Più recentemente, in un modello di co-culture di fibroblasti pretrattati con estratti di tabacco masticabile e cheratinociti immortalizzati, è stato indagato l'effetto dei composti presenti nel tabacco sul sistema giunzionale dell'epitelio orale. In tale modello è stata osservata una riduzione significativa dell'espressione di E-caderina nelle giunzioni aderenti e ZO-1 nelle giunzioni occludenti (Coppe et al., 2008). Inoltre, è stato proposto un ruolo delle specie reattive dell'ossigeno e dei radicali organici nel causare la perdita di adesione intercellulare e la funzionalità di barriera fisica contro organismi patogeni in diversi epitelii, causando l'ossidazione delle proteine transmembrana delle giunzioni occludenti (Rao, 2008) e dei filamenti di cheratina negli strati più superficiali dell'epitelio (Thiele et al., 1999).

Recentemente, l'effetto del fumo di sigaretta è stato valutato su cheratinociti orali umani dimostrando inibizione della crescita cellulare, induzione della cascata apoptotica e riduzione nella motilità cellulare, che possono spiegare la disorganizzazione strutturale osservata nello stesso studio su mucosa orale ricostruita (Semlali et al., 2011).

Tuttavia, ad oggi mancano evidenze sperimentali sugli effetti del fumo di sigaretta sulla mucosa orale umana, sia a lungo termine in assenza di manifestazioni cliniche evidenti, sia immediatamente dopo l'esposizione al fumo.

ALENDRONATO DI SODIO

Chimica e farmacodinamica dei bifosfonati

I bifosfonati sono analoghi sintetici dei pirofosfati inorganici che presentano uno scheletro di carbonio e fosforo a cui sono associate due catene laterali a composizione variabile (Figura 10A) che influenzano la potenza di tali farmaci e la loro capacità di legarsi alla componente minerale cristallina dell'osso, l'idrossiapatite (Pazianas, 2011).

In base alla presenza o assenza di azoto nella loro struttura molecolare, i bifosfonati possono essere classificati in due gruppi distinti: i non-amino-bifosfonati (non-ABP) e gli amino-bifosfonati (ABP) che presentano meccanismo d'azione differente. I non-ABP vengono metabolizzati a livello cellulare, in analoghi non idrolizzabili dell'adenosina trifosfato (ATP), gli pseudo-pirofosfati, che competono con i pirofosfati organici per enzimi metabolici quali fosfatasi e pirofosfatasi e alterano la permeabilità mitocondriale (Rogers et al., 2011). Questo comporta un accumulo di analoghi dell'ATP e un metabolismo energetico inefficiente che determina morte per apoptosi della cellula che li ha endocitati. Gli ABP invece inibiscono la farnesil difosfato sintetasi, un enzima chiave della via del mevalonato (Figura 10B), coinvolta nella biosintesi del colesterolo e nella prenilazione delle proteine, una modificazione post-traduzionale essenziale per l'ancoraggio alla membrana plasmatica di proteine di segnalazione cellulare come Rho, Ras e Rac (Rogers et al., 2011). La capacità di inibire questo enzima, insieme all'affinità per il tessuto osseo, fanno sì che gli ABP possano bloccare l'isoprenilazione negli osteoclasti inducendo morte cellulare per apoptosi e conseguente inibizione del riassorbimento osseo (Russell et al., 1999; Bhandari, 2003; Green, 2003; Conte and Guarneri, 2004).

L'affinità dei bifosfonati per il calcio e la loro capacità di inibirne il riassorbimento hanno determinato il loro utilizzo in numerose patologie fra cui la malattia di Paget, l'osteoporosi, l'artrite, l'ipercalcemia neoplastica e anche per prevenire metastasi ossee, con vie di somministrazioni differenti, parenterale o orale, in base alla dose necessaria all'induzione dell'effetto terapeutico. Si ritiene inoltre che possano essere di grande utilità in odontoiatria poiché l'utilizzo controllato di ABP per via orale induce una più rapida osseo-integrazione degli impianti e favorisce l'esito positivo delle terapie parodontali (Zavras, 2011).

L'emivita degli ABP nell'organismo è piuttosto elevata grazie alla loro tendenza ad accumularsi nell'osso, localizzandosi preferenzialmente nelle sedi a maggior attività metabolica, dove rimangono anche per più di 10-12 anni (Melo and Obeid, 2005) e vengono poi rilasciati quando l'osso che li contiene è soggetto a riassorbimento poiché nelle lacune in cui avviene riassorbimento attivo si crea un ambiente a pH acido che favorisce il rilascio di farmaco (Rogers et al., 2011). Gli ABP si distribuiscono rapidamente anche in altri distretti, dove però le loro concentrazioni decrescono molto velocemente.

Quando gli ABP vengono assunti per via orale, come nel caso di alendronato, pamidronato e ibandronato, l'assorbimento del farmaco è limitato (1-10%) e ciò comporta inevitabilmente l'utilizzo di dosi elevate per aumentare la biodisponibilità. Tra gli effetti indesiderati, i più gravi in ordine di incidenza, sono i problemi gastrointestinali quali esofagiti, nausea, vomito e diarrea (Brown et al., 2004). A partire dal 2003 è stato identificato un altro grave effetto collaterale dell'assunzione degli ABP, l'osteonecrosi delle ossa mascellari indotta da bifosfonati (ONM-B) (Zavras, 2011).

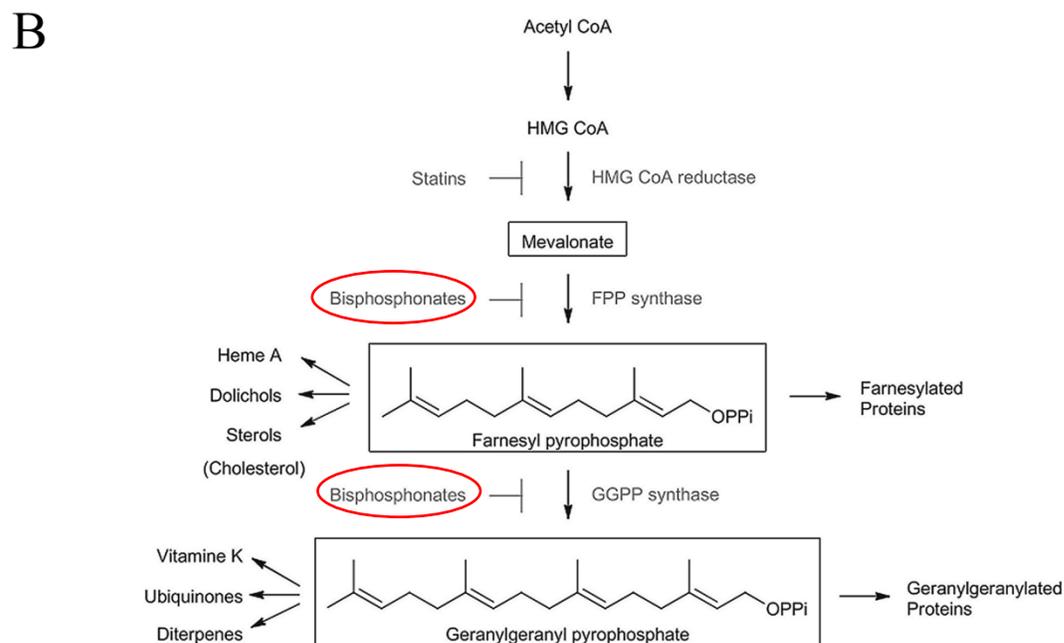
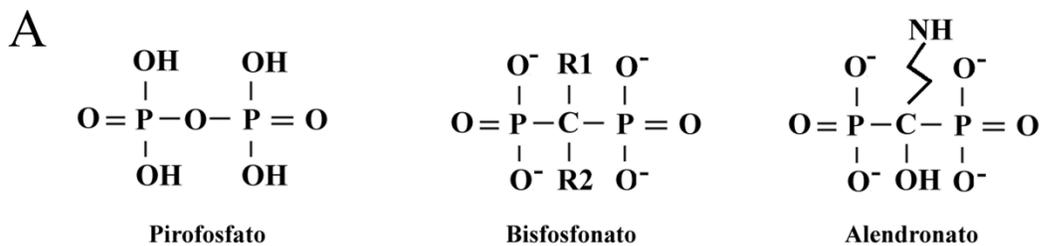


Figura 10. A: Formule chimiche di pirofosfato inorganico, bifosfonato e alendronato. R1 e R2 indicano due catene laterali a composizione variabile. B: Rappresentazione schematica della via del mevalonato e dei meccanismi di biosintesi in cui è inserita. Sono riportati i siti di azione degli amino-bifosfonati evidenziati in rosso. Modificato da Nürenberg and Volmer (2011) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 671-685.

Evidenze cliniche: osteonecrosi delle ossa mascellari indotta da bifosfonati

L'ONM-B è una lesione della mucosa con esposizione di osso necrotico nella cavità orale che non si rimargina e persiste per almeno 8 settimane in pazienti non sottoposti in precedenza a radioterapia, ma che stiano seguendo o abbiano seguito in tempi recenti una terapia con bifosfonati (Figura 11) (Pazianas, 2011; Zavras, 2011).

Nel 70-80% dei casi, l'ONM-B consegue alla mancata o ritardata guarigione delle ossa mascellari o mandibolari dopo interventi di chirurgia orale (Hughes et al., 1989; Hughes et al., 1995), mentre nel 25-40% dei casi insorge spontaneamente senza alcuna correlazione a traumi (Vitte et al., 1996; Santini et al., 2002). In questi casi tra i primi sintomi vi è la graduale alterazione della mucosa orale con formazione di ulcere persistenti che possono facilitare infezioni della porzione ossea necrotizzata. Poiché tali eventi a carico della tonaca mucosa della cavità orale precedono l'osteonecrosi vera e propria, è di grande interesse comprendere i dettagli dell'eziopatogenesi dell'ONM-B focalizzando l'attenzione sulle conseguenze degli ABP sulla mucosa orale umana.

È stato dimostrato che la durata della terapia con bifosfonati è direttamente correlata a un maggior rischio di insorgenza dell'ONM-B, ma è stata riportata anche una stretta correlazione con altri fattori quali sesso femminile, età avanzata, edentulie, terapie antineoplastiche combinate, igiene orale scorretta, stato nutrizionale, alcolismo, tabagismo e procedure odontoiatriche invasive che spesso costituiscono l'evento scatenante per l'insorgenza della patologia (Zavras, 2011).

L'incidenza e la rapidità di comparsa dei sintomi sono maggiori in pazienti oncologici che assumono alte concentrazioni di farmaci per via parenterale, mentre basse concentrazioni di ABP assunti per via orale determinano l'insorgenza degli effetti indesiderati dopo un tempo minimo di tre anni di terapia (Zavras, 2011). Nonostante i farmaci assunti per via orale sembrino essere quindi quelli meno rischiosi, essi richiamano grande interesse nella comunità scientifica per il loro utilizzo su larga scala nel trattamento dell'osteoporosi e per le potenziali applicazioni in ambito odontoiatrico.

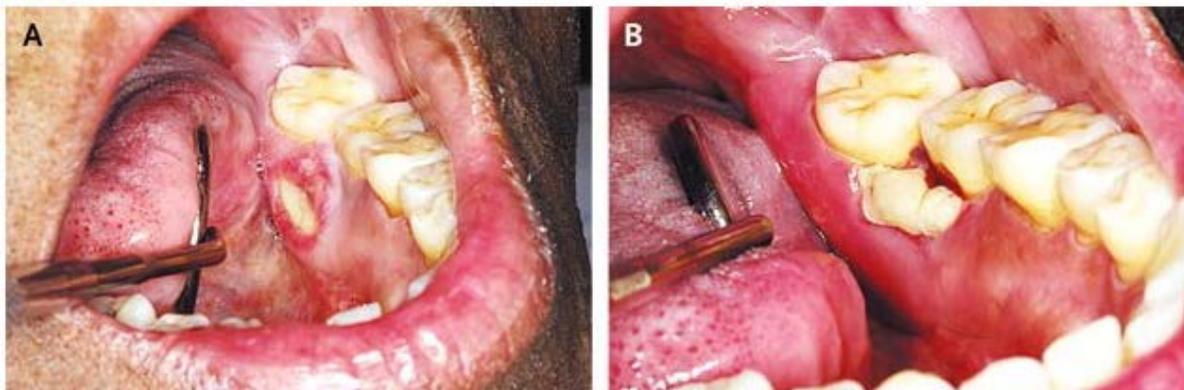


Figura 11. Fotografie di osteonecrosi delle ossa mascellari indotta da bifosfonati. Modificato da Treister N (2006) *New England Joournal of Medicine* 355, 2348.

Una delle ipotesi più accreditate sulla patogenesi dell'ONM-B si basa sulla considerazione che le ossa mascellari vanno incontro a un rimodellamento continuo, con velocità molto superiori rispetto alle altre zone del corpo a causa delle forze meccaniche che agiscono costantemente su di esse; ciò determina un maggiore uptake di ABP che qui si concentrano rapidamente e in quantità elevate. A causa dell'apoptosi degli osteoclasti indotta dagli agenti farmacologici, l'accumulo di ABP determina l'inibizione del rimodellamento osseo e la conseguente iper-mineralizzazione. Si ritiene che in seguito a ulteriori stimoli al rimodellamento o ad un trauma come l'estrazione di un dente, l'incapacità dell'osso di adattarsi provochi la formazione di microfratture che, non potendo essere riparate, inducono necrosi ossea (Chapurlat et al., 2007). Inoltre, le ossa mascellari sono separate dall'ambiente esterno da pochi millimetri di mucosa orale facilmente danneggiata da attività fisiologiche come la masticazione. L'esposizione alla microflora del cavo orale durante interventi di chirurgia dento-alveolare, come estrazioni, chirurgia parodontale e chirurgia endodontica, facilita anche l'insorgenza di infezioni che possono predisporre alla comparsa dell'ONM-B. Alcuni autori ritengono che l'origine di questo grave effetto collaterale risieda nel rilascio locale di elevate concentrazioni di ABP dopo interventi di chirurgia orale. Ciò potrebbe causare un effetto citotossico diretto sulla mucosa, reversibile con l'applicazione topica dei metaboliti della via del mevalonato (Reid et al., 2007). Tuttavia, questa ipotesi non spiega l'elevata percentuale di pazienti in cui l'ONM-B non consegue a traumi. Altri autori hanno anche suggerito un ruolo chiave dell'infiammazione che può originare da microfratture dell'osso e può ripercuotersi con conseguenze dannose sulla mucosa (Lesclous et al., 2009).

Inoltre, l'effetto antiangiogenetico degli ABP potrebbe spiegare sia gli effetti terapeutici sulle masse tumorali sia l'induzione della necrosi della mucosa orale, ma le evidenze scientifiche in letteratura a sostegno di questa ipotesi sono contrastanti (Lesclous et al., 2009; Morgan et al., 2009; Scheller et al., 2011).

Evidenze sperimentali: bifosfonati e cellule epiteliali

Focalizzando l'attenzione sugli effetti degli ABP sull'epitelio, Reszka et al nel 2001 avevano dimostrato come questi farmaci fossero in grado di bloccare il ciclo cellulare dei cheratinociti con un'azione dose-dipendente (Reszka et al., 2001). Numerosi studi sono stati condotti sull'epitelio esofageo poiché le ulcerazioni a questo livello sono tra i primi effetti indesiderati dell'assunzione degli ABP. In particolare nel coniglio è stata dimostrata la capacità dell'alendronato di alterare il trasporto di ioni a livello dell'epitelio esofageo e di causare danni consistenti in condizioni di pH acido (Dobrucali et al., 2002).

Su monostrati di cellule epiteliali intestinali la citotossicità del pamidronato e dell'alendronato è stata anche attribuita all'induzione di una maggiore permeabilità cellulare e a un accumulo locale di farmaco dovuto alla formazione di complessi insolubili con il calcio, che precipitano sulla superficie della membrana cellulare (Twiss et al., 1994; Twiss et al., 1999). Inoltre gli ABP hanno mostrato la capacità di causare morte cellulare in un modello di epitelio gastro-intestinale e danno all'epitelio indipendentemente dall'effetto anti-angiogenico svolto sul microcircolo (Wallace et al., 1999; Suri et al., 2001).

Su cheratinociti orali coltivati in vitro gli ABP sembrano indurre la diminuzione del numero di cellule p63-positive, un marcatore delle cellule basali e staminali dell'epitelio, ed inibiscono la proliferazione cellulare (Landesberg et al., 2008; Scheller et al., 2011). Tuttavia, l'alterazione dell'omeostasi delle cellule epiteliali è stata correlata a un blocco del ciclo cellulare e all'induzione della senescenza, ma non sono state riportate evidenze di induzione di apoptosi (Kim et al., 2011; Landesberg et al., 2008). I dati in letteratura ad oggi riportati sembrerebbero quindi fornire strumenti per spiegare la dimostrata perdita di capacità da parte dei cheratinociti di riparare un danno all'epitelio in seguito all'esposizione a ABP (Landesberg et al., 2008), nonostante vi siano ancora molti aspetti da chiarire.

Il crescente utilizzo degli ABP nelle donne con osteoporosi post-menopausale e l'interesse per

l'affiancamento di questa terapia farmacologica alle attuali pratiche odontoiatriche impongono di accertare la sicurezza di tali farmaci valutandone le effettive conseguenze sulla mucosa orale umana e stabilendo i fattori coinvolti nella sensibilità e suscettibilità di alcuni soggetti alla comparsa dell'ONM-B.

Benché vi sia una tendenza comune a minimizzare gli effetti negativi degli ABP assunti per via orale sulla mucosa orale umana, gli studi ad oggi condotti sono concordi nell'attribuire a questi farmaci un effetto anti-proliferativo sui cheratinociti, ma non è stata ancora fornita nessuna chiara spiegazione per la presenza di lesioni della mucosa antecedenti la necrosi ossea in pazienti non sottoposti a interventi di chirurgia orale.

SCOPO DEL LAVORO

Durante i tre anni del Corso di Dottorato in Scienze Morfologiche nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* (Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano) ho collaborato all'analisi morfologica delle modificazioni a carico dell'epitelio orale umano indotte dall'esposizione cronica e acuta a stimoli esogeni fisici e chimici, in particolare fumo di sigaretta e alendronato di sodio.

Per tale studio sono state utilizzate metodiche di microscopia ottica ed elettronica. Colorazioni istochimiche e reazioni di immunofluorescenza indiretta hanno permesso la valutazione della localizzazione di specifiche proteine di membrana, citosoliche e nucleari.

Per entrambi gli stimoli esogeni sono state analizzate biopsie di mucosa orale cheratinizzata corneificata normale da soggetti esposti cronicamente all'agente esterno. In seguito i dati raccolti sull'esposizione cronica al fumo di sigaretta sono stati confrontati con quelli ottenuti dopo tre ore dall'esposizione della mucosa orale umana normale al fumo di una sigaretta, valutando così la risposta a breve termine dell'epitelio orale in un modello tridimensionale di colture organotipiche.

I parametri analizzati sono riassunti qui di seguito:

- **morfologia** dell'epitelio in microscopia ottica su sezioni in paraffina dopo reazioni istochimiche;
- **ultrastruttura** dell'epitelio orale e della giunzione epitelio-mesenchimale mediante analisi al microscopio elettronico a trasmissione;
- **differenziazione terminale** e **adesione intercellulare** mediante localizzazione di marcatori specifici con reazioni di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina e quantificazione dell'espressione di singole proteine con metodiche di analisi d'immagine;
- omeostasi epiteliale tramite analisi quantitativa della **proliferazione** cellulare e individuazione di **cellule apoptotiche** nello spessore epiteliale con reazioni di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina e microscopia elettronica a trasmissione.

FUMO DI SIGARETTA

Per la presenza al suo interno di molte sostanze cancerogene, l'effetto del fumo sull'organismo è stato ampiamente studiato dal punto di vista dei danni al DNA ed è stata prestata anche particolare attenzione agli effetti sull'epitelio respiratorio per l'azione ciliotossica di molti composti, che determina un consistente danno alla funzionalità dell'apparato respiratorio. Tuttavia poco è noto sulle conseguenze indotte dal fumo di sigaretta sulla citoarchitettura e sulla risposta della mucosa orale umana.

La cavità orale è la camera di combustione del fumo di sigaretta, dove hanno luogo le reazioni chimiche a catena che generano le migliaia di molecole che lo compongono e la mucosa orale è la prima barriera dell'organismo a dover fronteggiare i prodotti di questa combustione nonché il calore del fumo stesso. Il ruolo di difesa della mucosa orale è quindi essenziale nella protezione dell'organismo da composti genotossici, citotossici e ossidanti che caratterizzano il fumo di sigaretta.

Gli effetti dell'esposizione cronica al fumo sulla mucosa orale umana cheratinizzata corneificata clinicamente normale sono stati oggetto di uno studio preliminare che ha rappresentato la mia tesi di Laurea Magistrale in *Biologia Applicata alla Ricerca Biomedica* conseguita presso l'Università degli Studi di Milano. Nei primi mesi del mio Dottorato di Ricerca mi sono occupata di implementare l'analisi morfologica, integrare i dati relativi all'espressione di proteine di adesione presenti in desmosomi, giunzioni aderenti e occludenti e approfondire i dati sulla vitalità dell'epitelio orale nei soggetti fumatori misurando il tasso di proliferazione epiteliale. Successivamente, per comprendere le diverse fasi che portano al danno registrato nella mucosa orale dei soggetti fumatori e il processo di adattamento antecedente le note manifestazioni cliniche, lo studio è proseguito con l'indagine dell'effetto dell'esposizione acuta al fumo di sigaretta in un modello anatomico capace di riprodurre in vitro la struttura e l'architettura tridimensionale della mucosa orale umana.

La sempre maggiore diffusione dell'abitudine al fumo fra la popolazione femminile e fra i giovani (Warnakulasuriya, 2009) e i dati riportati in letteratura sulla diversa risposta cellulare a livello trascrizionale fra uomini e donne, ha reso necessario limitare lo studio a soggetti

volontari di uno stesso sesso. Inoltre, nonostante i dati epidemiologici riportino una maggiore incidenza del tumore orale e dell'orofaringe nei soggetti di sesso maschile (Petersen, 2009; Warnakulasuriya, 2009), il quadro ormonale femminile comporta un maggior rischio di formazione di masse tumorali nelle donne a causa del differente stato di attivazione degli enzimi detossificanti (Boyle et al., 2010). Per tali motivi, lo studio è stato condotto su donne volontarie sane di età inferiore a 40 anni.

METODI

Esposizione cronica al fumo di sigaretta

Biopsie di mucosa orale cheratinizzata corneificata normale sono state prelevate da donne volontarie fumatrici (n=5) e non fumatrici (n=5) dopo firma del consenso informato durante interventi di rimozione degli ottavi inclusi. La mucosa orale non presentava all'esame obiettivo alterazioni macroscopiche o segni di infiammazione. I campioni sono stati trasportati al *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* immersi in soluzione fisiologica sterile. In laboratorio le biopsie sono state suddivise con bisturi sterile in più frammenti e immerse in terreno di coltura preparato come da protocollo descritto in Tabella A1, contenente 5-bromo-2'-deossiridina (BrdU – 400 µM), un analogo non radioattivo della timidina incorporato selettivamente dalle cellule in fase S del ciclo cellulare. Alcuni frammenti biotici sono stati processati per la microscopia ottica ed altri per la microscopia elettronica a trasmissione secondo i protocolli riportati in Tabella A2.

Esposizione acuta al fumo di sigaretta

Biopsie di mucosa orale cheratinizzata corneificata normale sono state ottenute da donne volontarie non fumatrici (n=5) sotto i 40 anni di età durante interventi di rimozione degli ottavi inclusi, dopo visione e firma del consenso informato. I campioni sono stati trasportati al *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* immersi in soluzione fisiologica sterile. In laboratorio le biopsie sono state suddivise con bisturi sterile in tre frammenti. Uno di essi è stato immediatamente immerso in terreno di coltura contenente BrdU 400 µM e poi processato per la microscopia ottica secondo il protocollo descritto in Tabella A2. Gli altri due frammenti sono stati collocati in coltura in un sistema Transwell con il compartimento epiteliale rivolto verso l'alto, in uno stato di semi-immersione e mantenuti in incubatore umidificato (37 °C - 5% CO₂) per sei ore secondo il protocollo standardizzato nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* (Donetti et al., 2009). Il campione processato immediatamente dopo il prelievo, definito basale, è stato sempre utilizzato come controllo interno per verificare che la messa in coltura dei frammenti biotici non abbia introdotto alterazioni nei parametri analizzati.

Uno dei frammenti in coltura è stato poi esposto al fumo diretto di sigaretta mediante uno strumento realizzato in laboratorio ispirandosi a quello messo a punto dal gruppo di ricerca di Colombo e colleghi (Colombo et al., 2010) (Figura 12A). Tramite una siringa e un sistema di cannule, lo strumento ha permesso di convogliare la corrente di fumo principale originato da una sigaretta da ricerca (Research Cigarettes 3R4F - Università del Kentucky) in una fiasca contenente la biopsia di mucosa orale semi-immersa in tampone fosfato (Phosphate Buffer Saline – PBS, Tabella A3). La mucosa orale è stata esposta per cinque minuti al fumo con periodico ricircolo di aria (Figura 12B), a simulare l'effettiva esposizione al fumo che si verifica nella cavità orale di un soggetto fumatore. Lo schema riportato in Figura 12C riassume i passaggi di aspirazione, esposizione al fumo della biopsia e di nuova aspirazione eseguiti fino a esaurimento della sigaretta.

Il restante frammento di mucosa orale ha subito le stesse variazioni di temperatura e liquido di immersione (PBS durante il periodo di esposizione al fumo) del campione esposto al fumo di sigaretta così da costituire il controllo interno dell'esperimento. Dopo il trattamento, i campioni sono stati ricollocati nel sistema Transwell con terreno di coltura fresco contenente BrdU 400 μM e mantenuti in incubatore umidificato (37°C - 5% CO₂) per tre ore. Infine, le biopsie sono state ulteriormente suddivise in due frammenti ciascuna e processate per la microscopia ottica ed elettronica come descritto in Tabella A2.

La scelta di semi-immersione i frammenti bioptici in PBS e non terreno di coltura durante l'esposizione al fumo è legata alla possibilità che si inneschino reazioni chimiche fra le molecole organiche presenti nel terreno e la miscela di composti che costituisce il fumo di sigaretta. Questo avrebbe comportato l'introduzione nel sistema sperimentale di variabili difficilmente controllabili.

Processazione e analisi morfologica dei campioni

Sezioni in paraffina di 4 μm sono state raccolte su vetrini xilanizzati (Tabella A4) e colorate con ematossilina eosina e colorazione tetracromica di Dane-Herman secondo i protocolli standard riassunti in Tabella A5. Su sezioni adiacenti sono state eseguite reazioni di immunofluorescenza indiretta per la valutazione della distribuzione dei marcatori di differenziazione terminale (K14 e K10), delle proteine di adesione (Dsg1, Dsg3, E-caderina, β -catenina e occludina) e di eventuali cellule apoptotiche (caspasi 3 attivata e p53). Uno

schema dei protocolli seguiti è fornito in Tabella A6. L'osservazione è stata condotta con microscopio a epifluorescenza Nikon Eclipse 80i corredato da fotocamera digitale DS-5Mc (Nikon, Giappone).

Per quantificare l'espressione della Dsg3 nei campioni di mucosa orale da soggetti fumatori e nei rispettivi controlli è stata misurata la densità ottica (OD) della marcatura fluorescente con il software Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) su microfotografie digitali ottenute al microscopio Nikon Eclipse 80i a ingrandimento 20X con risoluzione 1280x960 (programma di acquisizione Nis-Elements 2.3, Nikon). Tutte le fotografie sono state ottenute mantenendo costante il tempo di esposizione. Per ciascun soggetto, sono state eseguite almeno tre reazioni di immunofluorescenza, considerando due vetrini per esperimento. Su ciascun vetrino erano presenti almeno due sezioni positive e una negativa (omissione dell'anticorpo primario) e le immagini ottenute rappresentavano l'intera superficie della sezione. Il software Image Pro Plus è stato calibrato assegnando un rapporto pixel/ μm specifico per l'ingrandimento e la risoluzione impostati durante l'acquisizione dell'immagine al microscopio. Il programma ha permesso di ottenere un valore di densità ottica integrata (IOD) dalle microfotografie dopo conversione da colori reali a scala di grigi a otto bit con colori invertiti. Tale conversione è stata necessaria per evitare la presenza di pixel neri nell'immagine, poiché la formula per la IOD attribuisce valore di IOD infinito ai pixel di colore nero. Per ogni immagine è stata selezionata manualmente l'area di epitelio da cui il software ha ricavato il dato di IOD. Dai valori di IOD e dell'area selezionata, il programma ha calcolato automaticamente la OD che corrisponde alla IOD normalizzata per l'area. L'OD misurata sulle sezioni di controllo negativo e sottratta al valore di ogni campione positivo, ha permesso di escludere dalla quantificazione l'eventuale contributo dell'autofluorescenza del tessuto. Per ogni gruppo sperimentale i valori sono stati espressi come valore medio di OD \pm 1 deviazione standard. I dati sono stati analizzati con il test statistico non parametrico di Mann-Whitney per dati non appaiati (VassarStats - R. Lowry, Vassar College, Poughkeepsie, NY, USA). La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

Per quanto riguarda i campioni di mucosa orale esposti al fumo di una singola sigaretta e i relativi controlli, l'espressione della K14 è stata quantificata misurando la OD su microfotografie digitali dell'intero epitelio con il microscopio a epifluorescenza Nikon Eclipse 80i dotato di fotocamera digitale, utilizzando l'obiettivo 20X, come precedentemente

descritto. Rispetto a quanto riportato per la Dsg3, tuttavia, il protocollo di misurazione della OD per la K14 è stato modificato per ottenere non soltanto dati di OD relativi all'intero compartimento epiteliale, ma anche specifici per il monostrato basale e gli strati soprabasali. Tramite il software Paint Shop Pro 5.0 (Corel Inc., CA, Stati Uniti) sulle fotografie è stata creata una maschera in cui i pixel corrispondenti allo strato basale, agli strati soprabasali e alle zone non epiteliali sono stati colorati ciascuno con una diversa tonalità di colore. I colori scelti sono stati mantenuti sempre uguali per ogni fotografia. Tramite Matlab (MathWorks, MA, Stati Uniti), un programma ad hoc ha calcolato l'OD di ciascun pixel mettendo in relazione la maschera con la fotografia corrispondente e restituendoci quindi valori di OD distinti per lo strato basale, gli strati soprabasali e per l'intero spessore epiteliale. Al dato ottenuto per ogni sezione positiva è stato sottratto il valore di OD della sezione negativa presente sullo stesso vetrino per escludere dalla misurazione l'eventuale contributo dell'autofluorescenza. I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando il test non parametrico di Wilcoxon per campioni appaiati. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

Per valutare il tasso di proliferazione cellulare, sono state eseguite reazioni di immunofluorescenza per la rivelazione delle cellule che hanno incorporato la BrdU nelle tre ore di incubazione. L'osservazione al microscopio a epifluorescenza ha permesso di valutare la localizzazione delle cellule in divisione che in condizioni fisiologiche sono limitate al monostrato basale dell'epitelio. Per quantificare il tasso di proliferazione, le cellule BrdU-positive sono state contate in tutta l'area di epitelio. Parallelamente su sezioni colorate con ematossilina-eosina, adiacenti a quelle analizzate in immunofluorescenza, è stata misurata l'area di epitelio vitale (strato corneo escluso) grazie al software di analisi d'immagine Image Pro Plus 4.5 opportunamente calibrato. L'area da misurare è stata selezionata manualmente su immagini digitali ottenute con microscopio Nikon Eclipse 80i a ingrandimento 10X. Il numero di cellule proliferanti è stato poi normalizzato per mm^2 di epitelio vitale.

I tassi di proliferazione epiteliale relativi ai campioni esposti in modo cronico e acuto al fumo di sigaretta sono stati analizzati rispettivamente con il test statistico non parametrico di Mann-Whitney e di Wilcoxon. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

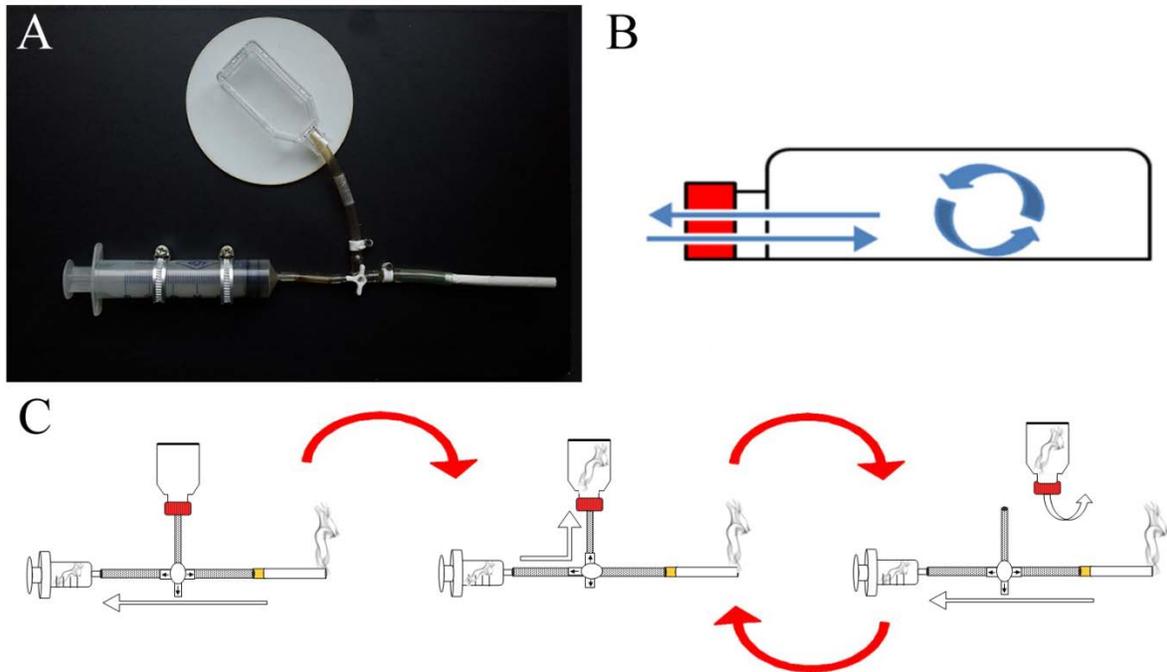


Figura 12. A: Fotografia dello strumento realizzato nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* per l'esposizione acuta al fumo di sigaretta di biopsie di mucosa orale umana. B: Schema illustrante il ricircolo di aria all'interno della fiasca contenente la biopsia C: Rappresentazione schematica delle fasi di esposizione al fumo della mucosa orale umana. Le frecce bianche indicano la direzione del fumo, le frecce rosse sottolineano la ripetizione ciclica delle ultime due fasi fino all'esaurimento della sigaretta. Modificato da Gualerzi et al. (2012) *Inhalation Toxicology* 24, 382–389.

RISULTATI

Sono di seguito riassunte le osservazioni riguardanti morfologia e ultrastruttura dell'epitelio, differenziazione terminale, adesione intercellulare e omeostasi epiteliale ottenute nei campioni di mucosa orale umana dopo esposizione cronica e acuta a fumo di sigaretta.

Esposizione cronica al fumo di sigaretta

Analisi morfologica

L'analisi al microscopio ottico delle sezioni in paraffina colorate con ematossilina-eosina ha dimostrato il mantenimento della normale citoarchitettura e stratificazione dell'epitelio orale nel gruppo controllo e nei soggetti fumatori (Figure 13A e 13B). L'epitelio orale dei soggetti fumatori presentava tuttavia isolati cheratinociti ipertrofici con citoplasma pallido negli strati intermedi e superficiali dello strato spinoso (freccia in Figura 13B). Tali cellule sono state identificate anche sulle sezioni colorate con il metodo di Dane-Herman, rivelando un ridotto contenuto di cheratine in alcune cellule dello strato spinoso, mentre nei campioni controllo la colorazione risultava uniforme in tutto il compartimento epiteliale vitale (Figure 13C e 13D).

Differenziazione terminale

Nei soggetti non fumatori e fumatori gli esperimenti di immunofluorescenza indiretta per la *K14* hanno rivelato la localizzazione di tale isoforma di cheratina a livello del citosol delle cellule basali dell'epitelio orale (Figure 14A e 14B).

L'immunomarcatura citoplasmatica della *K10* nei soggetti non fumatori era uniforme a partire dallo strato spinoso fino allo strato corneo, ma non era presente nello strato basale (Figura 14C). Nell'epitelio orale dei soggetti fumatori, questa cheratina era invece localizzata in maniera non omogenea, con cheratinociti spinosi dalla marcatura molto debole o addirittura assente (Figura 14D).

L'analisi ultrastrutturale in microscopia elettronica a trasmissione ha permesso di individuare nello strato spinoso alto dell'epitelio dei soggetti fumatori cellule di grandi dimensioni non presenti nello stesso compartimento in individui non fumatori (Figure 14E e 14F). Queste cellule ipertrofiche, già notate in microscopia ottica, presentavano giunzioni desmosomiali

integre, ma il citoplasma non mostrava gli abbondanti tonofilamenti tipici di questo strato che normalmente conferiscono elettronegatività ai cheratinociti spinosi.

Adesione intercellulare

L'analisi dell'adesione intercellulare mediata da *desmosomi* ha rivelato una distribuzione confrontabile della caderina Dsg1 nei soggetti non fumatori e fumatori, con un gradiente crescente di espressione procedendo dagli strati profondi dell'epitelio verso la superficie e rimanendo presente anche nello strato corneo (Figure 15A e 15B).

Sono state riscontrate invece variazioni nella distribuzione della caderina Dsg3 nei soggetti fumatori. Nel gruppo di controllo l'immunoreattività specifica per la Dsg3 aumentava progressivamente dallo strato basale verso lo strato spinoso, diminuiva nello strato granulare e non era mai presente nello strato corneo (Figura 15C). Nell'epitelio orale dei soggetti fumatori invece la marcatura rimaneva confinata agli strati alti del compartimento spinoso (Figura 15D). La misurazione della OD specifica per la Dsg3 ha confermato la riduzione di espressione di questa isoforma di caderina nei campioni del gruppo dei fumatori (0,027 unità OD \pm 0,007) rispetto ai non fumatori (0,040 unità OD \pm 0,009). Nonostante la considerevole variabilità interindividuale riscontrata fra i soggetti fumatori, tale riduzione è risultata statisticamente significativa ($p < 0,01$) dopo analisi con il test non parametrico per dati non appaiati Mann-Whitney (Figura 16).

Per completare l'analisi dell'adesione intercellulare è stata valutata l'espressione di E-caderina e β -catenina nelle *giunzioni aderenti*. La localizzazione di entrambe le proteine è risultata confrontabile nei due gruppi sperimentali con la E-caderina espressa dallo strato basale allo strato granulare dell'epitelio (Figure 17A e 17B). La β -catenina era invece localizzata a livello della membrana plasmatica dei cheratinociti degli strati basale e spinoso, mentre assumeva localizzazione citoplasmatica a livello dei cheratinociti granulari in entrambi i gruppi sperimentali (Figure 17C e 17D).

In modo analogo, nessuna differenza è stata riscontrata nelle *giunzioni occludenti* analizzando la distribuzione dell'occludina, che mostrava la tipica marcatura frammentata a livello della membrana plasmatica dei cheratinociti granulari nei soggetti controllo e nei fumatori (Figure 17E e 17F).

Proliferazione epiteliale e apoptosi

L'analisi delle cellule incorporanti la BrdU ha messo in luce notevoli differenze nel tasso di *proliferazione epiteliale* fra i soggetti fumatori come evidenziato nel grafico riportato in Figura 18. Nel gruppo controllo, i dati erano molto più omogenei e sono rappresentati nel grafico dalla linea rossa in corrispondenza del valore medio di questi soggetti. L'analisi statistica eseguita sui valori ottenuti nei due gruppi sperimentali ha rivelato una tendenza alla diminuzione della proliferazione dopo esposizione cronica al fumo ($124,14 \text{ BrdU/mm}^2 \pm 87,06$) rispetto ai soggetti controllo ($161 \text{ BrdU/mm}^2 \pm 42,02$), senza tuttavia raggiungere la significatività statistica dopo analisi con il test di Mann-Whitney.

Infine, esperimenti di immunofluorescenza per la rivelazione della caspasi 3 attivata e l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione non hanno rivelato la presenza di *cellule apoptotiche* nei due gruppi sperimentali (dati non presentati).

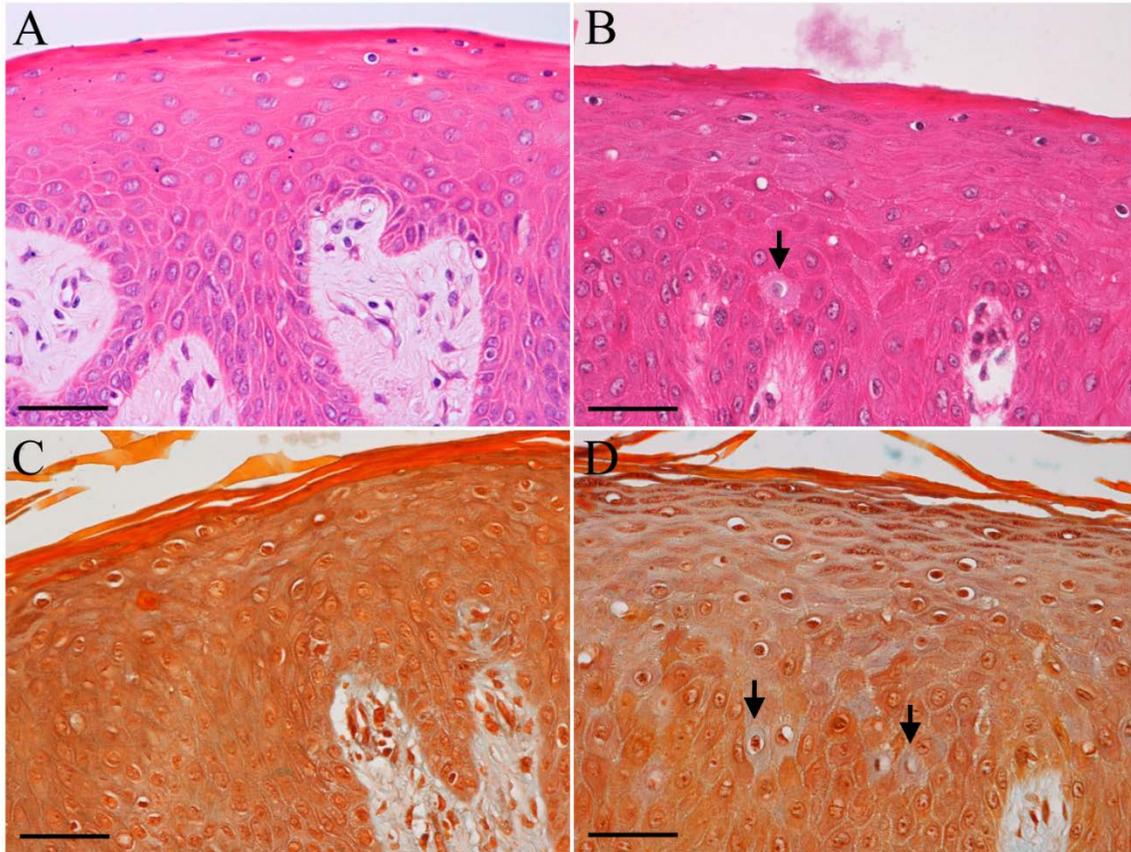


Figura 13. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana colorate con ematossilina-eosina (A e B) e tetracromica di Dane-Herman (C e D). A, C: soggetto non fumatore; B, D: soggetto fumatore. Dopo colorazione Dane-Herman gli strati spinoso e granulare risultavano debolmente colorati nei soggetti fumatori. In B e D le frecce nere indicano cheratinociti ipertrofici. Barra = 50 μ m.

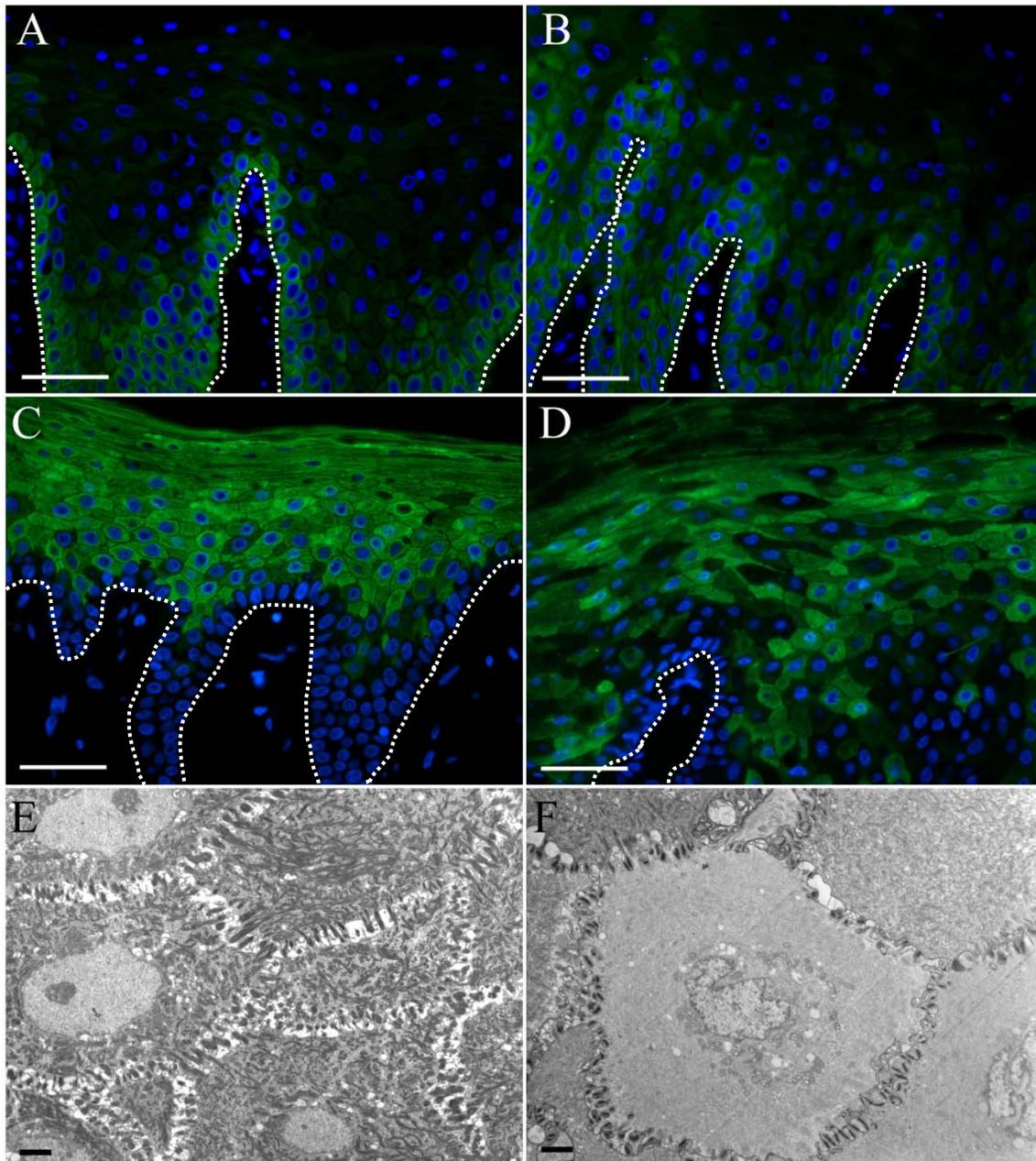


Figura 14. A-D: Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di K14 (A e B) e K10 (C e D). Nei soggetti fumatori la marcatura per la K10 è risultata disomogenea. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μm . E, F: Fotografie al microscopio elettronico a trasmissione di cheratinociti spinosi in sezioni di mucosa orale umana corneificata. In E sono visibili cheratinociti ipertrofici dello strato spinoso con giunzioni preservate. Barra = 2 μm . A, C, E: soggetto non fumatore; B, D, F: soggetto fumatore. K14: cheratina 14; K10: cheratina 10; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

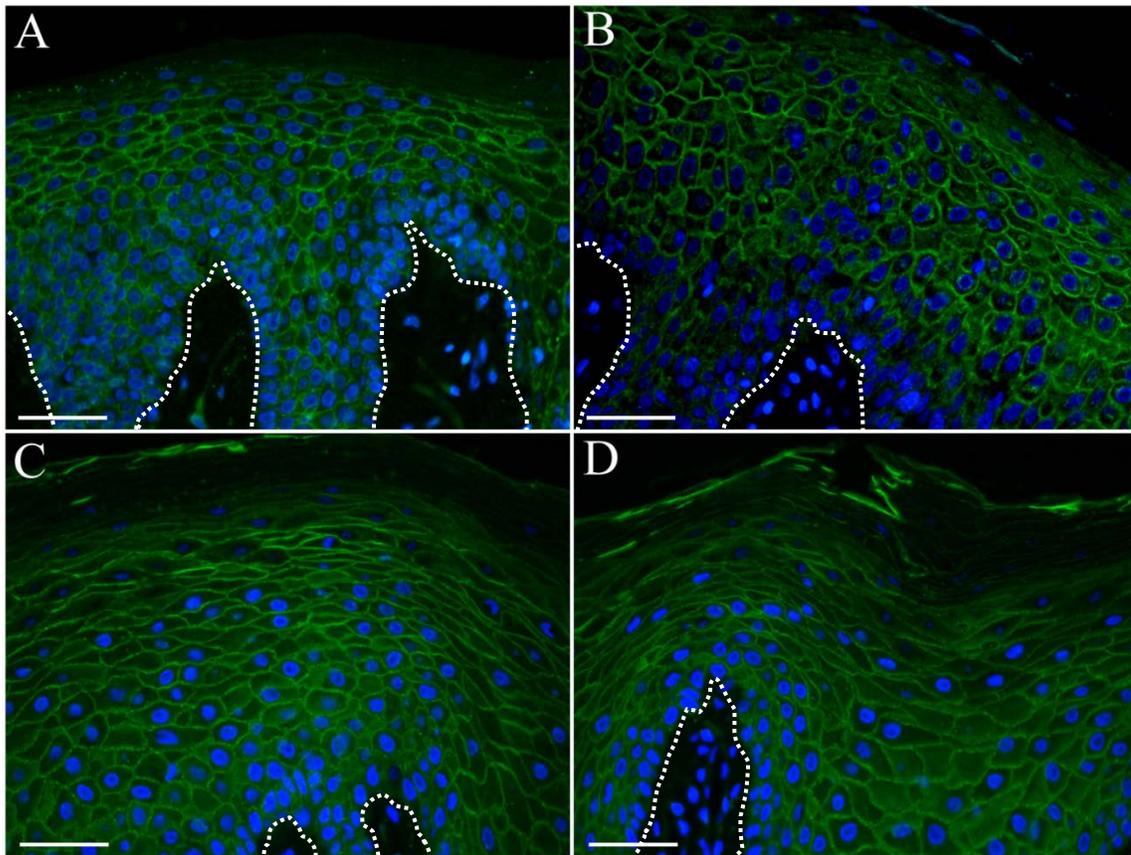


Figura 15. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di Dsg1 (A e B) e Dsg3 (C e D). A e C: soggetto non fumatore; B e D: soggetto fumatore. Nei soggetti fumatori, la Dsg1 è risultata omogeneamente distribuita in tutto l'epitelio orale, mentre l'espressione della Dsg3 è ridotta negli strati più differenziati. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μ m. Dsg1: desmogleina 1; Dsg3: desmogleina 3, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

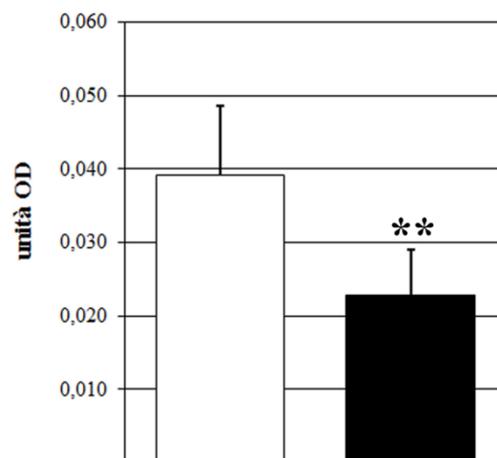


Figura 16. Analisi quantitativa dell'espressione della Dsg3 nella mucosa orale corneificata umana. Sono riportati i valori medi di OD (+ 1 deviazione standard) per la Dsg3 ottenuti nei due gruppi sperimentali (n = 5). Colonna bianca: soggetti non fumatori; colonna nera: soggetti fumatori. ** = $p < 0,01$ dopo analisi statistica con il test non parametrico di Mann-Whitney per dati non appaiati. Dsg3: desmogleina 3; OD= densità ottica.

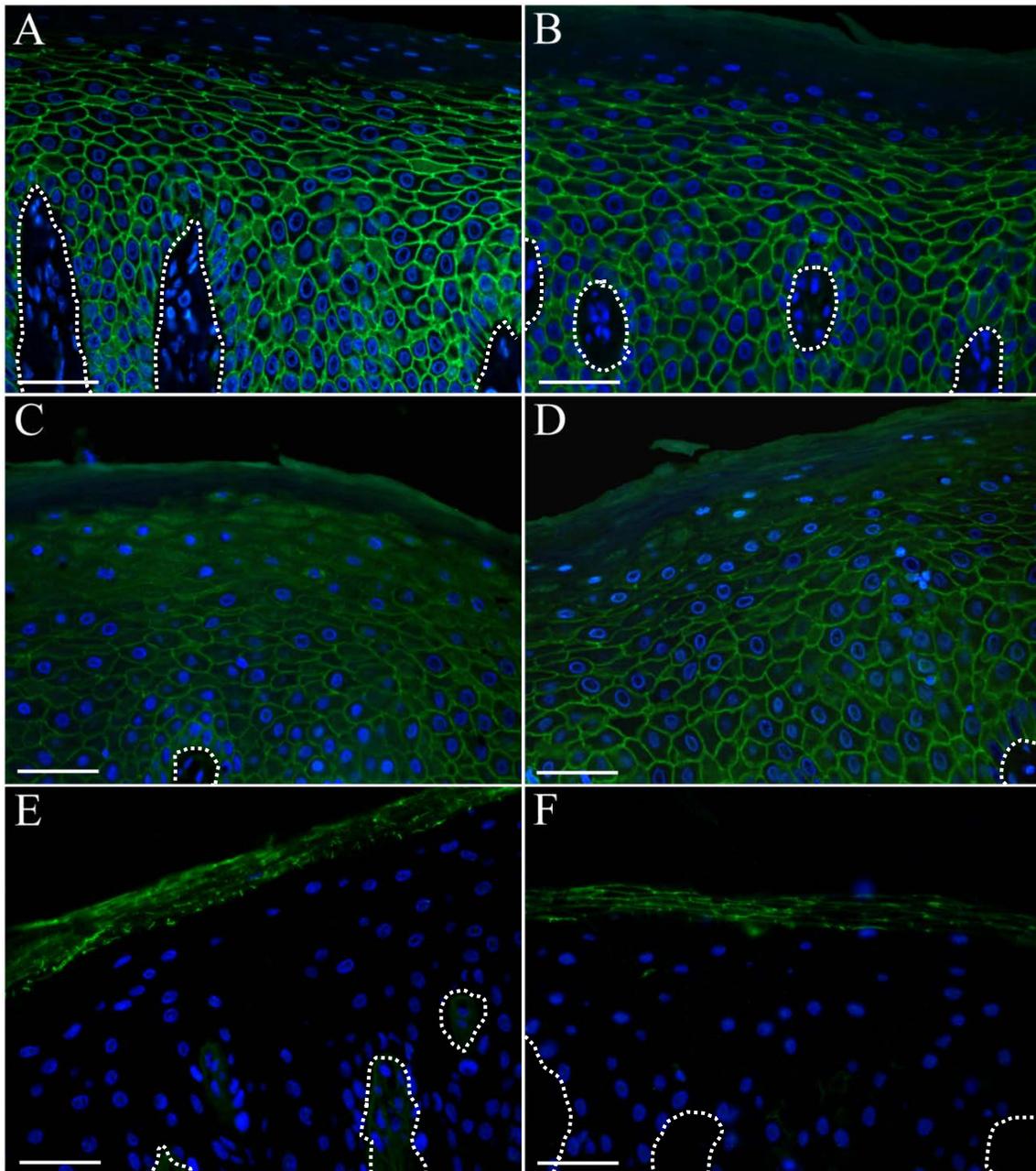


Figura 17. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di E-caderina (A e B), β -catenina (C e D) e occludina (E e F). A e C: soggetto non fumatore; B e D: soggetto fumatore. Per tutti i marcatori non sono state osservate differenze nei due gruppi sperimentali. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μ m. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

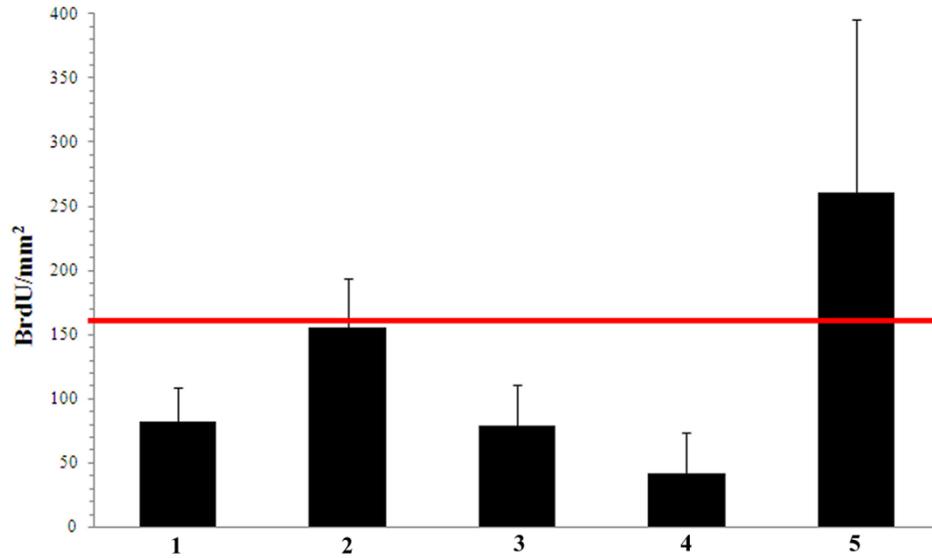


Figura 18. Analisi quantitativa della proliferazione nei singoli campioni di mucosa orale corneificata ottenuti da soggetti fumatori. I risultati sono stati espressi come numero medio di cellule BrdU positive/mm² di area di epitelio vitale (+ 1 deviazione standard). La linea rossa indica il valore medio di proliferazione ottenuto nei soggetti non fumatori (n = 5). $p > 0,05$ dopo analisi statistica con il test non parametrico di Mann-Whitney per dati non appaiati.

Esposizione acuta al fumo di sigaretta

Analisi morfologica

L'osservazione al microscopio ottico in campo chiaro delle sezioni in paraffina colorate con ematossilina eosina dei campioni basale e controllo ha confermato che la morfologia propria della mucosa orale cheratinizzata corneificata è mantenuta nel nostro modello tridimensionale di colture organotipiche di mucosa orale umana (Figure 19A e 19B).

Il confronto fra le sezioni relative a biopsie di controllo e quelle esposte al fumo di sigaretta ha evidenziato in entrambi i gruppi sperimentali la presenza di un monostrato ben conservato di cheratinociti basali aderenti alla membrana basale. Procedendo verso la superficie è stato possibile distinguere cheratinociti poligonali e infine cellule progressivamente appiattite con asse parallelo alla superficie epiteliale e colorazione più intensa negli strati più superficiali privi di nucleo (Figure 19B e 19C).

La colorazione con il metodo di Dane-Herman delle sezioni di mucosa orale ha mostrato come il normale processo di cheratinizzazione osservato nei campioni basale e controllo (Figure 19D e 19E) fosse preservato anche nel gruppo esposto al fumo (Figura 19F). In tutti i campioni è stato infatti possibile riscontrare una colorazione arancione uniforme nel compartimento soprabasale dell'epitelio, con tonalità più intensa a livello dello strato corneo.

Differenziazione terminale

L'analisi qualitativa dell'espressione della *K14* ha confermato la sua presenza a livello del monostrato di cellule basali nelle biopsie del gruppo basale e di controllo (Figure 20A e 20B) e solo una debole marcatura nelle cellule immediatamente soprabasali. I campioni esposti al fumo di sigaretta mostravano invece la presenza di cheratinociti positivi per la K14 anche nello strato spinoso (Figura 20C). In alcuni campioni l'espressione della K14 risultava evidente nei cheratinociti spinosi e diminuita a livello del monostrato basale. L'analisi quantitativa dell'OD ha confermato queste osservazioni. I campioni basali e i controlli non mostravano, infatti, differenze statisticamente significative nei valori di OD misurati nello strato basale, negli strati soprabasali e nell'intero epitelio. Al contrario, nei campioni esposti al fumo, la misurazione nell'intero epitelio dell'OD specifica per la K14 ha evidenziato un aumento del 26,8 % rispetto ai controlli coltivati nel sistema Transwell. Come indicato nella

Tabella 1, questo aumento di espressione della K14 epiteliale è dovuto a un incremento del 21,2 % nei cheratinociti basali e del 26,3 % nel compartimento soprabasale. Il test non parametrico di Wilcoxon ha rivelato come tale variazione di espressione negli strati soprabasali dopo esposizione al fumo sia statisticamente significativa ($p = 0,04$).

La distribuzione della K10 è risultata omogenea nel citosol dei cheratinociti di tutti gli strati epiteliali soprabasali, senza differenze nei tre gruppi sperimentali analizzati (Figure 20D-20F), confermando il dato istochimico.

<i>OD K14</i>	Basale	Controllo	Fumo acuto	Incremento fumo acuto vs controllo
Strato Basale	0,0365	0,0288	0,0349	21,2 %
Deviazione Standard	0,0139	0,0111	0,0162	
Strati Soprabasali	0,0235	0,0217	0,0274	26,3 %
Deviazione Standard	0,0067	0,0084	0,0110	
Intero Epitelio	0,0262	0,0231	0,0293	26,8 %
Deviazione Standard	0,0083	0,0089	0,0124	

Tabella 1. Analisi quantitativa dell'espressione della K14. I dati riportati in tabella sono i valori di medi di OD ottenuti nei gruppi sperimentali basale, controllo e fumo acuto nello strato basale, negli strati soprabasali e nell'intero epitelio. K14: cheratina 14; OD = densità ottica; DS = deviazione standard.

Adesione intercellulare

Per quanto riguarda l'adesione intercellulare mediata da *desmosomi*, nella mucosa orale dei campioni basali l'espressione della Dsg1 aumentava progressivamente partendo dallo strato basale fino al granulare e risultava sempre presente nello strato corneo (Figura 21A). La distribuzione della Dsg1 era confrontabile al gruppo basale sia nei campioni di controllo sia in quelli esposti al fumo di sigaretta (Figura 21B e 21C).

Le reazioni di rivelazione della Dsg3 nei campioni basali ne hanno evidenziato la presenza nei desmosomi dei cheratinociti dello strato basale e una diminuzione graduale della marcatura procedendo verso la superficie epiteliale (Figura 21D). Nelle biopsie di controllo e in seguito all'esposizione al fumo di sigaretta non sono state notate differenze di distribuzione della marcatura della Dsg3 rispetto al gruppo basale (Figura 21E e 21F).

Nelle *giunzioni aderenti* di tutti i gruppi sperimentali la componente transmembrana, ossia la E-caderina, era presente a partire dallo strato basale fino allo strato spinoso alto con intensità

decescente (Figure 22A-22C), ma non era espressa nello strato granulare. Analogamente, la β -catenina risultava evidente a livello della membrana plasmatica nei cheratinociti dallo strato basale allo strato spinoso alto, mentre si localizzava a livello citosolico nello strato granulare dell'epitelio orale, senza differenze nei tre gruppi sperimentali considerati (Figure 22D-22F). Nell'epitelio orale l'immunomarcatura specifica per l'occludina era presente in corrispondenza delle *giunzioni occludenti* sulla membrana plasmatica delle cellule dello strato granulare e dello strato spinoso alto (Figura 22G). Tale distribuzione caratterizzava anche l'epitelio della mucosa orale di controllo ed esposta al fumo di sigaretta (Figure 22H e 22I).

Proliferazione epiteliale e apoptosi

Nel grafico di Figura 23 i valori di BrdU/mm² di area di epitelio vitale ottenuti per ciascun campione esposto al fumo di sigaretta sono stati affiancati ai valori ottenuti nel rispettivo controllo mantenuto in coltura ed esposto ai medesimi cambiamenti di temperatura e liquido di immersione. È interessante notare la variabilità interindividuale del *tasso di proliferazione* e nell'andamento e nell'entità della risposta all'esposizione al fumo (aumento o diminuzione del numero di cellule proliferanti) per ciascun soggetto. Il test statistico di Wilcoxon per dati appaiati ha dimostrato l'assenza di significatività statistica nella variazione del tasso di proliferazione.

Le reazioni di immunofluorescenza per la rivelazione delle cellule in apoptosi, non hanno messo in luce segni di induzione della cascata apoptotica dopo esposizione acuta al fumo di sigaretta. Rare cellule mostravano marcatura nucleare per la p53 nello strato spinoso di alcuni campioni esposti al fumo suggerendo una stimolazione del pathway autofagico (dati non mostrati). Tuttavia, è stata notata considerevole variabilità del dato fra i soggetti analizzati senza riscontro in microscopia elettronica a trasmissione, il metodo di elezione per la valutazione dell'avvio del processo apoptotico e autofagico.

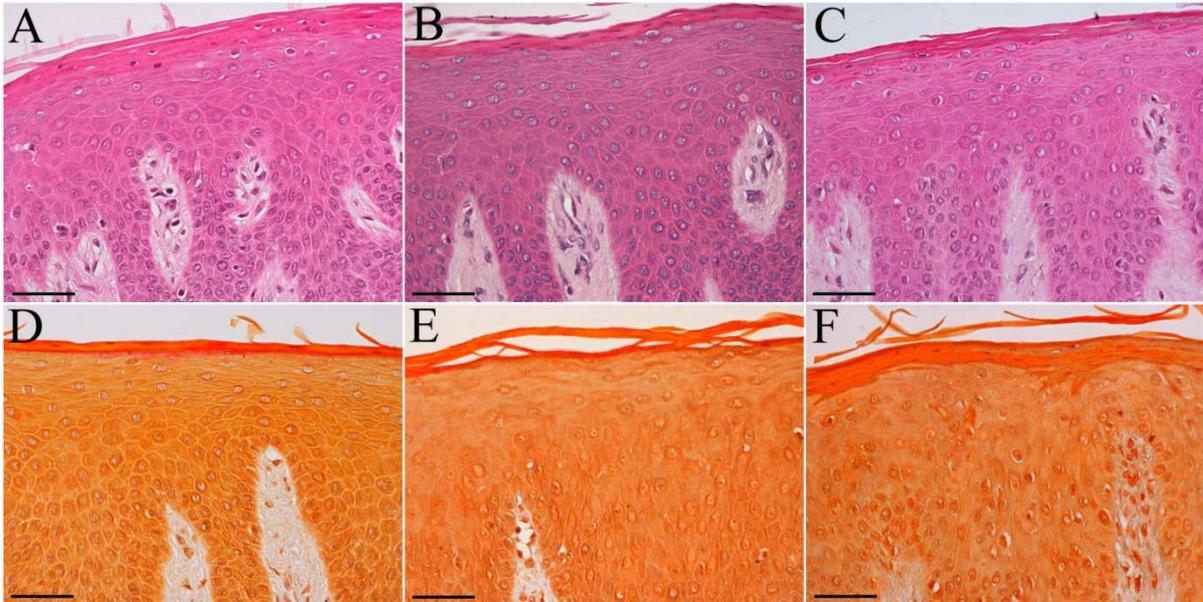


Figura 19. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana colorate con ematossilina-eosina (A-C) e tetracromica di Dane-Herman (D-F). A, D: gruppo basale; B, E: gruppo controllo; C, F: gruppo esposto al fumo di sigaretta. La colorazione è risultata omogenea in tutti i gruppi sperimentali. Barra = 50 μ m.

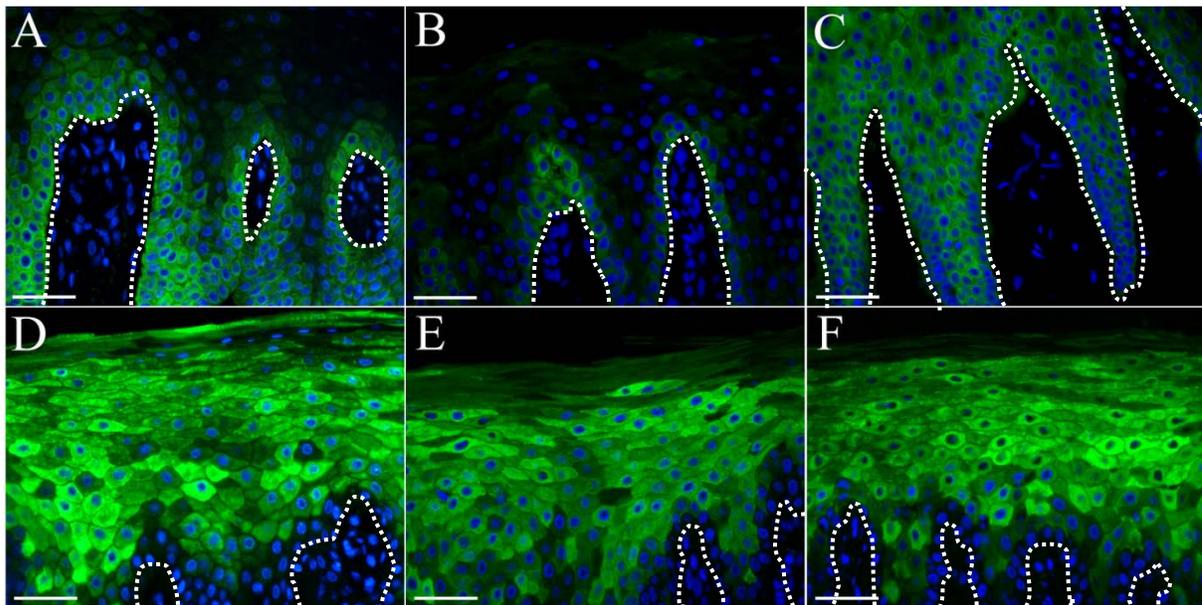


Figura 20. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza delle isoforme K14 (A-C), K10 (D-F). A, D: gruppo basale; B, E: gruppo controllo; C, F: gruppo esposto al fumo di sigaretta. Dopo esposizione acuta al fumo di sigaretta è stato osservato un aumento di espressione della K14 negli strati soprabasali, mentre la distribuzione della K10 è risultata confrontabile con i controlli. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μ m. K14: cheratina 14; K10: cheratina 10; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

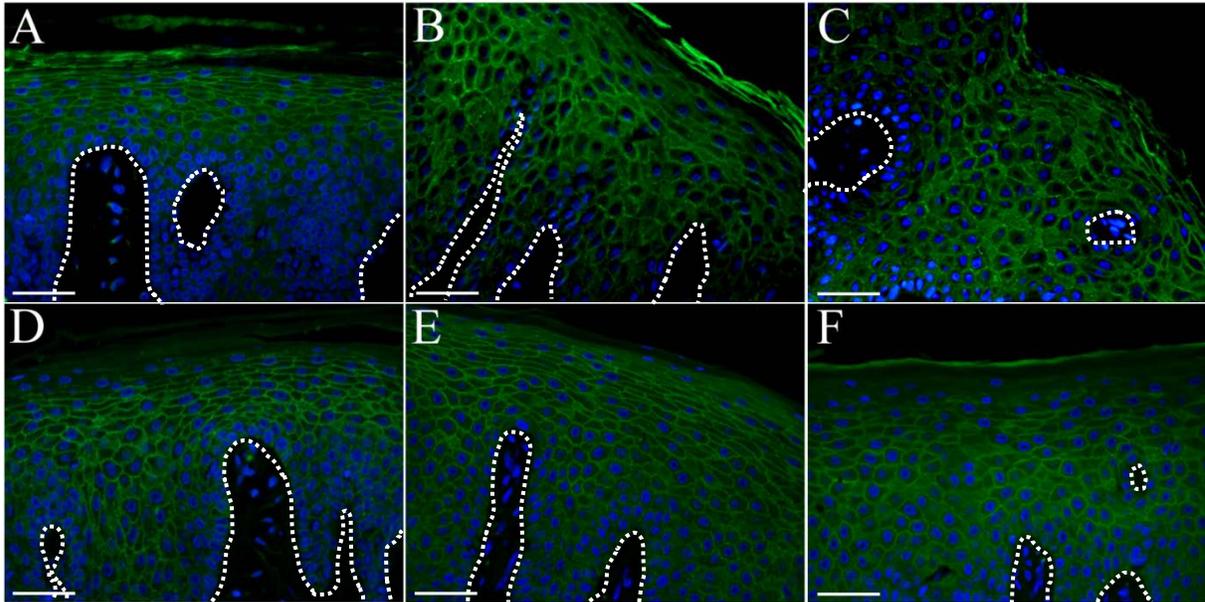


Figura 21. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale cheratinizzata corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di Dsg1 (A-C) e Dsg3 (D-E). A, D: gruppo basale; B, E: gruppo controllo; C, F: gruppo esposto al fumo di sigaretta. Per entrambi i marcatori non sono state osservate alterazioni dopo esposizione acuta al fumo di sigaretta. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μ m. Dsg1: desmogleina 1; Dsg3: desmogleina 3, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

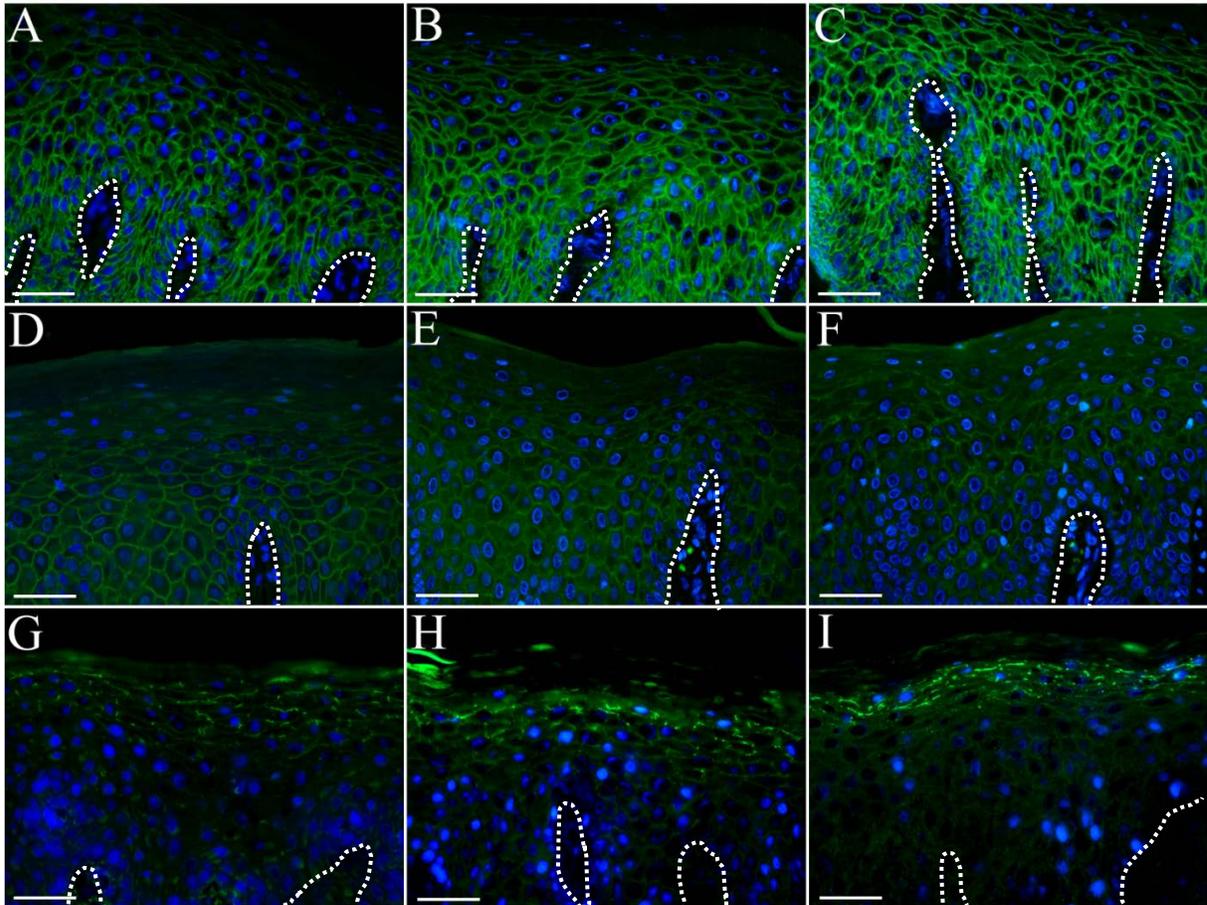


Figura 22. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale cheratinizzata corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di E-caderina (A-C), β -catenina (D-F) e occludina (G-I). A, D, G: gruppo basale; B, E, H: gruppo controllo; C, F, I: gruppo esposto al fumo di sigaretta. Per tutti i marcatori non sono state osservate alterazioni dopo esposizione acuta al fumo di sigaretta. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μ m. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

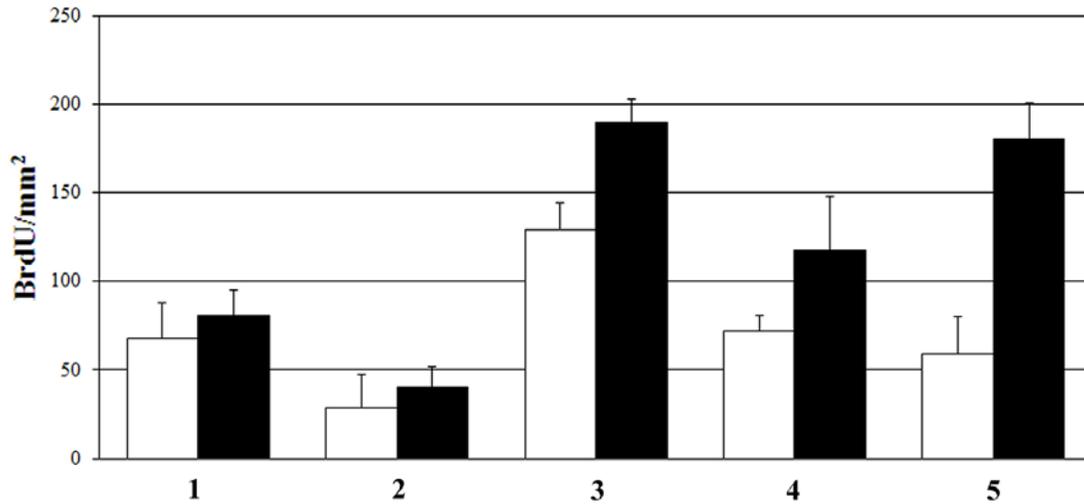


Figura 23. Analisi quantitativa della proliferazione epiteliale nella mucosa orale cheratinizzata umana dopo esposizione acuta al fumo di sigaretta (colonne nere) e nei rispettivi controlli (colonne bianche). La proliferazione è stata espressa come numero di cellule BrdU positive/mm² di area di epitelio vitale + 1 deviazione standard. $p > 0,05$ dopo analisi statistica con il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti dall'analisi morfologica di biopsie di mucosa orale cheratinizzata corneificata di donne sane di età inferiore ai 40 anni, senza segni clinici di danno alla mucosa orale hanno mostrato come l'esposizione cronica e acuta al fumo di sigaretta coinvolgano compartimenti differenti dell'epitelio orale. Mentre il fumo cronico determina un'alterazione nella differenziazione terminale e nell'adesione intercellulare a livello degli strati soprabasali dell'epitelio, la risposta iniziale dell'epitelio al fumo coinvolge un marcatore specifico del compartimento basale dell'epitelio, la K14. Per la stretta correlazione suggerita in letteratura fra l'espressione della K14 e l'attività proliferativa dei cheratinociti (Bragulla and Homberger, 2009), tale dato potrebbe essere interpretato come un segnale dell'induzione della proliferazione epiteliale e della presenza di cellule in divisione anche negli strati soprabasali dell'epitelio, tuttavia non sono state riscontrate variazioni nella proliferazione epiteliale. Nei fumatori, invece, è stata notata la tendenza al rallentamento del turnover epiteliale in assenza di apoptosi. Tale dato è particolarmente interessante se confrontato con le numerose evidenze relative ai danni al materiale genetico cellulare indotti da vari composti presenti nel fumo di sigaretta. La necessità di riparare i danni causati al DNA dalle molecole mutagene presenti nel fumo potrebbe infatti spiegare la tendenza alla diminuzione della proliferazione riscontrata nei soggetti fumatori in questo studio.

Dopo esposizione cronica al fumo di sigaretta, la morfologia ultrastrutturale dei desmosomi è risultata preservata nonostante alterazioni nella composizione molecolare. In particolare, è stata rilevata la diminuzione dell'espressione della Dsg3 che suggerisce un indebolimento della barriera epiteliale contro organismi patogeni in seguito al protrarsi della stimolazione chimico-fisica.

Al contrario non sono state osservate anomalie nella struttura dei desmosomi dopo tre ore dall'esposizione al fumo e l'adesione intercellulare mediata da giunzioni aderenti e occludenti era preservata sia dopo esposizione cronica sia dopo esposizione acuta al fumo. Dati precedentemente pubblicati da altri autori hanno dimostrato che le proteine transmembrana delle giunzioni occludenti sono facilmente ossidabili e sono state proposte come bersagli preferenziali della carbonilazione ad opera anche di molecole presenti nel fumo di sigaretta negli epiteli umani (Coppe et al., 2008; Rao, 2008). Uno dei motivi della discrepanza fra i

nostri dati e quelli già pubblicati risiede probabilmente nelle differenze insite nei modelli sperimentali utilizzati. Infatti, i dati precedentemente citati si riferiscono all'esposizione di colture cellulari a singoli composti presenti nel fumo di sigaretta, in particolare tabacco (Coppe et al., 2008) e radicali (Rao, 2008). Benché tali modelli siano sicuramente utili nell'approfondire i meccanismi molecolari che si verificano all'interno delle cellule, escludono dal modello sperimentale importanti componenti tridimensionali coinvolti nella costruzione della barriera epiteliale. Nel nostro protocollo sperimentale di esposizione acuta al fumo di sigaretta, la mucosa orale preserva l'integrità e la struttura tridimensionale dell'epitelio, così come il gradiente di antiossidanti fisiologicamente presente negli epitelii pluristratificati (Thiele, 1994; Thiele et al., 1999). Le colture cellulari in vitro non riproducono tali caratteristiche e questo rende quindi i cheratinociti più esposti al danno indotto dall'agente esogeno. Il dato da noi ottenuto nei soggetti fumatori potrebbe invece derivare da un adattamento nel tempo del sistema giunzionale epiteliale durante il quale desmosomi subiscono un riarrangiamento a livello di composizione molecolare. Questa considerazione è in linea con risultati precedentemente ottenuti nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* che vedono la Dsg3 come segnale di adattamento forzato dell'epitelio orale a un potente stimolo fisico, le radiazioni ionizzanti (Donetti et al., 2009), supportando quindi le ipotesi sul ruolo cruciale delle caderine desmosomiali nel mediare la comunicazione fra cheratinociti adiacenti e nel rispondere a stimoli esterni a cui la mucosa orale può essere esposta (Green and Gaudry, 2000). Inoltre, il mantenimento dell'espressione della Dsg1 contemporaneamente alla diminuzione di espressione della Dsg3 fornisce supporto alla "compensation hypothesis" proposta da Mahoney che prevede la capacità delle isoforme di caderine desmosomiali di compensarsi reciprocamente in caso di riduzione di espressione di un'isoforma (Mahoney et al., 2006).

Infine, la variabilità nell'abitudine al fumo come durata dell'esposizione in termini di anni e il numero di sigarette fumate da ciascun soggetto fumatore preso in esame potrebbero essere connesse alle differenze interindividuali riscontrate nei parametri analizzati in questo studio. Tuttavia un'analisi di tipo statistico sulla correlazione fra i dati quantitativi e l'entità dell'esposizione richiederebbe un numero molto maggiore di soggetti analizzati e non è stato quindi possibile eseguirlo in questo studio.

L'identificazione del fumo come una delle principali cause di morte nel mondo per cui è possibile un intervento di prevenzione, pone la comunità scientifica di fronte alla continua necessità di caratterizzare e approfondire gli effetti nocivi del fumo di sigaretta sul nostro organismo, focalizzando l'attenzione sugli organi ad esso più esposti. La rilevanza di questo studio è per questo insita nel fatto che i cheratinociti della cavità orale sono le prime cellule che vengono a contatto con il fumo di sigaretta e rappresentano quindi un'importante linea di difesa per il nostro organismo. Inoltre la cavità orale è la camera di combustione del fumo di sigaretta e per questo i cheratinociti orali sono esposti non solo alla miscela di molecole presenti nel fumo, ma anche al calore.

Questo studio ha permesso di ottenere osservazioni morfologiche direttamente da prelievi biotici di mucosa orale umana fornendo quindi dati interessanti sulle conseguenze dell'esposizione cronica e acuta al fumo di sigaretta che implementano le conoscenze ad oggi riportate in letteratura relative a singoli componenti del fumo di sigaretta in altri modelli sperimentali, che hanno il limite di non riprodurre la barriera tridimensionale della mucosa orale umana.

ALENDRONATO DI SODIO

Una delle ipotesi sull'insorgenza dell'ONM-B prevede la presenza di un danno a carico dell'epitelio orale antecedente quello osseo. Secondo questa teoria, la lesione e poi la necrosi ossea potrebbero essere indotte dalla rottura della barriera epiteliale e conseguente esposizione dell'osso ad agenti patogeni in grado di causare infezioni secondarie (Allen and Burr, 2009).

L'alendronato di sodio è il farmaco maggiormente prescritto in seguito a diagnosi di osteoporosi ed è stata recentemente dimostrata la stretta correlazione fra alendronato di sodio e la tossicità dei tessuti molli (Kharazmi et al., 2012). Considerando l'elevato numero di donne in età post-menopausale che lo assumono con costanza per intervalli di tempo prolungati, è particolarmente importante approfondire i suoi effetti collaterali.

Per indagare l'effetto dell'alendronato di sodio sulla mucosa orale umana, il primo passo è stato quello di verificare se la mucosa orale è bersaglio di tale farmaco in assenza di necrosi ossea. Lo studio è stato condotto prendendo in considerazione un campione di popolazione femminile di età superiore ai 60 anni sottoposto da almeno 2 anni a terapia orale con alendronato di sodio una volta alla settimana in seguito a diagnosi di osteoporosi. La scelta di restringere l'intervallo di età considerato e il genere è finalizzata a ridurre la variabilità nei risultati dovuta a fattori diversi dal farmaco considerato. Inoltre lo studio è stato limitato a un solo farmaco e ad un unico tipo di somministrazione per le differenze di potenza e effetto dei diversi ABP, nonché alla variabilità nelle dosi e nella posologia a seconda del farmaco assunto.

METODI

Sei pazienti donne di età superiore ai 60 anni sottoposte a terapia cronica (da 2 a 7 anni) con alendronato di sodio 70 mg una volta alla settimana per via orale in seguito a diagnosi di osteoporosi sono state reclutate presso l'*Unità di Patologia Orale, Medicina orale e Gerodontologia* (Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche) insieme a un gruppo controllo di 6 donne di età superiore ai 60 anni in buono stato di salute che non avessero mai assunto bifosfonati. Fattori limitanti l'inclusione delle pazienti nello studio sono stati l'assunzione concomitante di farmaci steroidei o anti-angiogenici, storia pregressa di chemioterapia o radioterapia alla testa e al collo e l'abitudine al fumo.

Dopo lettura e firma del consenso informato, una biopsia di mucosa orale cheratinizzata corneificata normale è stata prelevata da ciascun soggetto durante interventi di estrazione dentaria in una zona che all'esame macroscopico risultava normale e non infiammata (1.5 cm²).

Dopo il trasporto presso il *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*, i campioni sono stati incubati per tre ore in terreno di coltura contenente BrdU 400 µM in incubatore umidificato (37°C - 5% CO₂) prima di essere suddivisi in due parti e processati per la microscopia ottica ed elettronica secondo i protocolli descritti in Tabella A2.

Le sezioni in paraffina sono state colorate con colorazione ematossilina-eosina e tetracromica di Dane-Herman. Su sezioni adiacenti sono state eseguite reazioni di immunofluorescenza indiretta per la rivelazione delle cellule in attiva proliferazione incorporanti BrdU, di marcatori specifici per differenziazione terminale (K14 e K10), proteine di adesione (Dsg1, Dsg3, Dsc2, E-caderina e occludina) e eventuali cellule apoptotiche (p53). Uno schema dei protocolli seguiti è fornito in Tabella A6. L'osservazione è stata eseguita con microscopio ottico in campo chiaro ed epifluorescenza Nikon Eclipse 80i corredato da fotocamera digitale DS-5Mc (Nikon, Giappone).

L'analisi quantitativa della proliferazione epiteliale è stata condotta secondo il protocollo descritto nella sezione *Metodi* del capitolo *Fumo di Sigaretta*.

L'espressione delle proteine K10 e Dsg1 nella mucosa orale di pazienti in terapia cronica con alendronato di sodio è stata quantificata calcolando la OD su immagini di sezioni intere ottenute al microscopio a epifluorescenza con obiettivo 20X, come descritto nella sezione *Metodi* del capitolo sul *Fumo di Sigaretta*. Nel caso di questi marcatori, è stato misurato il valore di OD relativo al compartimento epiteliale vitale, escludendo lo strato corneo poiché l'autofluorescenza di questo strato avrebbe potuto falsare il dato numerico. È stata ottenuta quindi una maschera di colori con il software Paint Shop Pro e il valore di OD è stato calcolato da Matlab grazie al software programmato ad hoc già descritto. La misurazione è stata eseguita su sezioni di ogni campione dopo almeno tre esperimenti di immunofluorescenza, considerando due vetrini a ogni esperimento con un minimo di due sezioni positive per vetrino. I dati sono stati espressi come valore medio di OD \pm 1 deviazione standard. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test non parametrico Mann-Whitney per dati non appaiati. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

RISULTATI

Analisi morfologica

L'osservazione al microscopio ottico in campo chiaro delle sezioni in paraffina colorate con ematossilina-eosina ottenute da soggetti sottoposti a terapia cronica con alendronato di sodio per via orale, ha messo in luce come l'organizzazione tridimensionale dell'epitelio orale di questi soggetti sia confrontabile con quella del gruppo controllo (Figure 24A e 24B). Allo stesso tempo, non sono stati rilevati spazi intercellulari dilatati né distacco del compartimento epiteliale dal connettivo papillare. Tuttavia, alcune cellule degli strati spinoso alto e granuloso, apparivano colorate di tonalità più tenui rispetto alle cellule sottostanti e adiacenti. I nuclei colorati con ematossilina risultavano spesso frammentati e circondati da uno spazio otticamente vuoto o debolmente colorato negli strati più superficiali dei campioni trattati (freccie in Figura 24B).

Le stesse cellule erano riconoscibili anche dopo colorazione tetracromica di Dane-Herman, suggerendo che la diversa affinità per i coloranti sia dovuta a un minore contenuto citosolico di filamenti intermedi di cheratina (Figure 24C e 24D).

Differenziazione terminale

Sia nel gruppo controllo sia nei pazienti trattati la K14 non manteneva la sua tipica localizzazione nel mono strato basale, ma cheratinociti K14-positivi erano abbondanti anche nello strato immediatamente soprabasale (Figure 25A e 25B).

La distribuzione del marcatore di differenziazione terminale K10 è stata verificata con esperimenti di immunofluorescenza indiretta. Come mostrato nelle immagini esemplificative riportate in Figura 25C, l'epitelio orale dei soggetti controllo era caratterizzato da cheratinociti soprabasali uniformemente marcati per la K10, a partire dagli strati immediatamente soprabasali fino alle lamelle cornee. Al contrario nei pazienti in terapia con alendronato per via orale, la distribuzione della K10 nel compartimento epiteliale era disomogenea, con cellule non marcate o debolmente marcate negli strati spinoso e granuloso (Figura 25D). Inoltre, alcune cellule dello strato granuloso dell'epitelio mostravano zone del citoplasma con fluorescenza elevata che potrebbero rappresentare aggregati di filamenti citoscheletrici (freccia in Figura 25D). La misurazione della OD specifica per la K10 nei due

gruppi sperimentali, ha confermato le osservazioni qualitative. Infatti, è stata riscontrata una diminuzione statisticamente significativa ($p = 0,0014$) del valore medio della OD dell'epitelio vitale nei pazienti trattati cronicamente con alendronato ($0,0151$ unità OD $\pm 0,0123$) rispetto al dato ottenuto nei soggetti del gruppo controllo ($0,0295$ unità OD $\pm 0,0076$) (Figura 26). È interessante notare come, nonostante l'età dei soggetti considerati, la variabilità interindividuale nell'espressione del marcatore è risultata minima nei soggetti controllo, ma considerevole nei pazienti trattati.

L'analisi ultrastrutturale ha ulteriormente confermato le anomalie nel processo di differenziazione terminale a carico dell'epitelio orale dei soggetti in terapia cronica con alendronato di sodio. Nei soggetti controllo, il citosol dei cheratinociti orali soprabasali diventava progressivamente più elettrondenso per l'accumularsi di filamenti intermedi di cheratina al suo interno procedendo dallo strato spinoso verso la superficie epiteliale (Figura 27A). Nei pazienti del gruppo trattato, invece, a partire dello strato spinoso medio, il citosol dei cheratinociti presentava al suo interno matasse di tonofilamenti (Figura 27B). In particolare, procedendo dallo strato spinoso a quello granulare, i filamenti di cheratina apparivano progressivamente impaccati e condensati, lasciando il resto del citosol elettrontrasparente.

Nello strato granulare dell'epitelio orale dei pazienti trattati, i cheratinociti dello strato granulare erano caratterizzati da nucleo contratto e citoplasma perinucleare rarefatto (Figura 27D), molto diverso dalla tipica condensazione della cromatina visibile nel processo di cheratinizzazione degli epiteli stratificati corneificati visibile invece nei controlli (Figura 27C).

Adesione intercellulare

Per quanto riguarda l'adesione intercellulare, nei campioni controllo l'analisi in immunofluorescenza delle caderine desmosomiali Dsg1, Dsg3 e Dsc2 ha rivelato la presenza di tali isoforme in corrispondenza della membrana plasmatica dei cheratinociti di tutto lo spessore epiteliale (Figure 28A, 28C e 28E), con la marcatura specifica per Dsg1 progressivamente più intensa procedendo dallo strato basale allo strato corneo (Figura 28A). Nei pazienti in trattamento cronico con alendronato di sodio, la distribuzione di Dsg3 e Dsc2 era confrontabile con quella dei controlli (Figure 28 D e 28F). Dsg1, invece, risultava

localizzata a livello degli strati basale e corneo dell'epitelio, mentre nei cheratinociti spinosi e granulari l'immunoreattività era molto debole (Figura 28B). A supporto del dato qualitativo, la misurazione della OD specifica per Dsg1 ha dimostrato una diminuzione statisticamente significativa ($p = 0,0226$) della marcatura di tale isoforma di caderina desmosomiale nell'epitelio vitale dei soggetti in terapia con alendronato di sodio ($0,0183$ unità OD $\pm 0,0091$), rispetto al gruppo controllo ($0,0297$ unità OD $\pm 0,0147$) (Figura 26).

All'analisi ultrastrutturale, i cheratinociti orali basali mostravano emidesmosomi ben conservati in entrambi i gruppi sperimentali, senza distacco dalla sottostante membrana basale e non è stata riscontrata dilatazione degli spazi intercellulari in nessuno strato epiteliale. Tuttavia, l'osservazione della morfologia dei desmosomi nei soggetti trattati cronicamente con il farmaco ha rivelato anomalie se confrontati con i rispettivi controlli. Infatti, a partire dallo strato spinoso medio, i desmosomi si presentavano più sottili e immaturi rispetto al gruppo controllo (Figure 27E e 27F) e nei cheratinociti dello strato granulare i filamenti di cheratina ancorati ai desmosomi erano solo debolmente individuabili (Figura 27F).

Al contrario, non sono state riscontrate differenze nella distribuzione dell'immunomarcatura per la E-caderina nelle giunzioni aderenti e l'occludina nelle giunzioni occludenti fra i soggetti controllo e i pazienti in terapia con alendronato di sodio (Figure 29A-29D).

Proliferazione epiteliale e apoptosi

L'analisi della proliferazione epiteliale ha rivelato la localizzazione dei cheratinociti in divisione in corrispondenza del monostrato basale dell'epitelio in entrambi i gruppi sperimentali. Ciononostante il tasso di proliferazione nei soggetti in terapia cronica con alendronato di sodio ($237,62$ BrdU/mm² $\pm 92,22$) era significativamente ($p = 0,0002$) diminuito rispetto ai soggetti controllo ($104,16$ BrdU/mm² $\pm 66,20$) (Figura 30). Tale diminuzione nella proliferazione epiteliale, non è risultata accompagnata dalla presenza di cellule in apoptosi come dimostrato dalle reazioni di immunofluorescenza indiretta per la caspasi 3 attivata e l'analisi in microscopia elettronica a trasmissione (dato non mostrato).

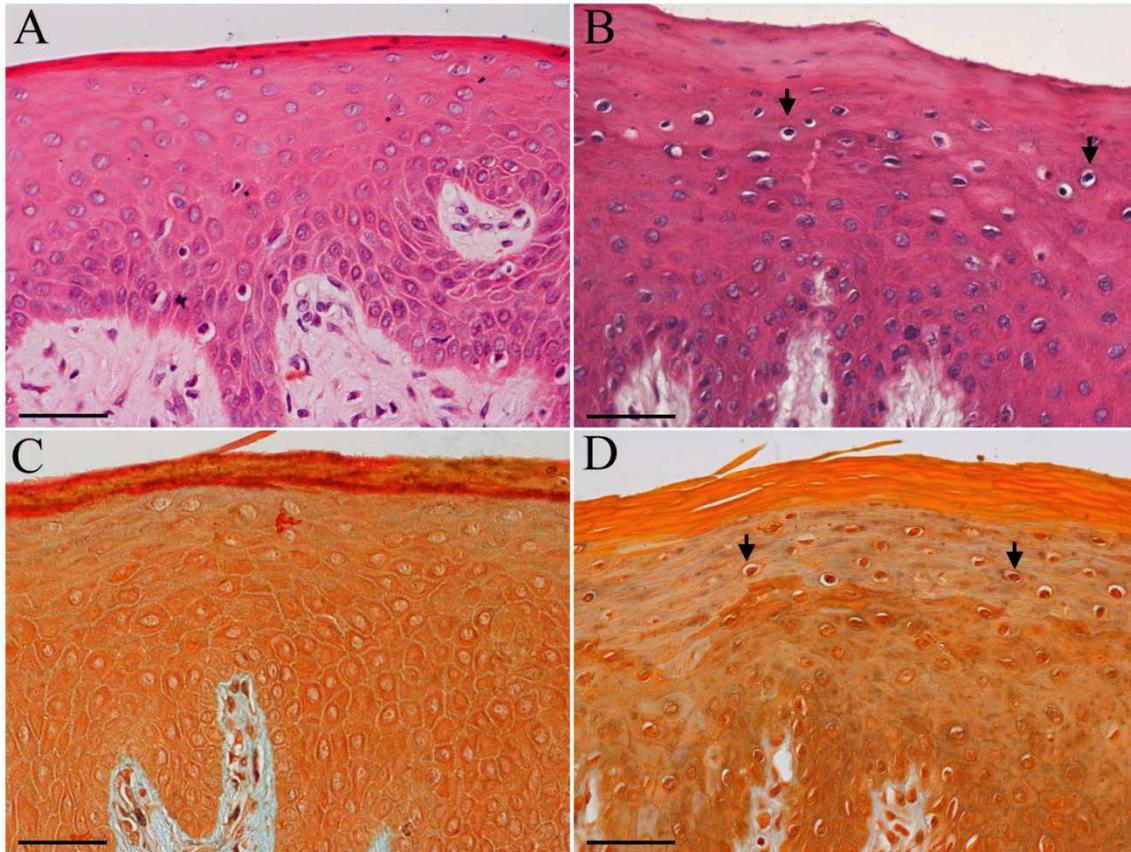


Figura 24. Analisi morfologica. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana colorate con ematossilina-eosina (A e B) e tetracromica di Dane-Herman (C e D). A e C: soggetti controllo; B e D: soggetti osteoporotici in terapia cronica con alendronato di sodio. Dopo colorazione Dane-Herman, nei soggetti in trattamento con alendronato è stata notata una diminuzione dell'intensità di colorazione in corrispondenza degli strati spinoso e granulare. Le frecce nere indicano cheratinociti dello strato spinoso alto con nuclei circondati da uno spazio otticamente vuoto o debolmente colorato. Barra = 50 μm .

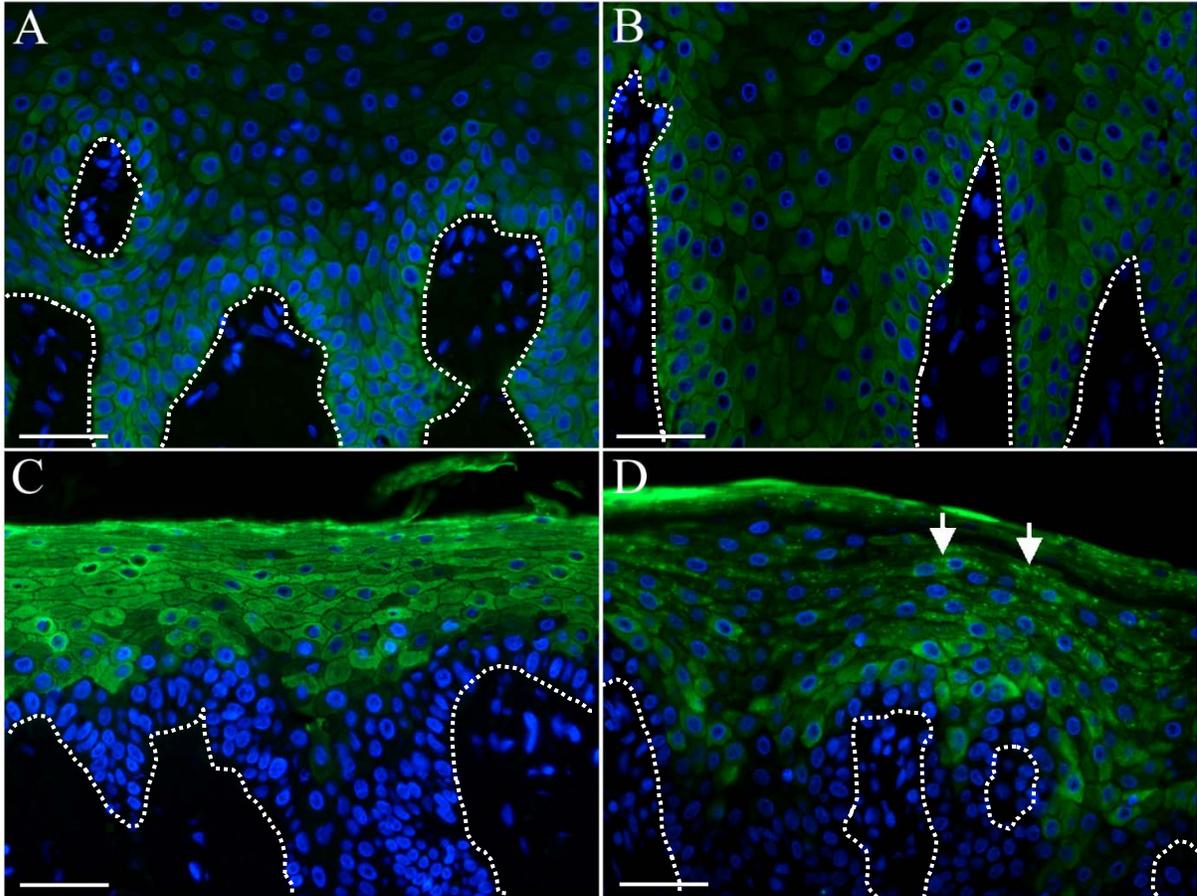


Figura 25. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di K14 (A e B) e K10 (C e D). A e C: soggetti controllo; B e D: soggetti osteoporotici in terapia cronica con alendronato di sodio. Nei soggetti in trattamento con alendronato sono state osservate alterazioni nella distribuzione della K10, mentre la localizzazione della K14 è risultata confrontabile con i controlli. Le frecce bianche indicano punti altamente fluorescenti nel citosol di cheratinociti granulari. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μm . K14: cheratina 14; K10: cheratina 10; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

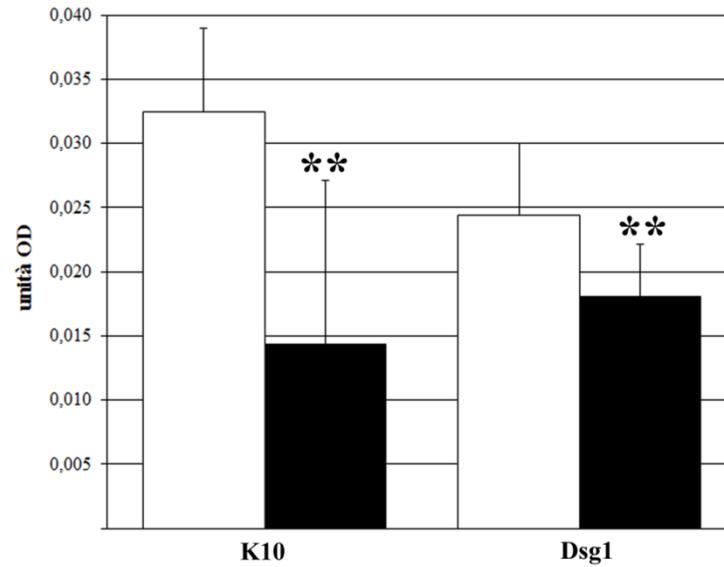


Figura 26. Analisi quantitativa dell'espressione della K10 e della Dsg1 nella mucosa orale corneificata umana. Le colonne bianche rappresentano i valori medi di OD per la K10 e la Dsg1 (+ 1 deviazione standard) ottenuti nei soggetti controllo (n = 6). Le colonne nere rappresentano i valori medi di OD per la K10 e la Dsg1 (+ 1 deviazione standard) ottenuti nei soggetti osteoporotici in terapia cronica con alendronato di sodio (n = 6). ** = $p < 0,05$ dopo analisi statistica con il test non parametrico di Mann-Whitney per dati non appaiati. K10: cheratina 10; Dsg1: desmogleina 1; OD= densità ottica.

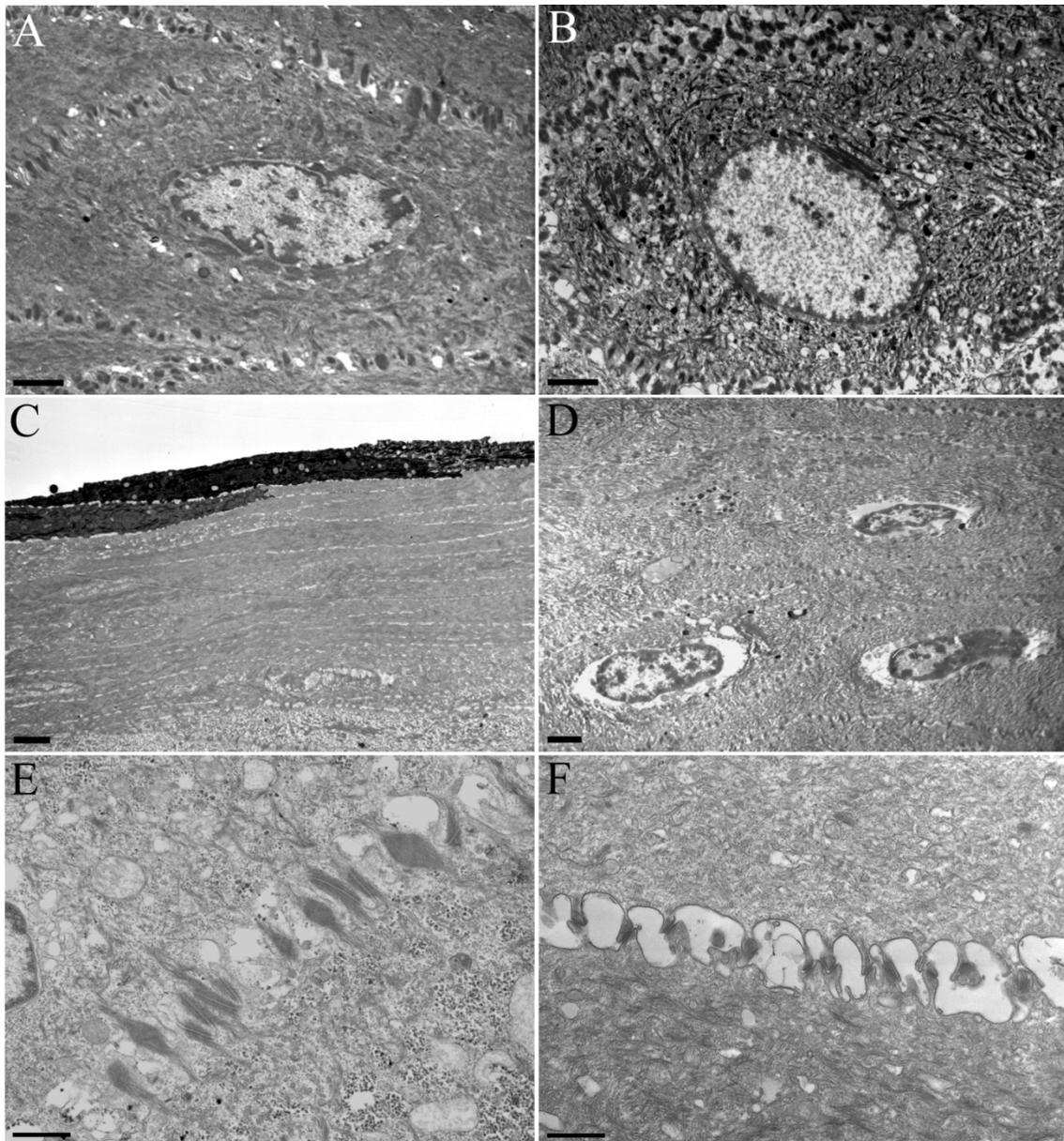


Figura 27. A-D: Fotografie ottenute al microscopio elettronico a trasmissione di sezioni fini di mucosa orale umana. A e B: cheratinociti orali dello strato spinoso; C e D: cheratinociti orali dello strato granulare; E e F: cheratinociti dello strato spinoso in cui sono evidenti le giunzioni fra cheratinociti adiacenti. A, B, E, F: Barra = 2 μm ; C e D: Barra = 1 μm . A, C, E: soggetti controllo; B, D, F: soggetti osteoporotici in terapia cronica con alendronato di sodio.

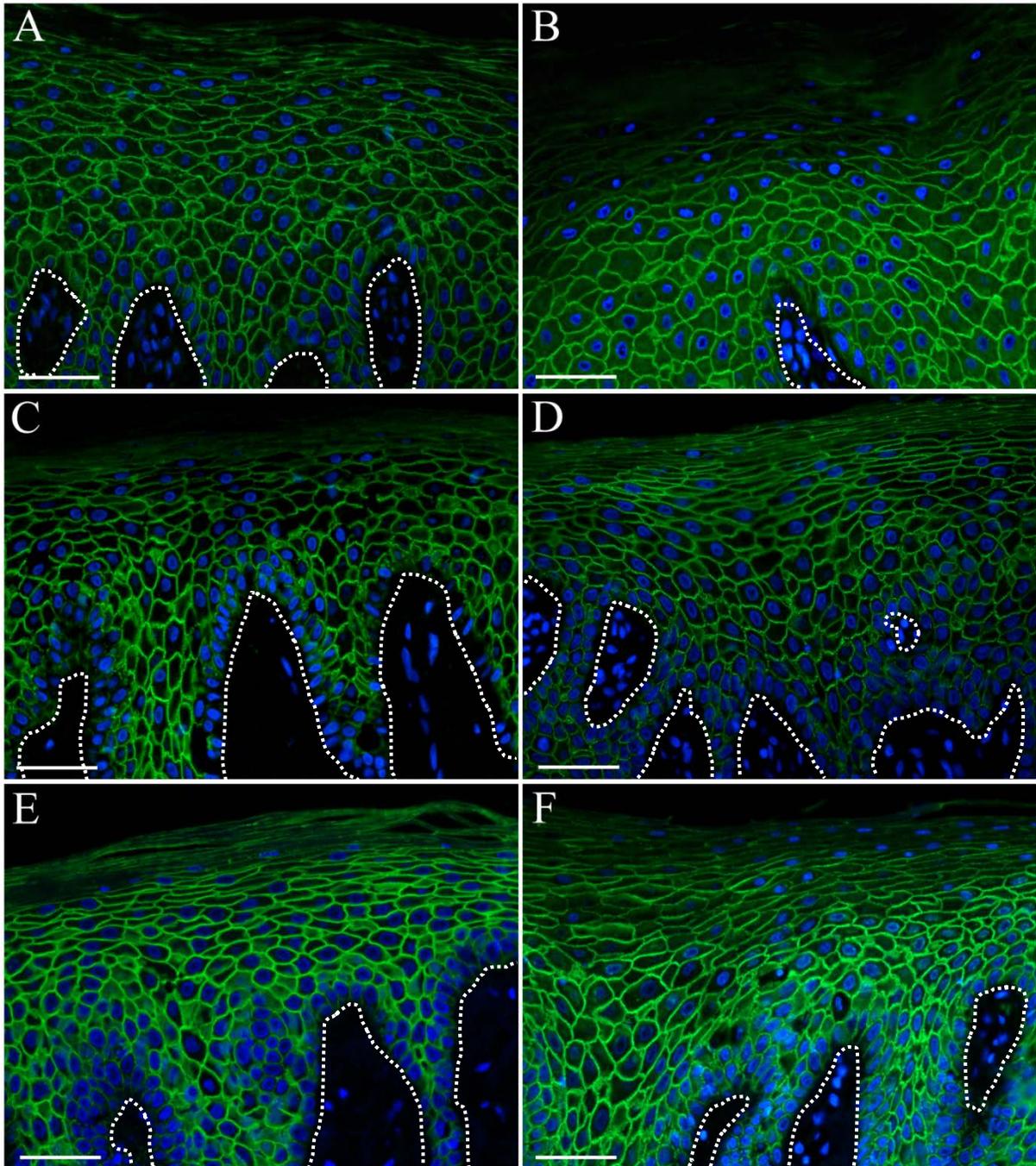


Figura 28. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di Dsg1 (A e B), Dsg3 (C e D) e Dsc2 (E e F). A, C, E: soggetti controllo; B, D, F: soggetti osteoporotici in terapia cronica con alendronato di sodio. La Dsg1 è risultata diminuita a livello degli strati più differenziati dell'epitelio nei soggetti in terapia cronica con alendronato, mentre Dsg3 e Dsc2 mostravano una distribuzione confrontabile con i soggetti controllo. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μ m. Dsg1: desmogleina 1; Dsg3: desmogleina 3; Dsc2: desmocollina 2; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

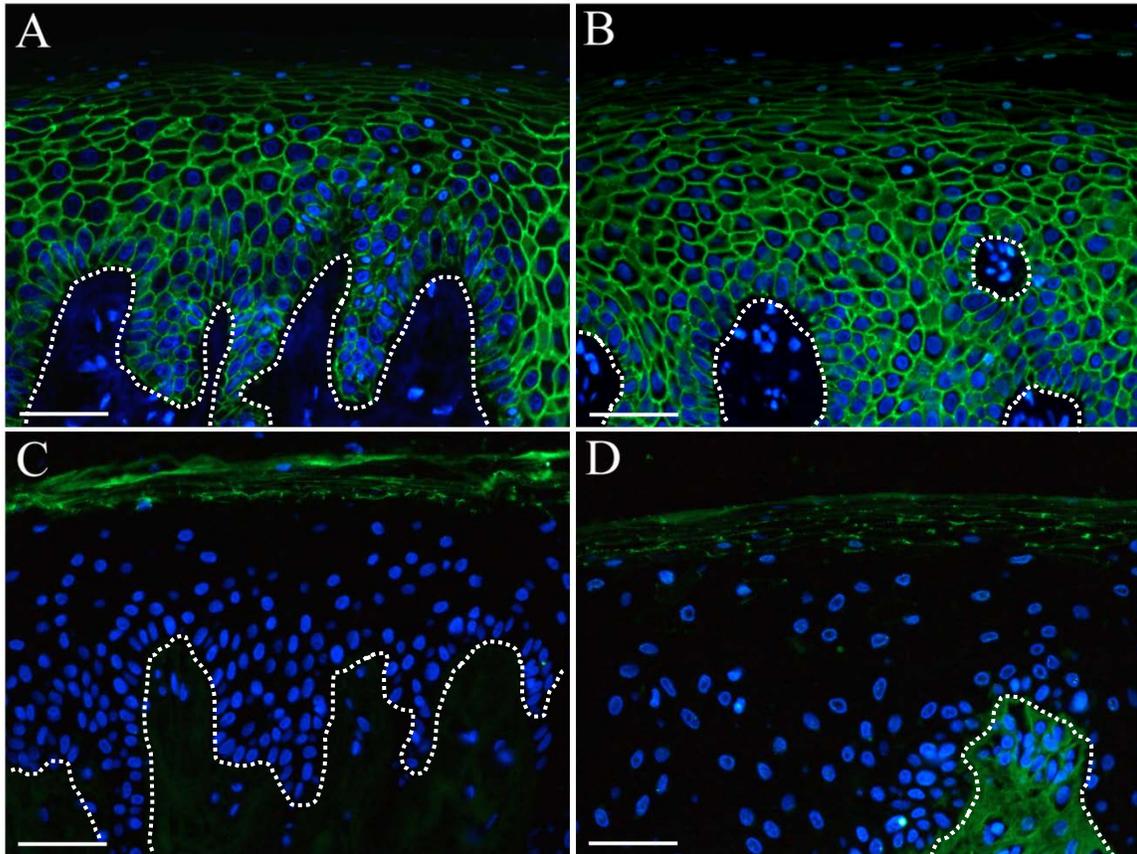


Figura 29. Fotografie di sezioni in paraffina di mucosa orale cheratinizzata corneificata umana processate per la rivelazione in immunofluorescenza di E-caderina (A e B) e occludina (C e D). A e C: soggetti controllo; B e D: soggetti osteoporotici in terapia cronica con alendronato di sodio. Per tutti i marcatori non sono state osservate differenze nei due gruppi sperimentali. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Barra = 50 μm . DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro.

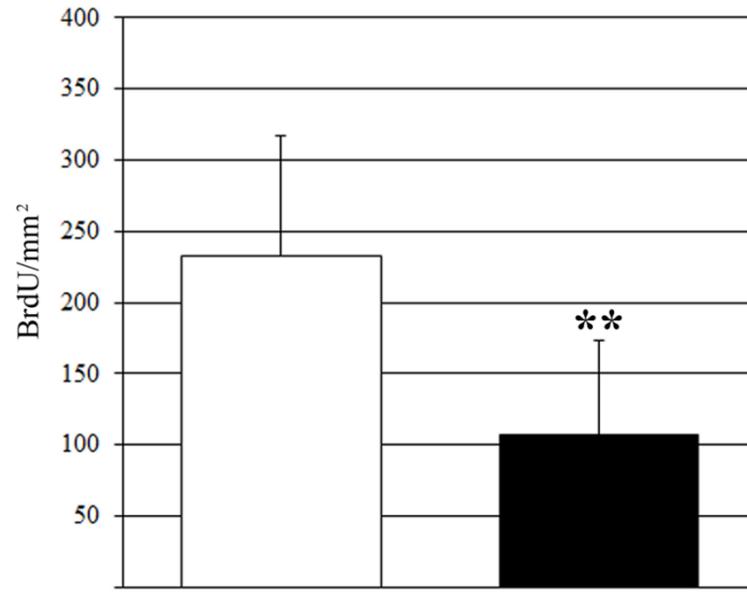


Figura 30. Analisi quantitativa della proliferazione epiteliale nella mucosa orale cheratinizzata umana di soggetti osteoporotici in terapia cronica con alendronato di sodio (colonna nera) e nei rispettivi controlli (colonna bianca). La proliferazione è stata espressa come numero di cellule BrdU positive/mm² di area di epitelio vitale + 1 deviazione standard. ** = $p < 0,05$ dopo analisi statistica con il test non parametrico di Mann-Whitney per dati non appaiati.

DISCUSSIONE

I dati raccolti dall'analisi morfologica della mucosa orale cheratinizzata corneificata da pazienti in terapia cronica con alendronato di sodio dimostrano profonde alterazioni strutturali e nell'omeostasi epiteliale.

Nei soggetti considerati, la terapia cronica con alendronato di sodio ha indotto una riduzione del tasso di proliferazione epiteliale nei soggetti analizzati, senza induzione della cascata apoptotica. Tale dato conferma i risultati precedentemente riportati in letteratura sugli ABP (Landesberg et al., 2008; Pabst et al., 2012) e supporta le teorie proposte sulla capacità degli ABP di indurre diminuzione del numero di cellule staminali p63-positive dell'epitelio orale (Scheller et al., 2011; Kharazmi et al., 2012), blocco del ciclo cellulare con azione dose-dipendente (Reszka et al.; 2001) e senescenza (Kim et al., 2011).

Nell'epitelio orale dei soggetti reclutati in questo studio, sono state osservate alterazioni di cheratinizzazione, riarrangiamento citoscheletrico, composizione molecolare e morfologia dei desmosomi, mentre non sono state riscontrate alterazioni in giunzioni aderenti e occludenti. Complessivamente tali dati confermano l'azione nociva degli ABP sulle cellule dell'epitelio orale, già evidenziata in colture di cheratinociti orali (Reid et al., 2007), e dimostrano anomalie nel processo di differenziazione terminale negli strati alti dell'epitelio parallelamente a un apparato giunzionale non efficiente con possibili conseguenze sulla funzionalità della barriera epiteliale.

I desmosomi ancorati alla rete di filamenti intermedi di cheratina, infatti, sono il sistema giunzionale deputato a resistere agli stress di natura meccanica a cui viene esposta la mucosa orale. Considerando le caratteristiche morfofunzionali dell'epitelio pavimentoso cheratinizzato corneificato e la sua localizzazione nelle aree sottoposte a sollecitazioni meccaniche, l'inefficienza del sistema giunzionale e citoscheletrico determina un incremento del rischio di lesioni alla mucosa. In caso di danno epiteliale, la ridotta capacità proliferativa dei cheratinociti dovuta al trattamento cronico con alendronato potrebbe rendere più lento il processo di guarigione, come proposto da Landesberg e coll. (Landesberg et al., 2008) e favorire quindi l'insorgenza di infezioni. In tal caso, lo stato infiammatorio derivante dalle microfratture dell'osso ipermineralizzato delle ossa mascellari e della mandibola (Chapurlat et al., 2007) insieme alla lesione alla mucosa orale e alla presenza della normale microflora

mucosale, potrebbero indurre infezione e osteonecrosi. In questo contesto, l'innescò della risposta immunitaria renderebbe ancora più difficoltosa la guarigione delle lesioni alla mucosa orale e all'osso.

I dati finora raccolti sull'effetto dell'alendronato di sodio sull'epitelio orale non permettono ancora di comprendere i meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nell'induzione di alterazioni osservate nella vitalità e nella struttura dell'epitelio orale. Ad oggi non è stato chiarito se l'effetto dell'alendronato di sodio sulle cellule epiteliali sia di tipo diretto o secondario a interazioni fra il farmaco e il microambiente circostante, come osso, tessuto connettivo o microbiota orale. Seguendo la linea tracciata dai dati presentati in questa Tesi di Dottorato, è stato quindi avviato nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* uno studio finalizzato ad approfondire l'effetto diretto dell'alendronato di sodio sulla mucosa orale umana e la risposta indotta nell'epitelio orale, sfruttando il modello tridimensionale di colture organotipiche di mucosa orale umana, precedentemente descritto per gli effetti dell'*Esposizione acuta a fumo di sigaretta*.

CONCLUSIONI

La mucosa di rivestimento della cavità orale costituisce un importante strumento di difesa per il nostro organismo nei confronti di stimoli esogeni nocivi. La compromissione della funzionalità e della struttura della mucosa orale può infatti costituire una minaccia per gli apparati respiratorio e digerente nonché per i tessuti sottostanti, più facilmente esposti alla microflora orale in caso di lesioni all'epitelio orale.

Il fumo di sigaretta e l'alendronato di sodio sono due esempi di agenti esogeni che hanno come bersaglio la mucosa orale umana. Nonostante l'ampia diffusione nella popolazione dell'abitudine al fumo e del trattamento terapeutico con alendronato di sodio in pazienti osteoporotici, non sono stati ancora chiariti tutti i possibili effetti collaterali sul nostro organismo e, in particolare, sull'epitelio orale. Si tratta tuttavia di un ambito di ricerca di grande interesse, soprattutto per la necessità di individuare i processi cellulari antecedenti la comparsa della sintomatologia clinica in soggetti esposti cronicamente a queste tipologie di stress.

I dati presentati in questa Tesi di Dottorato mettono in luce la specificità della risposta dei cheratinociti orali umani in funzione della tipologia di stimolo e del tempo di esposizione all'agente esogeno.

In merito al fumo di sigaretta, l'esposizione *acuta* allo stress chimico-fisico comporta variazioni citoscheletriche a livello dei cheratinociti immediatamente soprabasali, senza alterazioni nella composizione molecolare delle principali giunzioni epiteliali orali. Nella risposta all'esposizione *cronica* al fumo di sigaretta e alendronato di sodio alle alterazioni citoscheletriche si aggiungono variazioni morfologiche e molecolari nei desmosomi negli strati più differenziati dell'epitelio orale. In particolare, il fumo di sigaretta determina la diminuzione di espressione dell'isoforma più abbondante nell'epitelio orale, la Dsg3. Questo dato supporta quanto riportato in letteratura sul ruolo di questa caderina nel mediare la trasduzione di segnali intracellulari. È stato infatti dimostrato il suo coinvolgimento nella regolazione della proliferazione cellulare (Mannan et al., 2011) e la sua stretta interazione con proteine regolatrici del processo di differenziazione terminale (Tsang et al., 2012). Inoltre, la

diminuzione di Dsg3 a livello della membrana plasmatica dei cheratinociti orali differenziati si verifica anche in seguito a esposizione acuta della mucosa orale umana a radiazioni ionizzanti (Donetti et al., 2009), senza compromissione dell'integrità dell'epitelio. Questo sottolinea la funzione non solo strutturale della Dsg3, ma anche di proteina di segnalazione. Dopo esposizione cronica ad alendronato di sodio è stata osservata, invece, la riduzione di espressione nei cheratinociti orali soprabasali della Dsg1. Tale dato è particolarmente interessante poiché la Dsg1 è un'isoforma tipicamente epidermica e conservata anche a livello dei corneodesmosomi (Jonca et al., 2011). Essa è quindi coinvolta in strutture di adesione mature e altamente resistenti a sollecitazioni meccaniche. L'effetto della terapia con alendronato di sodio nei pazienti osteoporotici fornisce evidenze a sostegno della possibile funzione regolatrice anche di questa isoforma di caderina.

Le alterazioni dei desmosomi osservate nella mucosa orale, anche in assenza di segni clinici macroscopici, riflettono quindi il ruolo cardine delle caderine desmosomiali nell'adattamento a stimoli prolungati provenienti dall'ambiente esterno (Green and Gaudry, 2000).

Inoltre, i risultati presentati in questo lavoro sottolineano l'importanza di analizzare la mucosa orale nella sua totalità, tenendo in considerazione le interazioni epitelio-mesenchimali, la stratificazione epiteliale e l'interazione fra cheratinociti a diversi gradi di differenziamento nell'epitelio.

Le peculiarità di struttura e funzione della mucosa orale umana hanno spesso indotto all'utilizzo di modelli sperimentali semplificati, per meglio comprendere i meccanismi alla base di patologie benigne e maligne della cavità orale. Tuttavia, tali modelli non riproducono in vitro le caratteristiche proprie della mucosa orale umana e precludono la possibilità di valutare le conseguenze degli stimoli esogeni sull'epitelio orale. L'utilizzo di biopsie di mucosa orale umana permette invece l'analisi della citoarchitettura tipica dell'organo anche dopo la messa in coltura secondo un opportuno modello sperimentale (Donetti et al., 2009) e quindi una più facile estrapolazione dei dati alla situazione in vivo. Tuttavia, motivazioni etiche limitano spesso il numero di pazienti reclutabili in questa tipologia di studi, riducendo l'ampiezza del campione analizzato ai soli frammenti di scarto ottenuti durante l'estrazione degli ottavi inclusi.

Come già dimostrato per le radiazioni ionizzanti (Donetti et al., 2009), il modello di colture organotipiche di mucosa orale umana normale si è rivelato appropriato anche per lo studio

della risposta a breve termine dell'epitelio al fumo di sigaretta, confermando la sua validità come strumento per la ricerca nel campo della biologia orale. Per questo, tale modello è stato scelto per uno studio avviato nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli* finalizzato ad approfondire gli effetti del trattamento acuto della mucosa orale umana normale con alendronato di sodio, per indagare le interazioni dirette fra farmaco ed epitelio orale.

BIBLIOGRAFIA

- (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: World Health Organization.
- Adams, D. (1976). Keratinization of the oral epithelium. *Annals of The Royal College of Surgeons of England* 58, 351-358.
- Allen, M. R. and Burr, D. B. (2009). The Pathogenesis of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: So Many Hypotheses, So Few Data. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 67, 61-70.
- Anastasi, G., Capitani, S., Carnazza, M. L., Cinti, S., De Caro, R., Donato, R. F., Ferrario, V. F., Fonzi, L., Franzi, A. T., Gaudio, E. et al. (2012). Trattato di anatomia umana.
- Andersen L, K. T., Mackenzie I. (1986). Oral mucous membrane. In *Human oral embryology and histology*. Copenhagen: Munksgaard.
- Bairati, A. (1997). *Anatomia umana*. Edizioni Minerva Medica, Torino.
- Barrett, A. W., Cruchley, A. T. and Williams, D. M. (1996). Oral mucosal Langerhans' cells. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 7, 36-58.
- Barrett, A. W. and Scully, C. (1994). Human oral mucosal melanocytes - a review. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 23, 97-103.
- Bartalis, J., Zhao, Y. L., Flora, J. W., Paine, J. B. and Wooten, J. B. (2009). Carbon-Centered Radicals in Cigarette Smoke: Acyl and Alkylaminocarbonyl Radicals. *Analytical Chemistry* 81, 631-641.
- Bhandari, M. (2003). Bisphosphonates and skeletal morbidity in patients with metastatic cancer. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 169, 1053.
- Bouquot, J. and Schroede, K. (1992). Oral Effects of Tobacco Abuse. *Journal of the American Dental Institute for Continuing Education* 43, 3-17.
- Boyle, J. O., Gumus, Z. H., Kacker, A., Choksi, V. L., Bocker, J. M., Zhou, X. K., Yantiss, R. K., Hughes, D. B., Du, B. H., Judson, B. L. et al. (2010). Effects of Cigarette Smoke on the Human Oral Mucosal Transcriptome. *Cancer Prevention Research* 3, 266-278.

- Bragulla, H. H. and Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* 214, 516-559.
- Brandner, J. M. (2009). Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72, 289-294.
- Brown, J. E., Neville-Webbe, H. and Coleman, R. E. (2004). The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocrine-Related Cancer* 11, 207-224.
- Caldeira, E. J., Carvalho, C. A. F., Padovani, C. R., Camilli, J. A., Garcia, P. J. and Cagnon, V. H. A. (2007). Morphological alterations in the epithelium of the oral mucosa of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long-term systemic nicotine treatment. *Archives of Oral Biology* 52, 83-89.
- Chapurlat, R. D., Arlot, M., Burt-Pichat, B., Chavassieux, P., Roux, J. P., Portero-Muzy, N. and Delmas, P. D. (2007). Microcrack frequency and bone remodeling in postmenopausal osteoporotic women on long-term bisphosphonates: A bone biopsy study. *Journal of Bone and Mineral Research* 22, 1502-1509.
- Chaw, S. Y., Abdul Majeed, A., Dalley, A. J., Chan, A., Stein, S. and Farah, C. S. (2012). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers - E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin - in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncology* 48, 997-1006.
- Chen, Y. J., Chang, J. T., Lee, L., Wang, H. M., Liao, C. T., Chiu, C. C., Chen, P. J. and Cheng, A. J. (2007). DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. *Oncogene* 26, 467-476.
- Cirillo, N., Lanza, A. and Prime, S. S. (2010). Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Experimental Cell Research* 316, 580-592.
- Colombo, G., Aldini, G., Orioli, M., Giustarini, D., Gornati, R., Rossi, R., Colombo, R., Carini, M., Milzani, A. and Dalle-Donne, I. (2010). Water-Soluble alpha,beta-Unsaturated Aldehydes of Cigarette Smoke Induce Carbonylation of Human Serum Albumin. *Antioxidants & Redox Signaling* 12, 349-364.
- Conte, P. and Guarneri, V. (2004). Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens. *Oncologist* 9, 28-37.

- Coppe, J. P., Boysen, M., Sun, C. H., Wong, B. J. F., Kang, M. K., Park, N. H., Desprez, P. Y., Campisi, J. and Krtolica, A. (2008). A role for fibroblasts in mediating the effects of tobacco-induced epithelial cell growth and invasion. *Molecular Cancer Research* 6, 1085-1098.
- Cutler, C. W. and Jotwani, R. (2006). Dendritic cells at the oral mucosal interface. *Journal of Dental Research* 85, 678-689.
- Dalle Donne, I., Gagliano, N., Bertolini, B., Bonfanti, P., Colombo, A., Rossi A. R., Stefanini, S., Milzani A. (2011). Istologia ed elementi di anatomia microscopica. EdiSES.
- Dobrucali, A., Tobey, N. A., Awayda, M. S., Argote, C., Abdunour-Nakhoul, S., Shao, W. and Orlando, R. C. (2002). Physiological and morphological effects of alendronate on rabbit esophageal epithelium. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 283, G576-G586.
- Domagala-Kulawik, J. (2008). Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59, 19-34.
- Donetti, E., Bedoni, M., Boschini, E., Dellavia, C., Barajon, I. and Gagliano, N. (2005). Desmocollin 1 and desmoglein 1 expression in human epidermis and keratinizing oral mucosa: a comparative immunohistochemical and molecular study. *Archives of Dermatological Research* 297, 31-38.
- Donetti, E., Bedoni, M., Capone, P., Gualerzi, A., Tartaglia, G. and Sforza, C. (2009). An in vitro model of human oral explants to study early effects of radiation mucositis. *European Journal of Oral Sciences* 117, 169-174.
- Green, J. R. (2003). Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 97, 840-847.
- Green, K. J. and Gaudry, C. A. (2000). Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 208-216.
- Green, K. J. and Simpson, C. L. (2007). Desmosomes: New perspectives on a classic. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 2499-2515.
- Hartsock, A. and Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1778, 660-669.
- Hoffmann, D. and Hoffmann, I. (1997). The changing cigarette, 1950-1995. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50, 307-364.

- Holthofer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S. and Leube, R. E. (2007). Structure and function of desmosomes. *International Review of Cytology* 264, 65-163.
- Hughes, D. E., MacDonald, B. R., Russell, R. G. and Gowen, M. (1989). Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *Journal of Clinical Investigation* 83, 1930-1935.
- Hughes, D. E., Wright, K. R., Uy, H. L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G. D., Mundy, G. R. and Boyce, B. F. (1995). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in-vitro and in-vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* 10, 1478-1487.
- Hume, W. J. and Potten, C. S. (1983). Proliferative units in stratified squamous epithelium. *Clin Exp Dermatol* 8, 95-106.
- Ishida-Yamamoto, A., Igawa, S. and Kishibe, M. (2011). Order and disorder in corneocyte adhesion. *Journal of Dermatology* 38, 645-654.
- Jamora, C. and Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 4, E101-E108.
- Jerome-Morais, A., Rahn, H. R., Tibudan, S. S. and Denning, M. F. (2009). Role for Protein Kinase C-alpha in keratinocyte growth arrest. *Journal of Investigative Dermatology* 129, 2365-2375.
- Jonca, N., Leclerc, E. A., Caubet, C., Simon, M., Guerrin, M. and Serre, G. (2011). Corneodesmosomes and corneodesmosin: from the stratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses. *European Journal of Dermatology* 21, 35-42.
- Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30, 127-138.
- Kharazmi, M., Sjoqvist, K. and Warfvinge, G. (2012). Oral Ulcers, a Little Known Adverse Effect of Alendronate: Review of the Literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 70, 830-836.
- Kim, R. H., Lee, R. S., Williams, D., Bae, S., Woo, J., Lieberman, M., Oh, J. E., Dong, Q., Shin, K. H., Kang, M. K. et al. (2011). Bisphosphonates Induce Senescence in Normal Human Oral Keratinocytes. *Journal of Dental Research* 90, 810-816.
- Kitajima, Y. (2002). Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clinical and Experimental Dermatology* 27, 684-690.

- Kottke, M. D., Delva, E. and Kowalczyk, A. P. (2006). The desmosome: cell science lessons from human diseases. *Journal of Cell Science* 119, 797-806.
- Kwon, O. S., Chung, J. H., Cho, K. H., Suh, D. H., Park, K. C., Kim, K. H. and Eun, H. C. (1999). Nicotine-enhanced epithelial differentiation in reconstructed human oral mucosa in vitro. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 12, 227-234.
- Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., Kousteni, S., Sinha, S., Garrett-Sinha, L. and Raghavan, S. (2008). Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 66, 839-847.
- Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J. M., Moll, I. and Franke, W. W. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *European Journal of Cell Biology* 81, 419-435.
- Lee, H. J., Guo, H. Y., Lee, S. K., Jeon, B. H., Jun, C. D., Park, M. H. and Kim, E. C. (2005). Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 34, 436-443.
- Lesclous, P., Najm, S. A., Carrel, J.-P., Baroukh, B., Lombardi, T., Willi, J.-P., Rizzoli, R., Saffar, J.-L. and Samson, J. (2009). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone* 45, 843-852.
- Mahoney, M. G., Hu, Y., Brennan, D., Bazzi, H., Christiano, A. M. and Wahl, J. K. (2006). Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Experimental Dermatology* 15, 101-109.
- Mannan, T., Jing, S., Foroushania, S. H., Fortune, F. and Wan, H. (2011). RNAi-mediated inhibition of the desmosomal cadherin (desmoglein 3) impairs epithelial cell proliferation. *Cell Proliferation* 44, 301-310.
- Matter, K. and Balda, M. S. (2003). Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30, 228-34.
- Melo, M. D. and Obeid, G. (2005). Osteonecrosis of the maxilla in a patient with a history of bisphosphonate therapy. *Journal of the Canadian Dental Association* 71, 111-113.
- Mirbod, S. M. and Ahing, S. I. (2000a). Tobacco-associated lesions of the oral cavity: Part I. Nonmalignant lesions. *Journal of the Canadian Dental Association* 66, 252-256.

- Mirbod, S. M. and Ahing, S. I. (2000b). Tobacco-associated lesions of the oral cavity: Part II. Malignant lesions. *Journal of the Canadian Dental Association* 66, 308-311.
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., Van Noort, R., Scutt, A. M. and Thornhill, M. H. (2007). Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *Journal of Dental Research* 86, 115-124.
- Morgan, C., Jeremiah, S. and Wagstaff, J. (2009). Metronomic administration of ibandronate and its anti-angiogenic effects in vitro. *Microvascular Research* 78, 453-458.
- Nelson, W. J. and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Pabst, A. M., Ziebart, T., Koch, F. P., Taylor, K. Y., Al-Nawas, B. and Walter, C. (2012). The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes-in vitro study. *Clinical Oral Investigations* 16, 87-93.
- Pappas, R. S. (2011). Toxic elements in tobacco and in cigarette smoke: inflammation and sensitization. *Metallomics* 3, 1181-1198.
- Pazianas, M. (2011). Osteonecrosis of the Jaw and the Role of Macrophages. *Journal of the National Cancer Institute* 103, 232-240.
- Petersen, P. E. (2009). Oral cancer prevention and control - The approach of the World Health Organization. *Oral Oncology* 45, 454-460.
- Polette, M., Mestdagt, M., Bindels, S., Nawrocki-Raby, B., Hunziker, W., Foidart, J. M., Birembaut, P. and Gilles, C. (2007). Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. In *Cells Tissues Organs*, vol. 185, pp. 61-5. Switzerland: 2007 S. Karger AG, Basel.
- Pouillot, A., Dayan, N., Polla, A. S., Polla, L. L. and Polla, B. S. (2008). The stratum corneum: a double paradox. *Journal of Cosmetic Dermatology* 7, 143-148.
- Presland, R. B. and Dale, B. A. (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: Function in health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11, 383-408.
- Presland, R. B. and Jurevic, R. J. (2002). Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *Journal of Dental Education* 66, 564-574.

- Pryor, W. A., Stone, K., Cross, C. E., Machlin, L. and Packer, L. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Tobacco Smoking and Nutrition: Influence of Nutrition on Tobacco-Associated Health Risks* 686, 27-28.
- Rao, R. (2008). Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Frontiers in Bioscience* 13, 7210-7226.
- Reid, I. R., Bolland, M. J. and Grey, A. B. (2007). Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone* 41, 318-320.
- Reszka, A. A., Halasy-Nagy, J. and Rodan, G. A. (2001). Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation. *Molecular Pharmacology* 59, 193-202.
- Righi, A., Betts, C. M., Marchetti, C., Marucci, G., Montebugnoli, L., Prati, C., Eusebi, L. H. U., Muzzi, L., Ragazzini, T. and Foschini, M. P. (2006). Merkel cells in the oral mucosa. *International Journal of Surgical Pathology* 14, 206-211.
- Rodgman, A., Smith, C. J. and Perfetti, T. A. (2000). The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Human & Experimental Toxicology* 19, 573-595.
- Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P. and Monkkonen, J. (2011). Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 49, 34-41.
- Rosdy, M. and Clauss, L. C. (1990). Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *Journal of Investigative Dermatology* 95, 409-414.
- Russell, R. G. G., Rogers, M. J., Frith, J. C., Luckman, S. P., Coxon, F. P., Benford, H. L., Croucher, P. I., Shipman, C. and Fleisch, H. A. (1999). The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *Journal of Bone and Mineral Research* 14, 53-65.
- Saito, M., Tucker, D. K., Kohlhorst, D., Niessen, C. M. and Kowalczyk, A. P. (2012). Classical and desmosomal cadherins at a glance. *Journal of Cell Science* 125, 2547-2552.
- Santini, D., Vincenzi, B., Avvisati, G., Dicuonzo, G., Battistoni, F., Gavasci, M., Salerno, A., Denaro, V. and Tonini, G. (2002). Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clinical Cancer Research* 8, 1080-1084.

- Scheller, E. L., Baldwin, C. M., Kuo, S., D'Silva, N. J., Feinberg, S. E., Krebsbach, P. H. and Edwards, P. C. (2011). Bisphosphonates Inhibit Expression of p63 by Oral Keratinocytes. *Journal of Dental Research* 90, 894-899.
- Scott, D. A. and Singer, D. L. (2004). Suppression of overt gingival inflammation in tobacco smokers - clinical and mechanistic considerations. *International Journal of Dental Hygiene* 2, 104-110.
- Semlali, A., Chakir, J., Goulet, J. P., Chmielewski, W. and Rouabhia, M. (2011). Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *Journal of periodontal research* 46, 533-541.
- Shani, T., Onn, A., Kabha, A., Ben-Dov, I., Adam, I., Amariglio, N., Yahalom, R., Rechavi, G., Trakhtenbrot, L. and Hirshberg, A. (2010). Chromosomal numerical aberrations in apparently normal oral mucosa of heavy smokers affected by lung cancer. *Oral Oncology* 46, 96-99.
- Squier, C. A. and Kremer, M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 29, 7-15.
- Standring, S. (2009). *Gray's Anatomy. The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40th edition: Churchill Livingstone.
- Suri, S., Monkkonen, J., Taskinen, M., Pesonen, J., Blank, M. A., Phipps, R. J. and Rogers, M. J. (2001). Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of Caco-2 cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway: A model of bisphosphonate-induced gastrointestinal toxicity. *Bone* 29, 336-343.
- Taybos, G. (2003). Oral changes associated with tobacco use. *American Journal of the Medical Sciences* 326, 179-182.
- Teh, M. T., Parkinson, E. K., Thurlow, J. K., Liu, F., Fortune, F. and Wan, H. (2011). A molecular study of desmosomes identifies a desmoglein isoform switch in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 40, 67-76.
- Theilig, C., Bernd, A., Ramirezbosca, A., Gormar, F. F., Bereiterhahn, J., Kellerstanislowski, B., Sewell, A. C., Rietbrock, N. and Holzmann, H. (1994). Reactions of human keratinocytes in-vitro after application of nicotine. *Skin Pharmacology* 7, 307-315.
- Thiele, J. J. (2001). Oxidative targets in the stratum corneum. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 14, 87-91.

- Thiele, J. J., Hsieh, S. N., Briviba, K. and Sies, H. (1999). Protein oxidation in human stratum corneum: Susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 113, 335-339.
- Thielen, A., Klus, H. and Muller, L. (2008). Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. *Experimental and Toxicologic Pathology* 60, 141-156.
- Tsang, S. M., Brown, L., Gadmor, H., Gammon, L., Fortune, F., Wheeler, A. and Wan, H. (2012). Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Experimental Cell Research* 318, 2269-2283.
- Tsukita, S., Yamazaki, Y., Katsuno, T. and Tamura, A. (2008). Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27, 6930-6938.
- Tu, C.-L., Crumrine, D. A., Man, M.-Q., Chang, W., Elalieh, H., You, M., Elias, P. M. and Bikle, D. D. (2012). Ablation of the Calcium-Sensing Receptor in Keratinocytes Impairs Epidermal Differentiation and Barrier Function. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 2350-2359.
- Twiss, I. M., Dewater, R., Denhartigh, J., Sparidans, R., Rampkoopmanschap, W., Brill, H., Wijdeveld, M. and Vermeij, P. (1994). Cytotoxic effects of pamidronate on monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells and its epithelial transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83, 699-703.
- Twiss, I. M., Pas, O., Ramp-Koopmanschap, W., den Hartigh, J. and Vermeij, P. (1999). The effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human epithelial (Caco-2) cells, an in vitro model for intestinal epithelium. *Journal of Bone and Mineral Research* 14, 784-791.
- Vanbokhoven, H., Melino, G., Candi, E. and Declercq, W. (2011). p63, a story of mice and men. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 1196-1207.
- Vitte, C., Fleisch, H. and Guenther, H. L. (1996). Biphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 137, 2324-2333.
- Wallace, J. L., Dickey, M., McKnight, W., Bastaki, S. and Blank, M. A. (1999). N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 13, 1675-1682.

- Wallace, L., Roberts-Thompson, L. and Reichelt, J. (2012). Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity. *Journal of Cell Science* 125, 1750-1758.
- Warnakulasuriya, S. (2009). Causes of oral cancer - an appraisal of controversies. *British Dental Journal* 207, 471-475.
- Watanabe, I.-s. (2004). Ultrastructures of mechanoreceptors in the oral mucosa. *Anatomical science international* 79, 55-61.
- Wickenden, J. A., Clarke, M. C. H., Rossi, A. G., Rahman, I., Faux, S. P., Donaldson, K. and MacNee, W. (2003). Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29, 562-570.
- Windoffer, R., Beil, M., Magin, T. M. and Leube, R. E. (2011). Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *Journal of Cell Biology* 194, 669-678.
- Yamada, K., Jordan, R., Mori, M. and Speight, P. M. (1997). The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases* 3, 82-5.
- Yerger, V. B. and Malone, R. E. (2006). Melanin and nicotine: A review of the literature. *Nicotine & Tobacco Research* 8, 487-498.
- Yogesh, T., Narayan, T., Shreedhar, B., Shashidara, R. and Leekymohanty. (2011). The expression of E-cadherin and cathepsin-D in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A comparative analysis between immunohistochemistry and routine histopathology. *Journal of oral and maxillofacial pathology* 15, 288-294.
- Zavras, A. I. (2011). The impact of bisphosphonates on oral health: lessons from the past and opportunities for the future. *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw* 1218, 55-61.
- Zee, K. Y. (2009). Smoking and periodontal disease. *Australian Dental Journal* 54, S44-S50.

APPENDICE A

PROTOCOLLI SPERIMENTALI

Tabella A1. Terreno di coltura per colture organotipiche di mucosa orale umana. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma Aldrich (MO, Stati Uniti).

	Per 150 ml	Concentrazione finale
Dulbecco's Modified medium (DMEM)	96,36 ml	
HAM F-12	32,12 ml	
Penicillina – Streptomicina in soluzione 10 ml/l equivalente a 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina	1,5 ml	
L – Glutamina 200mM	3 ml	0,584 g/l
Adenina	0,0036 g	0,0243 g/l
Amfotericina B	0,0004 g	5,6 mg/l
Idrocortisone 50 µg/ml	1,2 ml	0,4 µg/ml
Epidermal Grow Factor (EGF) 0,002 mg/ml	0,75 ml	10 ng/ml
Insulina 10 mg/ml	75 µl	5 ng/ml
Fetal Bovine Serum (FBS)	15 ml	10%

Tabella A2. Fissazione, disidratazione, inclusione e taglio dei frammenti biotipici di mucosa orale. (TA = temperatura ambiente; PBS= Phosphate Buffer Saline 0,1 M pH 7,4)

Processazione per la microscopia ottica	<i>Fissazione</i>	Paraformaldeide 4% in PBS 0,1M pH 7,4	5h a TA
		Lavaggi in PBS	3 da 30' a TA
	<i>Disidratazione</i>	Etanolo 70%	Una notte a 4 °C
		Etanolo 96%	3 da 30' a TA
		Etanolo 100%	3 da 30' a TA

	<i>Chiarificazione</i>	Xilolo	3 da 30' a TA
	<i>Infiltrazione</i>	Paraffina fusa	2 da 1h in stufa a 60°C
	<i>Inclusione</i>		
	<i>Taglio</i>	Le sezioni sono state tagliate a uno spessore di 4 µm con microtomo a rotazione (RM2155 - Leica Microsystems, Germania) e raccolte su vetrini xilanizzati come da protocollo in Tabella A4	
Processazione per la microscopia elettronica a trasmissione	<i>Fissazione</i>	Glutaraldeide 3% in tampone fosfato di Sorensen 0.1M pH 7,4	Una notte a 4 °C
		Lavaggi in tampone fosfato di Sorensen	3 da 30' a TA
	<i>Post-fissazione</i>	Osmio tetrossido 2 % in tampone fosfato di Sorensen	2h a 4°C
		Lavaggi in tampone fosfato di Sorensen	3 da 30' a 4°C
	<i>Disidratazione</i>	Acetone 50 %	10' a 4°C (2 cambi)
		Acetone 70 %	10' a 4°C (2 cambi)
		Acetone 95 %	10' a 4°C (2 cambi)
		Acetone 100%	20' a 4°C
		Acetone anidro	20' a 4°C (2 cambi)
	<i>Infiltrazione</i>	Acetone 100%/Araldite 3:1	30' a TA
		Acetone 100%/Araldite 1:1	30' a TA
		Acetone 100%/Araldite 1:3	30' a TA
		Araldite pura	una notte TA
	<i>Inclusione</i>	Ambiente Araldite pura	24h a 60°C
	<i>Taglio</i>	Le sezioni sono state tagliate con ultramicrotomo (Reichert Ultracut R, Leica Microsystems, Germania) a 200 nm (sezioni semifini) e 60 nm (sezioni fini)	

Al termine della processazione per la microscopia elettronica, le sezioni semifini sono colorate con blu di toluidina e osservate in microscopia ottica; le sezioni fini sono colorate con acetato di uranile e piombo citrato e osservate con microscopio elettronico a trasmissione JEM 1010 (Jeol, Giappone).

Tabella A3. Soluzioni tampone. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Carlo Erba Reagenti (Italia).

Tampone fosfato - Phosphate Buffered Saline (PBS) 0,1 M pH 7,4	5,3 g cloruro di sodio 0,13 g cloruro di potassio 0,13 g fosfato acido di potassio 1,94 g sodio fosfato bibasico dodecaidrato 1 l acqua distillata
Tampone fosfato di Sorensen 0,1 M pH 7,4	MONOSODIO FOSFATO 0,2 M 13,80 g di monosodio fosfato 500 ml di acqua distillata SODIO FOSFATO BIBASICO 12-IDRATO 0,2 M 35,81 g sodio fosfato bibasico dodecaidrato 500 ml di acqua distillata 40,5 ml di soluzione monosodio fosfato 0,2 M 9,5 ml di soluzione sodio fosfato bibasico 12-idrato 0,2 M 50 ml di acqua distillata
Tampone citrato 0,01 M pH 6	ACIDO CITRICO 0,1M 21,01 g acido citrico in 1000 ml di acqua distillata CITRATO DI SODIO 0,1M 29,41 g citrato di sodio in 1000 ml di acqua distillata 9 ml di soluzione acido citrico 0,1M 41 ml di soluzione citrato di sodio 0,1M 450 ml di acqua distillata

Tabella A4. Xilanizzazione vetrini portaoggetto. Trattamento dei vetrini portaoggetto per conferire carica elettrostatica necessaria per una migliore adesione delle sezioni al vetro. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Carlo Erba Reagenti (Italia).

	Tempo
Soluzione 5% di agente tensioattivo concentrato in acqua distillata	1h
Acqua corrente	3-4h
Acqua distillata	Passaggio veloce
Asciugatura in stufa a 37°C	
Etanolo 100%	Passaggio veloce

Asciugatura in stufa a 37°C	
Soluzione 2% di 3-amminopropiltriectossisilano in acetone 100%	2'
Acqua distillata	2' (2 cambi)
Asciugatura in stufa a 37°C	Una notte

Tabella A5. Colorazioni istochimiche. Schema riassuntivo dei protocolli seguiti per le colorazioni istochimiche eseguite su sezioni in paraffina. I coloranti e i solventi sono stati acquistati da Carlo Erba Reagenti (Italia).

EMATOSSILINA/EOSINA

Colorazione di base utile per un'analisi morfologica d'insieme. I coloranti utilizzati permettono di distinguere componenti acide e basiche dei tessuti e delle cellule.

Blu violetto: componenti cellulari basofili, ossia carichi negativamente, come acidi nucleici, proteine di membrana, elastina.

Rosa: componenti cellulari acidofili, ossia carichi positivamente, come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali, le fibre collagene.

Soluzioni	Protocollo su sezioni in paraffina
EMATOSSILINA DI CARAZZI	Sparaffinatura :
25 g Allume potassico in 350 ml di acqua distillata (a caldo)	- xilolo 10' (2 cambi)
0,5 g Ematossilina (a riscaldamento sospeso)	- scala decrescente degli alcoli 5' ciascuno
0,1 g Iodato potassico in 50ml di acqua distillata (a freddo)	- acqua distillata 5'
A soluzione di ematossilina raffreddata unire le due soluzioni	Ematossilina di Mayer 10'
100 ml Glicerina pura bidistillata	Acqua di fonte 5'
	Eosina 0,3% 2'
	Passaggio veloce in acqua distillata
	Passaggi veloci scala crescente degli alcoli
	Xilolo 5' (2 cambi)
	Montaggio con Entellan
SOLUZIONE EOSINA 1% ACIDA	
Eosina gialla: 1 g in 100 ml di acqua distillata	
Acido acetico : 4 gocce	

DANE E HERMAN

Colorazione tetracromica utile per la dimostrazione delle cheratine e precheratine.

Blu-turchino: mucopolisaccaridi acidi.

Arancione: cheratine e precheratine.

Marrone: nuclei.

Soluzioni	Protocollo su sezioni in paraffina
EMATOSSILINA DI MAYER Per 500 ml di soluzione acquosa aggiungere a caldo: 5 g Ematossilina 50 g Allume di potassio A soluzione raffreddata aggiungere: 0,2g Iodato di sodio 50 g Cloralio idrato 500 ml di acqua distillata 1 g Acido citrico Unire le soluzioni e dopo un'ora circa filtrare FLOXINA B 1% 2 g Floxina B 200 ml Acqua distillata ALCIAN BLU 1% + ACIDO ACETICO 1% (1:1) 1 g Alcian Blu 199 ml Acqua distillata 1 ml Acetico glaciale 100% ORANGE G 0.5% IN ACIDO FOSFOTUNGSTICO 2% 4 g Acido fosfotungstico 1 g Orange G 200 ml Acqua distillata	Sparaffinatura : - xilolo 10' (2 cambi) - scala degli alcoli a concentrazione decrescente 5' ciascuno - acqua distillata 5' Ematossilina di Mayer 10' Acqua di fonte 5' Sciacquare in acqua distillata Floxina B 1% 3' Acqua di fonte 1' Sciacquare in acqua distillata Alcian Blu 1% + Acido acetico 1% 5' Acqua di fonte 2' Sciacquare in acqua distillata Orange G 0.5% in acido fosfotungstico 2% 13' Immergere 10 volte in etanolo 96% (2 cambi) Immergere 35 volte in etanolo assoluto (2 cambi) Passaggio veloce in acqua distillata Xilolo 5' (2 cambi) Montaggio con Entellan

Tabella A6. Reazioni di immunofluorescenza. Schema riassuntivo degli anticorpi utilizzati e dei protocolli seguiti per le reazioni di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina.

Smascheramento antigenico				
BrdU	Novocastra/ Leica Microsystems, Germania	pepsina 0.05% pH 1,5 30' TA	1:200	1h TA
Dsg1	Progen Biotechnik, Germania	forno a microonde (750W) portare a ebollizione 3 volte per 20"	prediluito	1h TA

		+ pepsina 0.001% pH 1,5 15' a 37°C		
Dsg3	Progen Biotechnik, Germania	forno a microonde (750W) portare a ebollizione 3 volte per 20" + pepsina 0.001% pH 1,5 15' a 37°C	prediluito	1h TA
Dsc2	Sigma Aldrich, Aldrich, MO, Stati Uniti	autoclave a 125°C 4'	1:250	1h TA
E-caderina	BDTransduction Laboratories, NJ, Stati Uniti	autoclave a 120°C 10'	1:1000	1h TA
β-catenina	Novocastra/ Leica Microsystems, Germania	autoclave a 120°C 10'	1:100	una notte 4°C
Occludina	Invitrogen/ Life Technologies, NY, Stati Uniti	forno a microonde (750W) portare a ebollizione 3 volte per 1' + pepsina 0.05% pH 1,5 25' a 37°C	1:100	una notte 4°C
K10	Progen Biotechnik, Germania	forno a microonde (750W) portare a ebollizione 3 volte per 4"	1:10	una notte 4°C
K14	Santa Cruz, CA, Stati Uniti	pepsina 0.05% pH 1,5 15' TA	1:200	una notte 4°C
p53	Dako, Denmark	forno a microonde (750W) portare a ebollizione 2 volte per 5'	1:25	1h TA
Caspasi 3	Cell Signalling, MA, Stati Uniti	forno a microonde (750W) portare a ebollizione 2 volte per 5'	1:200	una notte 4°C
goat anti- mouse FITC	Jackson Immuno Research, PA, Stati Uniti	-	1:200	1h TA
goat anti- rabbit Alexa Fluor 388	Molecular Probes/ Life Technologies, NY, Stati Uniti	-	1:200	1h TA

I passaggi specifici di smascheramento antigenico sono stati sempre preceduti da sparaffinatura (xilolo 10' per 2 cambi) e reidratazione delle sezioni (scala degli alcoli a

concentrazione decrescente fino all'acqua distillata, 5' ciascuno) seguiti da immersione per 5' in PBS 0,1 M pH 7,4 (vedi Tabella A3). Tale tampone è stato utilizzato per tutte le successive diluizioni di reagenti quali siero e anticorpi. In particolare gli anticorpi primari e secondari sono stati diluiti in PBS contenente albumina di siero bovino all'1% per ridurre il rischio di interazioni aspecifiche fra l'anticorpo e il tessuto.

Nella reazione di immunofluorescenza per la rivelazione della BrdU incorporata dalle cellule in attiva proliferazione la doppia elica di DNA è aperta immergendo le sezioni per 30' in HCl 2N a TA. L'acidità viene poi neutralizzata con l'incubazione in tetraborato di sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) per 10' a TA prima dello smascheramento antigenico e dell'incubazione con l'anticorpo primario. In caso di smascheramento al calore, il tampone utilizzato è tampone citrato pH 6 (vedi Tabella A3).

In tutti gli esperimenti l'incubazione con l'anticorpo primario è preceduta da incubazione per 30' a TA con siero di capra per il bloccaggio dei siti aspecifici di legame. Infine, ad eccezione degli esperimenti per la rivelazione della BrdU, prima del montaggio con Mowiol (vedi Tabella A7) le sezioni sono state incubate 5' a TA con DAPI (Sigma Aldrich) intercalante del DNA che permette la controcolorazione dei nuclei.

In ogni reazione ciascun vetrino presentava almeno due sezioni; una sezione per vetrino è selezionata come controllo negativo della reazione, ossia viene omesso l'anticorpo primario.

TA: temperatura ambiente; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro; BrdU: 5-bromo-2'-deossiridina; PBS: Phosphate Buffered Saline.

Tabella A7. Mowiol. Soluzione idrofila per il montaggio dei vetrini coprioggetto.

Soluzioni	Protocollo
TRIS 0.2 M pH 8.5	2,4 g di Mowiol in 6 ml di acqua distillata
0,5 g di TRIZMA BASE	12 ml TRIS 0.2 M pH 8.5
in 20 ml di acqua distillata	In agitazione per 2-3 ore
	6 ml di glicerolo e agitare
	Stufa a 50 - 60°C 10'
	Centrifuga a 4000 rpm 15'
	Conservare in aliquote a -20°C

I dati presentati in questa Tesi di Dottorato sono stati oggetto di pubblicazione in riviste internazionali e in un capitolo di libro:

Donetti E, **Gualerzi A**, Bedoni M, Volpari T, Sciarabba M, Tartaglia G, Sforza C. Desmoglein 3 and keratin 10 expressions are reduced by chronic exposure to cigarette smoke in human keratinised oral mucosa explants. *Archives Of Oral Biology*, 2010; 55: 815-823.

Gualerzi A, Sciarabba M, Tartaglia G, Sforza C, Donetti E. Acute effects of cigarette smoke on three-dimensional cultures of normal human oral mucosa. *Inhalation Toxicology*, 2012; 24: 382–389.

Donetti E, **Gualerzi A**. Effect of chronic smoke in human oral mucosa: the morphological point of view. Chapter 7 in: *Cigarettes: Chemical Composition, Consumption, and Health Effects*. Nova Publisher, Inc. Chapter ID: 6865. 2012.

RINGRAZIAMENTI

Grazie alla Prof.ssa Vizzotto, Coordinatore del Corso di Dottorato Scienze Morfologiche

Grazie alla Prof.ssa Sforza, Direttore della Scuola di Dottorato in Scienze Morfologiche Fisiologiche e dello Sport e del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, dove ho lavorato nei miei quattro anni di ricerca

Grazie alla Prof.ssa Donetti che mi ha seguito in questi tre anni di Dottorato completando un percorso formativo iniziato con il mio tirocinio di Tesi Triennale quando per la prima volta entravo in un laboratorio di ricerca e iniziavo a coltivare la mia passione per la ricerca, la morfologia e soprattutto la microscopia elettronica

Grazie a mamma e papà che mi hanno sostenuto a continuare nel percorso di studi che amo

Grazie a Fabio che mi incoraggia a non demordere e a proteggere i miei sogni, nonostante le difficoltà

Grazie ad Alessandra e Laura per l'aiuto e il sostegno in laboratorio