

(Allegato/Annex B)

PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT

Cognome/Surname	Angellotti
Nome / Name	Giuseppe
Titolo del progetto / Project title	Preparazione di un Drug Delivery System contenente antibiotici e sostanze di origine naturale per il trattamento dell'osteonecrosi della mandibola
Corso di dottorato / PhD	Oncologia e Chirurgia Sperimentali
Firma del candidato/ Applicant's signature	

1 - Sommario / Abstract

Osteonecrosi della mandibola è una patologia infettiva, potenzialmente invalidante, la cui progressione può essere impedita con un opportuno trattamento farmacologico e con una corretta igiene orale. Lo scopo di questo progetto è la realizzazione di un Drug Delivery System (DDS) costituito da una struttura tridimensionale a base di polimeri naturali, semisintetici e/o sintetici, in grado di rilasciare in modo costante nel tempo l'antibiotico e i veicoli lipidici nanoparticellari, nello specifico i Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC), contenenti le sostanze funzionali di origine naturale. Suddetta formulazione dovrà essere applicata localmente nel tessuto lesa con l'obiettivo di favorirne la rigenerazione e impedire lo sviluppo della patologia.

2 - Descrizione del progetto / Project

L'osteonecrosi della mandibola (osteonecrosis of the jaw, ONJ) è un'invalidante patologia infettiva e necrotizzante a carattere progressivo e con scarsa tendenza alla guarigione, descritta solo recentemente in associazione alla terapia con bisfosfonati, ed in passato all'associazione all'uso del fosforo bianco, alla radioterapia e chemioterapia. La lesione conclamata è tipicamente una ulcerazione eritematosa cronica della mucosa orale che non risponde alle terapie antibiotiche generali e locali, con affioramento di osso necrotico sottostante, biancastro, spesso con presenza di essudato purulento, con possibile sanguinamento spontaneo. Le fasi iniziali della malattia sono asintomatiche, successivamente si presentano segni e sintomi piuttosto subdoli e aspecifici, che i pazienti tendono a trascurare per la loro minima entità. Per un lungo periodo vi può essere solo la presenza di una piccola area di osso esposto senza alcun sintomo di accompagnamento. Nelle fasi successive con l'estensione del processo alle regioni contigue, i sintomi che si associano all'ONJ possono essere vari, con parestesie e disestesie al labbro inferiore, alla mandibola, alla lingua ed alla guancia, alitosi, trisma, disfagia. In questa fase si manifesta il dolore che può essere di notevole entità e richiedere terapie specifiche.

L'utilizzo di radiazioni ionizzanti nella terapia antitumorale, può causare la morte delle cellule osteoblastiche contemporaneamente all'insorgenza di uno stato infiammatorio cronico. Questi eventi portano all'insorgenza di una fibrosi ossea che contribuisce a ridurre la perfusione sanguigna, diventando il principale fattore di rischio della necrosi tissutale (Lyons *et al*, 2008). Le metastasi ossee trattate con chemioterapici hanno potenzialmente un ruolo chiave nell'insorgenza di questa patologia. In particolare i bisfosfonati hanno un effetto antiangiogenetico riducendo la rigenerazione ossea e attivando i linfociti T; questi farmaci si accumulano nella matrice ossea, aumentando il rischio di osteonecrosi della mascella anche a distanza di anni dall'interruzione della loro assunzione (Cleardin, 2013). Gli agenti antiangiogenetici attivi contro il recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEFG), quali il Bevacizumab, vengono utilizzati come antichemioterapici per ridurre l'eccessiva vascolarizzazione del tessuto tumorale. Questi farmaci, però, ledono anche il microambiente vascolare portando un danno al tessuto osseo mandibolare, che può evolvere in osteonecrosi (Yoneda *et al*, 2017). Alla luce di queste premesse il progetto che si desidera presentare è la realizzazione di un innovativo Drug Delivery System (DDS) che permette di veicolare localmente antibiotici e sostanze nutraceutiche, aventi proprietà antiossidanti e coadiuvanti la rigenerazione tissutale. Per ottenere questo tipo di attività bisogna progettare una forma di dosaggio che sia in grado di rilasciare i principi attivi in maniera controllata e costante nel tempo. A tal proposito i sistemi tecnologici maggiormente utilizzati sono i sistemi matriciali che, per definizione, sono costituiti da una dispersione solida uniforme del principio attivo all'interno di una matrice polimerica, che può essere di natura idrofila o idrofoba. Il termine matrice indica la struttura tridimensionale della rete che si forma e che contiene il farmaco ed altri componenti al suo interno e permette un lento rilascio del principio attivo stesso, poiché intrappolato nelle "maglie" dell'eccipiente. I meccanismi di rilascio del principio attivo sono innumerevoli e diversi tra di loro, come la diffusione dalle matrici inerti, lo swelling dagli hydrogels, la pore formation

dalle forme solide, il controllo fisico e quello chimico. Questi sistemi devono essere inoltre bioadesivi, ovvero devono avere la capacità di aderire al tessuto o alla sostanza con cui vengono messi in contatto. Il meccanismo dell'adesione è un processo in cui si ha la formazione di nuovi legami chimici e fisici tra le molecole del polimero della forma di dosaggio e quelli del sito di applicazione. Come molecole polimeriche la scelta potrebbe ricadere su polimeri di sintesi come Polivinilpirrolidone (PVP), Polimetilmetacrilati (Eudragit®), polossameri, polimeri con gruppi tiolici, che conferiscono alla matrice proprietà adesive, e polimeri naturali come l'Acido Jaluronico, la chitina ed il chitosano, i polisaccaridi e i loro derivati (Russo *et al*, 2016). Nell'ultimo decennio è considerevolmente aumentato l'utilizzo di Acido Jaluronico in odontoiatria per le sue rilevanti capacità nel favorire la rigenerazione tissutale, la cicatrizzazione post-operatoria e modulare i fenomeni infiammatori che interessano i tessuti parodontali. La comunità scientifica sta focalizzando l'attenzione sulle capacità del polimero di intervenire attivamente nei processi di rigenerazione ossea, sia negli interventi di implantologia, che in quelli seguenti l'estrazione dentaria. In particolare, il ruolo terapeutico dell'Acido Jaluronico nelle affezioni parodontali è stato ampiamente trattato e discusso in letteratura, sottolineando il suo ruolo chiave sia nel ristabilire la struttura e la funzionalità tissutale, che nella rigenerazione e riparazione in seguito ad interventi chirurgici (Casale *et al*, 2016).

Il chitosano è un materiale versatile con dimostrata attività antimicrobica. Il peso molecolare (MW) e il grado di acetilazione (DA) sono fattori importanti nel determinare tale attività. In generale, più basso è il MW e il DA, maggiore è l'efficacia nel ridurre la crescita e la moltiplicazione dei microrganismi. Il chitosano sembra agire con meccanismo diverso sui batteri gram-positivi rispetto ai gram-negativi, ma in entrambi i casi in modo soddisfacente. I derivati idrosolubili, ottenuti mediante l'introduzione chimica di un metile nella catena principale, migliorano sia l'applicabilità del chitosano in un ampio intervallo di pH che l'attività antimicrobica, aprendo una vasta gamma di possibilità di utilizzo (Kong *et al*, 2010).

Molte sostanze naturali con una interessante attività antiossidante ed antiinfiammatoria spesso non vengono utilizzate in associazione alle terapie farmacologiche a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche che le rendono scarsamente solubili nei fluidi biologici. Esse potrebbero essere utilmente veicolate attraverso nanoparticelle lipidiche, nello specifico i Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC), a loro volta intrappolate nelle maglie polimeriche di un supporto idrofilo matriciale. Le NLC sono sistemi nanometrici sviluppati all'inizio del secolo corrente per superare le limitazioni tecnologico-formulative della prima classe di nanoparticelle lipidiche, le Nanoparticelle Solide Lipidiche (SLN). Le NLC hanno una struttura cristallina meno ordinata costituita da miscele di lipidi altofondenti e bassofondenti, che consente loro di superare gli inconvenienti associati all'utilizzo delle SLN. È possibile infatti ottenere valori di *drug loading* più elevati dal momento che il farmaco si solubilizza meglio nella matrice amorfa costituita dai due lipidi, ed un rilascio controllato riproducibile anche dopo stoccaggio, poiché le transizioni polimorfe nella miscela lipidica avvengono più lentamente o addirittura inibite (Beloqui *et al*, 2016). Un importante vantaggio di questi sistemi è la loro elevata biocompatibilità e biodegradabilità, poiché costituiti da sostanze di natura lipidica potenzialmente affini alle strutture lipofile delle membrane biologiche tissutali. Queste caratteristiche conferiscono alle NLC proprietà di *enhancer* delle sostanze funzionali in esse caricate, ottimizzandone l'accumulo nel tessuto bersaglio.

Tra gli antibiotici maggiormente utilizzati nel trattamento delle affezioni parodontali e da poter somministrare mediante un DDS opportunamente formulato, si distinguono: il Metronidazolo, la clindamicina, la ciprofloxacina. La suddetta formulazione sarebbe in grado di rilasciare in modo costante nel tempo l'antibiotico, potenziandone l'efficacia durante il trattamento.

Tra le sostanze funzionali di origine naturale che si desiderano utilizzare, ritroviamo:

- Resveratrolo: sostanza polifenolica presente nelle bucce degli acini d'uva che sembra mostrare una promettente attività come coadiuvante nel trattamento dell'ONJ iatrogeno. In particolare uno studio *in vitro* condotto su una coltura cellulare di osteoblasti umani, ha evidenziato che la somministrazione contemporanea di fattori di crescita concentrati (CGF) e Resveratrolo promuove la proliferazione e differenziazione degli osteoblasti e ha un ruolo protettivo su quelli trattati con bisfosfonati (Murgia *et al*, 2019);
- Curcumina: sostanza polifenolica derivante dalla Curcuma Longa. Recentemente è stata valutata un'attività antitumorale, per i suoi effetti in reazioni coinvolte nei processi di mutagenesi, oncogenesi, ciclo regolatore cellulare, apoptosi e metastasi. Essa infatti ha dimostrato un effetto anti proliferativo in più tipi di tumori, un'inibizione del fattore di trascrizione

NF- κ B e un'influenza su recettori di fattori di crescita e molecole per l'adesione cellulare coinvolte nei processi di crescita del tumore, angiogenesi e metastasi. Uno studio, del 2012, ha dimostrato, mediante studi *in vitro* su colture cellulari di fibroblasti umani, che suddetta sostanza è capace di ridurre indirettamente l'attività degli osteoclasti a favore degli osteoblasti, modulando l'espressione dell'ossido nitrico (Moran *et al*, 2012);

- Quercetina: è il più importante fitoestrogeno estratto dalle cipolle, mele e uva. Possiede proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antimicrobiche, pro/anti apoptosi e vasodilatatorie. Uno studio ha dimostrato che la somministrazione di questa sostanza a conigli bianchi della Nuova Zelanda, con difetti ossei indotti, aumentava la crescita del tessuto osseo localmente al sito di applicazione (Wong *et al*, 2008).

La prima fase del progetto verterà nello screening dei lipidi necessari per la preparazione delle NLC con successiva caratterizzazione delle stesse. La scelta dei lipidi deve essere ponderata da una parte in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza funzionale che vogliamo veicolare, dall'altra con la finalità di ottenere una miscela capace di fondere ad una temperatura comparabile con quella fisiologica.

Per la caratterizzazione delle NLC utilizzeremo le seguenti metodiche:

- Analisi dimensionale delle particelle, indice di polidispersità (PDI) e misure di potenziale Z;
- Analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione e/o a trasmissione;
- Valutazione dell'efficienza di incapsulazione e drug loading delle nanoparticelle;
- Analisi termica mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC), per valutare la stabilità nel tempo della formulazione;
- Valutazione del rilascio del principio attivo dalla formulazione mediante studi *in vitro*;
- Valutazione della permeazione del principio attivo rilasciato mediante studi *ex vivo*;

La seconda fase del progetto sarà incentrata nella scelta del/i polimero/i e nella ricerca della formulazione ottimale, per la realizzazione del supporto matriciale, nel quale verranno intrappolate gli antibiotici e le NLC contenenti le sostanze funzionali. Seguiranno tutte le analisi di caratterizzazione del sistema matriciale secondo le seguenti metodiche:

- Analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione (SEM);
- Analisi per valutare la capacità di assorbire acqua, valutando le variazioni morfologiche quali rigonfiamento e dissoluzione;
- Valutazione della capacità del sistema matriciale di rilasciare la formulazione mediante studi *in vitro*;
- Analisi quantitative mediante tecniche spettrofotometriche;

Infine, sulla formulazione finale, verranno condotti inizialmente studi di citotossicità *in vitro*, solitamente su colture cellulari di fibroblasti umani, seguiti successivamente da studi *in vivo* su ratti ai quali è stata indotta l'osteonecrosi della mandibola, per valutare l'efficacia terapeutica della formulazione.

Alla luce di quanto esposto, la formulazione contenenti tali sostanze, potrebbe rappresentare un valido approccio nel trattamento dell'ONJ, coadiuvando le caratteristiche dei sistemi matriciali con quelle delle NLC, in modo da localizzare ed ottimizzare l'attività dell'antibiotico e delle sostanze funzionali.

3 - Bibliografia / References

Beloqui, A., Solinís, M. Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J., & Préat, V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*; 2016; 12(1), 143–161

Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B, Lopez MA, Carinci F, Salvinelli F. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol.*; 2016; 29(4):572-582

- Clezardin P. Mechanisms of action of bisphosphonates in oncology: a scientific concept evolving from antiresorptive to anticancer activities. *Bonekey Rep.* 2013; 2:267
- Murgia D., Mauceri R., Campisi G. & De Caro V. Advance on Resveratrol Application in Bone Regeneration: Progress and Perspectives for Use in Oral and Maxillofacial Surgery; *Biomolecules*; 2019; 9, 94
- Lyons A, Ghazali N. Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of its pathophysiology and treatment. *Br J OralMaxillofac Surg.* 2008; 46:653---60
- Moran JM, Roncero-Martin R, Rodriguez-Velasco FJ. Effects of curcumin on the proliferation and mineralization of human osteoblast-like cells: implications of nitric oxide. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):16104–16118
- Wong, R. W. K., & Rabie, A. B. M. Effect of quercetin on bone formation. *Journal of Orthopaedic Research*; 2008; 26(8), 1061–1066
- Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaws: Position Paper 2017 of the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw,. *J Bone Miner Metab.* 2017; 35:6---19
- Kong, Ming & Guang Chen, Xi & Xing, Ke & Jin Park, Hyun. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International journal of food microbiology.* 2010; 144. 51-63.
- Russo E, Selmin F, Baldassari S, Gennari CGM, Caviglioli G, Cilurzo F. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016; 32:113–25.