

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>PREMESSA</b>  | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUZIONE</b>                                      | <b>3</b>  |
| EMBRIOLOGIA E SVILUPPO DELL'APPARATO MUSCOLO-SCHELETRICO | 3         |
| COMPLESSO DI ACCRESCIMENTO EPIFISO-METAFISARIO           | 6         |
| <i>Componente cartilaginea</i>                           | 8         |
| <i>Componente ossea</i>                                  | 11        |
| <i>Componente fibrosa</i>                                | 13        |
| CRESCITA E SVILUPPO                                      | 24        |
| <i>Accrescimento scheletrico</i>                         | 24        |
| <i>Auxologia</i>   | 29        |
| BIOMECCANICA DEL COMPLESSO EPIFISO-METAFISARIO           | 35        |
| <i>Biomeccanica delle fibre elastiche</i>                | 36        |
| MALATTIE CORRELATE ALLE FIBRE ELASTICHE                  | 38        |
| <i>Sindrome di Marfan</i>                                | 38        |
| <b>STATO DELL'ARTE</b>                                   | <b>42</b> |
| FIBRE ELASTICHE ED ELASTASI                              | 43        |
| <b>OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>                            | <b>45</b> |
| <b>STUDI SPERIMENTALI</b>                                | <b>46</b> |
| STUDIO IN VITRO  | 46        |
| <i>Materiali e metodi</i>                                | 46        |
| <i>Risultati</i>   | 50        |
| STUDIO IN VIVO   | 55        |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <i>Materiali e metodi</i> | 55        |
| <i>Risultati</i>          | 57        |
| <b>DISCUSSIONE</b>        | <b>60</b> |
| <b>CONCLUSIONI</b>        | <b>62</b> |
| <b>REFERENZE</b>          | <b>64</b> |

## PREMESSA

---

Le fibre elastiche rappresentano una componente fondamentale dei tessuti connettivi del nostro organismo, conferendo loro proprietà di elasticità, resilienza e resistenza agli stimoli meccanici.

Questa tesi si propone di analizzare in dettaglio la loro funzione, partendo dal loro assemblaggio e organizzazione, esplorandone le proprietà biomeccaniche, fino al ruolo cruciale svolto nei vari organi e tessuti, concentrandosi primariamente sul tessuto osseo, oggetto principale dello studio.

A questo scopo, è stato approfondito il processo di accrescimento scheletrico negli individui in età di sviluppo, discutendone nel dettaglio i fattori che lo regolano, sia a livello sistemico che locale, così da poter comprendere il ruolo che le fibre elastiche, in quanto componenti del pericondrio-periostio, possano rivestire.

Proseguendo nella trattazione, sono state altresì esaminate le malattie e le sindromi genetiche la cui patogenesi può essere spiegata da un deficit o una disfunzione di queste fibre, tra cui in primis la Sindrome di Marfan, che vede nell'interessamento osseo una delle sue principali caratteristiche cliniche. Infatti, tipicamente, gli affetti mostrano un habitus caratterizzato da dolicomorfismo, facies verticalmente allungata, aracnodattilia e deformazioni dovute all'eccessiva crescita ossea.

Alla luce di ciò è stata condotta una revisione della letteratura scientifica degli ultimi anni al fine di raccogliere evidenze che potessero spiegare quanto osservato, ma, trattandosi di un argomento di nicchia, i risultati trovati non sono stati numerosi.

Si è pertanto deciso di continuare questo filone di ricerca allestendo uno studio sperimentale in due fasi, la prima in vitro e poi in vivo, su un nuovo modello animale, che, per la prima volta, è un mammifero.

È auspicabile quindi che i risultati ottenuti possano aiutare a chiarire questo panorama di studi, aprendo la strada a nuove prospettive di ricerca che possano poi condurre a nuove e innovative opportunità terapeutiche.

# INTRODUZIONE

---

Al fine di facilitare la comprensione dello scopo di questo studio sono di seguito riportate nozioni introduttive sull'accrescimento osseo, partendo dall'embriologia fino allo sviluppo dell'individuo. In particolare, saranno descritti il complesso epifiso-metafisario, cardine di questo processo, ed il ruolo svolto dalle fibre elastiche, su cui si incentra questo lavoro.

## EMBRIOLOGIA E SVILUPPO DELL'APPARATO MUSCOLO-SCHELETRICO

Dal punto di vista embriologico, l'apparato muscolo-scheletrico si sviluppa a partire dai somiti, organizzazioni metameriche che prendono origine dal foglietto mesodermico durante la terza settimana di vita intrauterina. In essi è riconoscibile una porzione dorso-laterale, il dermomiotomo, da cui generano derma e muscoli, e una porzione ventro-mediale, lo sclerotomo, da cui si differenziano le cellule mesenchimali che formeranno le popolazioni cellulari di fibroblasti, condroblasti e osteoblasti (O'Rahilly et al., 1956).

Le cellule mesenchimali, infatti, hanno l'intrinseca capacità di formare tessuto osseo. Questo avviene, per la maggior parte delle ossa, tramite un processo definito ossificazione endocondrale, o indiretta, che prevede dapprima la formazione di un abbozzo di cartilagine ialina che verrà poi sostituita da tessuto osseo. Ossa piatte della volta cranica, clavicole e ossa mascellari costituiscono un'eccezione a questo processo: nella loro embriogenesi il mesenchima si differenzia, tramite ossificazione membranosa (O'Rahilly et al., 1956), direttamente in osteoblasti, che depositeranno tessuto osseo.

Lo scheletro appendicolare, invece, inizia a svilupparsi più tardivamente a partire dalla quinta settimana, quando compaiono gli abbozzi degli arti superiori, che precedono e si sviluppano più precocemente rispetto agli arti inferiori.

Inizialmente gli abbozzi sono costituiti da un asse mesenchimale, derivante dal mesoderma somatico laterale, ricoperto da uno strato di ectoderma che va ad ispessirsi all'apice dell'abbozzo stesso, formando la cresta apicale ectodermica. Quest'ultima ha un ruolo fondamentale nell'induzione sulle cellule mesenchimali sottostanti, che così si aumentano in numero e si differenziano prima in condroblasti, poi in condrociti che, dalla sesta settimana di sviluppo, costituiscono l'intero abbozzo cartilagineo dello scheletro (Streeter, 1949).

Proseguendo nell'ontogenesi, nello scheletro cartilagineo delle ossa lunghe inizia una differenziazione tra la parte più interna, in cui alcuni condrociti cominciano a diventare ipertrofici e la matrice circostante inizia a calcificarsi, e la parte più periferica, che va incontro ad ossificazione membranosa formando un manicotto periostale che va ad avvolgere l'abbozzo cartilagineo stesso.

Alla fine dell'ottava settimana, quando l'embrione entra nella fase fetale, iniziano a comparire delle gemme vascolari nella parte centrale dello scheletro cartilagineo (Gardner, 1956). Queste, approfondendosi nello scheletro, trascinano con esse cellule mesenchimali da cui originano osteoblasti, responsabili della produzione e deposizione di matrice osteoide, ed osteoclasti, che invece riassorbono le trabecole ossee neoformate. Questi ultimi agiscono in misura più importante nella regione assiale diafisaria, in cui si formerà una cavità cilindrica che andrà a costituire il canale midollare.

Dalla coordinata azione di osteoblasti e osteoclasti prende origine così il centro di ossificazione primario, collocato al centro della diafisi.

L'accrescimento longitudinale dell'osso continuerà quindi fino alla nascita, tramite il reclutamento di nuove cellule provenienti dal polo metafisario del complesso di accrescimento, le quali tramite ossificazione endocondrale si trasformeranno in osteoblasti, osteoclasti e osteociti, costituendo tessuto osseo neoformato.

Alla nascita dell'individuo l'ossificazione della diafisi sarà quindi completa, mentre le due estremità epifisarie si presentano ancora come un abbozzo cartilagineo.

La loro ossificazione avverrà mediante lo stesso meccanismo descritto sopra per la diafisi, con la formazione del nucleo di ossificazione secondario. La continua e progressiva deposizione di tessuto osseo porterà quindi allo stato definitivo di osteo-epifisi.

Tuttavia, tra epifisi e metafisi permane uno strato di cartilagine, denominata di accrescimento o di coniugazione, che rimarrà fino al termine della pubertà, quando termina il processo di sviluppo. La chiusura delle epifisi rappresenta infatti l'ultimo evento dell'accrescimento osseo.

## COMPLESSO DI ACCRESCIMENTO EPIFISO-METAFISARIO

L'accrescimento osseo dell'individuo in età puberale vede come elemento fondamentale il complesso di accrescimento epifiso-metafisario. Questo è rappresentato dall'interfaccia osteo-cartilaginea presente tra epifisi e metafisi delle ossa lunghe, che scomparirà al termine dello sviluppo in conseguenza dell'espandersi dell'osso spugnoso neoformato a livello epifisario verso la diafisi.

Le componenti principali che lo costituiscono sono rappresentate da:

- nucleo di ossificazione epifisario
- cartilagine epifisaria
- cartilagine di coniugazione
- osso metafisario
- strutture periferiche, come pericondrio epifisario, periostio, gola di Ranvier, anello fibroso e osseo di Lacroix

Queste strutture sono formate da tre tipi di tessuti: cartilagineo, osseo e fibroso.

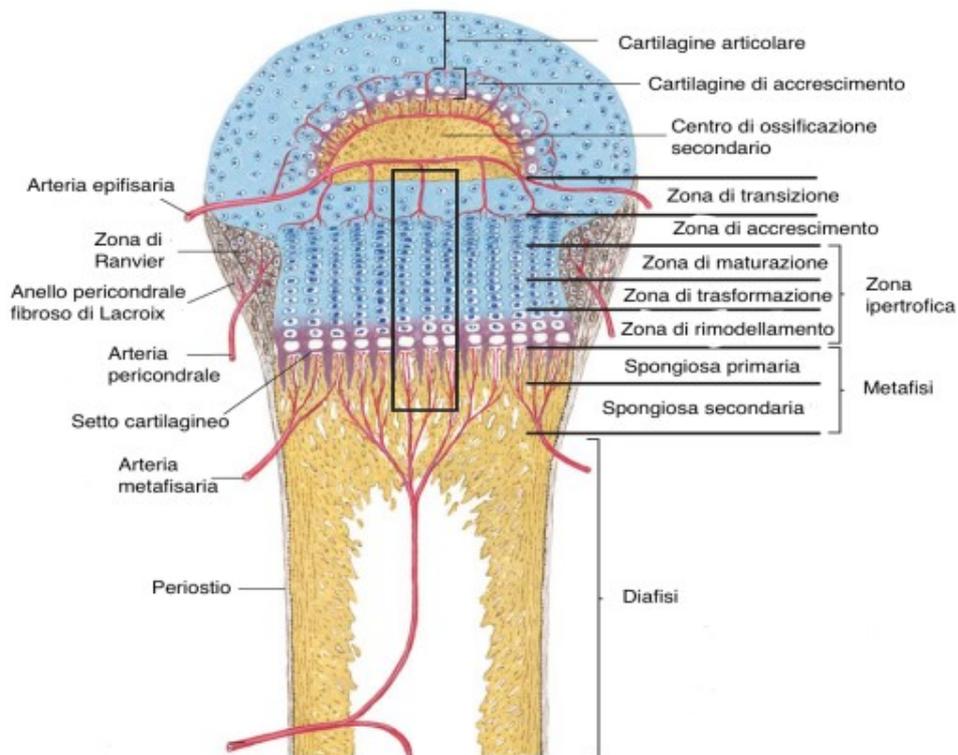


Figura 1. Struttura e apporto di sangue della piastra di crescita. È possibile osservare con maggiore chiarezza la disposizione di cellule e fibre nel complesso di accrescimento epifiso-metafisario  
Immagine tratta da: Larry R Cochard, PhD. (n.d.). *Netter's Atlas of human Embryology*. 18 Jun 2012  
(Larry R Cochard, PhD, n.d.)

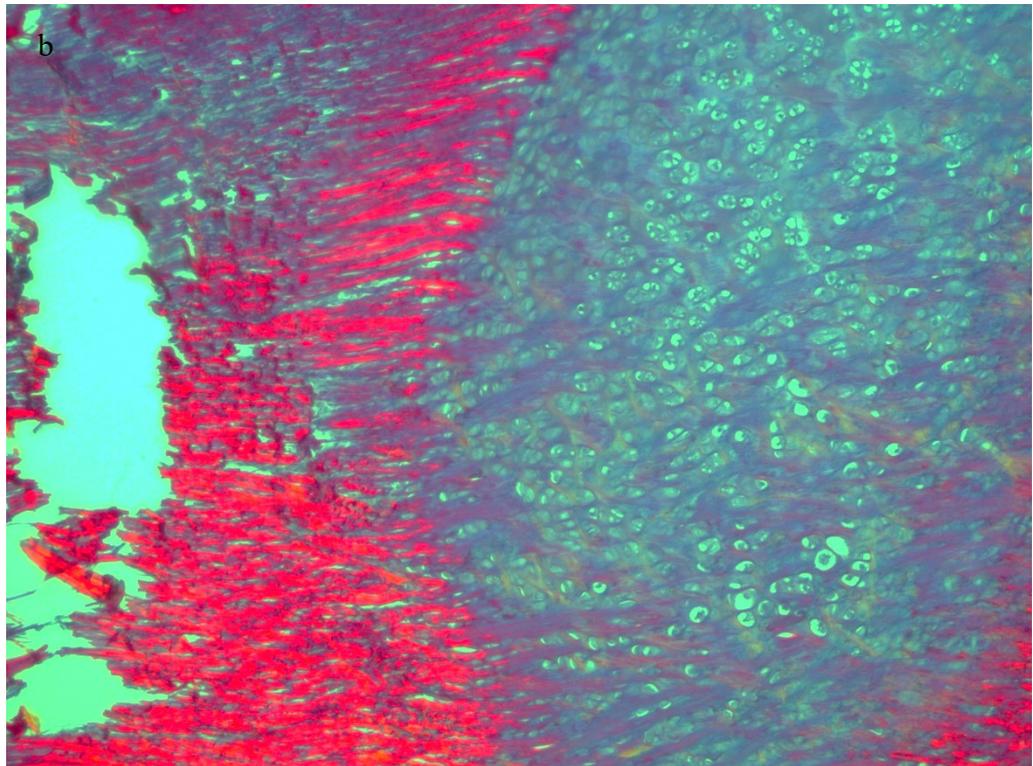
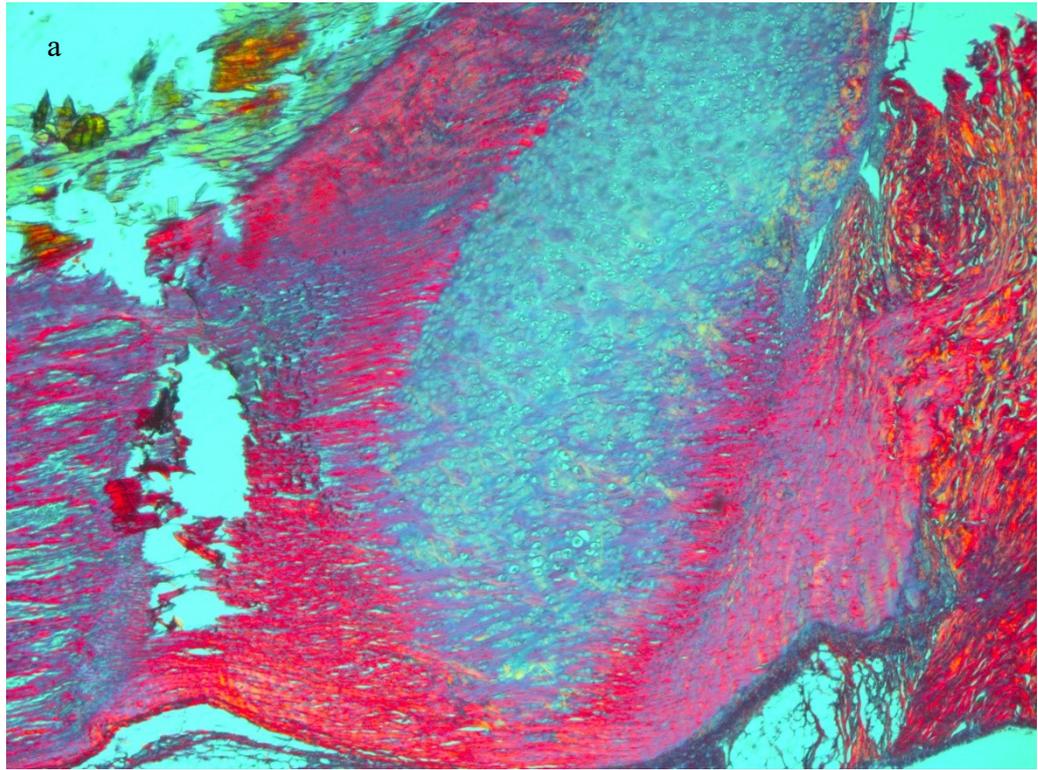


Figure 2-3. Nucleo di ossificazione secondario. Colorazione sirius red, ingrandimento 5x (a) e 10x (b)

## ***Componente cartilaginea***

Il nucleo di ossificazione secondario, posto al centro dell'epifisi in formazione, è circondato da tessuto cartilagineo, all'interno del quale è possibile distinguere:

- a. Cartilagine articolare
- b. Cartilagine epifisaria
- c. Cartilagine di coniugazione

### **Cartilagine articolare**

La cartilagine articolare rappresenta la porzione più superficiale del tessuto cartilagineo circostante il nucleo di accrescimento. Essa è rivolta verso la cavità articolare e, contrariamente alle restanti componenti cartilaginee, non verrà sostituita da tessuto osseo, rimanendo tale anche nella vita adulta. La sua funzione è infatti quella di agevolare lo scorrimento meccanico tra le interfacce epifisarie di ossa coinvolte in un'articolazione.

All'analisi istochimica, tramite particolari colorazioni come Alcian blu e PAS, si distingue dalla sottostante cartilagine epifisaria in quanto la matrice che le compone presenta diverse affinità tintoriali; anche i rispettivi condrociti variano progressivamente in forma e disposizione nel passaggio tra l'una e l'altra. Infatti, a livello della cartilagine articolare si presentano allungati e disposti con l'asse longitudinale parallelo alla superficie, contrariamente ai condrociti rotondeggianti della cartilagine epifisaria.

### **Cartilagine epifisaria**

La cartilagine epifisaria è posta subito al di sopra del nucleo di accrescimento secondario, più profondamente rispetto alla cartilagine articolare, e lo avvolge completamente continuandosi inferiormente con la cartilagine di coniugazione. Contrariamente alla cartilagine articolare, al termine dello sviluppo sarà completamente sostituita da tessuto osseo mediante ossificazione endondrale.

All'analisi istochimica con Alcian blu e PAS è possibile osservare a questo livello un'organizzazione regolare costituita da condrociti rotondeggianti. In prossimità del fronte di ossificazione questi vanno a organizzarsi in nidi composti da dieci-quindici cellule che gradualmente maturano, si ipertrofizzano e degenerano. A separare tali nidi tra loro sono presenti tralci di matrice che progressivamente si mineralizza, costituendo l'impalcatura su cui gli osteoblasti vanno a deporre matrice ossea, formando trabecole ad andamento parallelo e obliquo rispetto al fronte di ossificazione.

A livello della placca terminale, la cartilagine epifisaria ossifica diversamente: l'osso sembra infatti formarsi direttamente dalla cartilagine, i condrociti non vanno incontro a ipertrofia e maturazione, e la matrice cartilaginea non viene degradata. All'analisi istochimica questa trasformazione è spesso preceduta dalla perdita dell'alcianofilia, mentre risulta conservata la positività al PAS; è inoltre frequente riscontrare la presenza di cellule con caratteristiche intermedie tra condrociti e osteociti, poste tra matrice ossea e cartilaginea.

### **Cartilagine di coniugazione**

La cartilagine di coniugazione rappresenta la porzione responsabile dell'accrescimento in lunghezza degli arti (Brighton, 1978). È un disco trasversale posto tra epifisi e diafisi, caudalmente al nucleo di accrescimento secondario, e durante la vita fetale si modifica, passando da una superficie piana e regolare ad una presentante solchi e avvallamenti, col fine di aumentarne l'estensione e la resistenza agli stimoli meccanici (Cohen et al., 1992).

Può essere divisa in tre zone:

*Zona di riserva*, collocata subito al di sotto del centro di ossificazione, si caratterizza per le sue cellule rotondeggianti circondate da un'abbondante matrice di proteoglicani e collagene di tipo II organizzato in fibre che non presentano un andamento preferenziale. È la zona in cui è possibile trovare una maggiore quantità di questo collagene.

Le cellule che la compongono sono ricche di lipidi e glicogeno e proliferano sporadicamente, è infatti una zona relativamente inattiva, con una bassa  $pO_2$  e una scarsa incorporazione di zolfo radioattivo. Non è ancora ben chiarito il suo ruolo, ma si ipotizza che possa avere la funzione di reservoir cellulare (Brighton et al., 1973).

*Zona proliferativa*, caratterizzata da colonne di cellule appiattite estese longitudinalmente, immerse in una matrice contenente fibre di collagene di tipo II, anch'esse disposte in senso longitudinale.

La distribuzione delle cellule non è casuale, infatti all'apice di ogni colonna è localizzata la cellula progenitrice, che andando incontro a numerose divisioni cellulari, forma questa disposizione colonnare.

La quantità di cellule in divisione è influenzata da fenomeni geneticamente determinati, oltre fattori meccanici e ormonali (Greco et al., 1989; van Kampen et al., 1985).

È una zona a intensa attività aerobia, dimostrata dall'alto livello di  $pO_2$  e di glicogeno, è pertanto una zona metabolicamente molto attiva (Brighton et al., 1973); infatti la sua funzione è quella di divisione cellulare e produzione di sostanza fondamentale, col fine di accrescere longitudinalmente l'osso proporzionalmente alla cinetica di divisione cellulare (Brighton, 1978).

*Zona ipertrofica*, così denominata in quanto presenta un elevato volume cellulare e un ridotto accumulo di glicogeno (Brighton et al., 1973), con una cellularità molto più elevata rispetto alle zone precedenti.

Le fibre collagene presenti nella matrice sono principalmente composte da collagene X e, in minore parte, da collagene II; è inoltre presente una quota di proteoglicani disaggregati che, insieme al collagene X, sembrano avere un ruolo nella mineralizzazione della matrice, in quanto inibiscono la formazione di cristalli di fosfato di calcio.

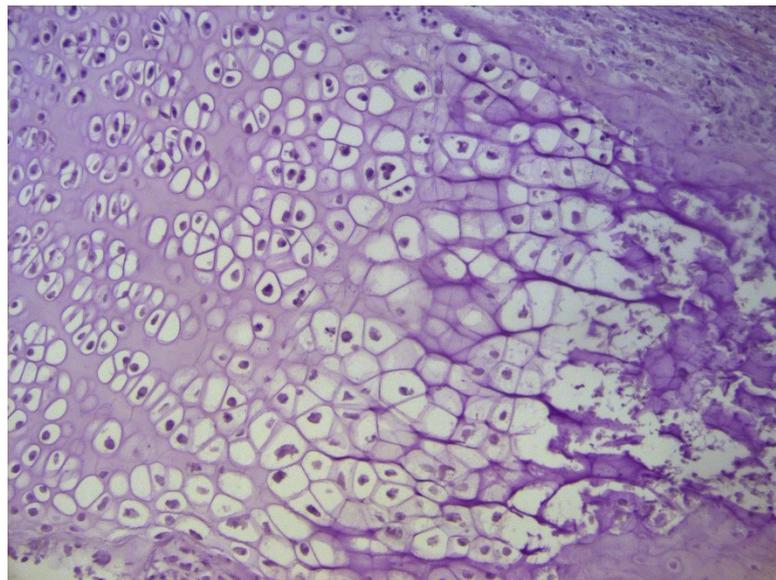
Il metabolismo cellulare in questa zona è prevalentemente anaerobio, con produzione di acido lattico e conseguente abbassamento del pH, che sarà responsabile di una progressiva riduzione delle disponibilità energetiche negli strati più profondi. La scarsità di risorse energetiche favorisce un accumulo di calcio intracitoplasmatico, che viene poi liberato in ambiente extracellulare, dando inizio al processo di calcificazione

Il meccanismo che porta alla calcificazione non è ancora stato ben chiarito, infatti sono state proposte due teorie. La prima prevede che i condrociti dello strato inferiore, aventi metabolismo anaerobio, rilascino calcio, che va ad occupare gli interstizi dei proteoglicani, portandoli ad aggregarsi in rosette e formando così le vescicole della matrice (Ali, 1976). Queste contengono fosfatasi alcalina, che va ad idrolizzare il pirofosfato, interrompendo la sua inibizione sulla mineralizzazione (Fleish & Neuman, 1961). Si formano così cristalli di idrossiapatite che si incasellano tra le fibrille collagene, invadendo la struttura in modo progressivo.

La seconda teoria invece prevede che il calcio non venga accumulato in vescicole, ma sia invece cosparso negli interstizi tra le fibrille collagene, formando così cristalli di calcio che avvolgono le fibrille riempiendo gli spazi tra esse (Glimcher, 1987).

In ogni caso, a prescindere da come avvenga, la mineralizzazione va ad aumentare lo stato di ipossia, mantenendo il metabolismo anaerobio e aumentando così il processo di calcificazione.

La matrice neoformata viene poi invasa dai vasi provenienti dalla metafisi, e le cellule mesenchimali vanno a riempire gli spazi liberi intercellulari (Robertson, 1990), come visto nella formazione dei nuclei di accrescimento primario e secondario.



*Figura 4. Cartilagine di coniugazione. Ingrandimento 20x*

## *Componente ossea*

La componente ossea del complesso di accrescimento epifiso-metafisario è rappresentata dall'osso metafisario, che per definizione può essere individuato nel tessuto osseo posto distalmente all'ultimo setto trasverso delle colonne condrocitarie dello strato cartilagineo ipertrofico.

L'ultimo setto trasverso ancora cartilagineo verrà infatti degradato dagli enzimi lisosomiali, lasciando lacune che saranno riempite da cellule endoteliali e perivascolari, e in cui gli osteoblasti andranno a produrre cartilagine calcificata, formando la cosiddetta spongiosa primaria.

Solo successivamente, mediante un processo di ossificazione encondrale, l'impalcatura cartilaginea verrà sostituita da tessuto osseo propriamente detto ad opera degli osteoblasti, dando origine alla spongiosa secondaria (Brighton et al., 1973).

L'azione sincrona di osteoblasti e osteoclasti produrrà poi un rimodellamento responsabile della sostituzione dell'iniziale osso fibroso e degli strati cartilaginei con osso lamellare; questo processo avviene in misura maggiore nelle regioni periferiche e subperiostali della metafisi, riducendone il diametro trasverso e consentendo così la fusione tra osso metafisario e diafisario.

L'angiogenesi nel neoformato osso metafisario non è ancora stata chiarita nei dettagli, ma una condizione chiave sembrerebbe essere la mineralizzazione della matrice cartilaginea, anche se si ritiene che la cartilagine rilasci un fattore di crescita endoteliale che poi andrebbe ad indurre i fenomeni di invasione vascolare sul fronte metafisario (Klagsbrun & Smith, 1980).

## ***Componente fibrosa***

La componente fibrosa è rappresentata da tutto ciò che circonda la componente osteo-cartilaginea, è possibile infatti individuare diverse strutture, tra cui:

- a. Strato pericondrio-periostale
- b. Anelli fibroso e osseo pericondrale di Lacroix
- c. Gola di Ranvier

Tra le costituenti fondamentali di queste strutture è doveroso ricordare il ruolo svolto dalle fibre elastiche e dalle fibre collagene.

### **Gola di Ranvier**

La Gola di Ranvier è una struttura costituita da cellule immerse in una matrice racchiusa tra l'anello fibroso esterno, sito subito al di sotto del pericondrio-periostio, e l'anello osseo interno di Lacroix, posto a diretto contatto con i condrociti e la zona di ossificazione.

Segna convenzionalmente il confine esterno tra epifisi e metafisi.

Venne descritta inizialmente da L. Ranvier, da cui prende il nome (Ranvier, 1873), come formata da più strati, in cui si distinguono:

*Zona interna*, denominata “densely packed cells”(Shapiro et al., 1977), in quanto costituita da cellule fittamente stipate che, secondo alcuni autori, potrebbero essere le cellule progenitrici degli osteoblasti che in seguito andranno a formare l'anello osseo pericondrale.

*Zona intermedia*, chiamata “less densely packed cells” (Shapiro et al., 1977) presenta cellule di natura mesenchimale relativamente indifferenziate, che potrebbero rappresentare i precursori dei condroblasti; sarebbero quindi responsabili dell'accrescimento in larghezza dell'epifisi tramite un processo condrogenetico apposizionale. Intercalate tra queste cellule si osservano numerose fibre elastiche (Gigante et al., 1996).

*Zona esterna*, costituita da fibroblasti e fibrociti immersi in una matrice di fasci collagene, che vanno a formare un involucro fibroso esterno che si continua superiormente ed inferiormente con il pericondrio-periostio (Shapiro et al., 1977) Da questo involucro originano inoltre fibre che raggiungono la cartilagine epifisaria e vanno ad ancorare il periostio durante l'accrescimento.

Questa struttura è presente in tutte le ossa in cui avviene l'ossificazione encondrale, tranne poche eccezioni, e varia in profondità a seconda del tipo di osso e dello sviluppo scheletrico, diventando sempre meno profonda con l'avanzare dell'età (Shapiro et al., 1977).

Più recentemente, nella parte apicale della gola di Ranvier, sono state rilevate cellule con caratteristiche e morfologia di cellule staminali mesenchimali, fenotipicamente distinte rispetto alle cellule circostanti, suggerendo che la gola contenga una vera e propria nicchia di cellule staminali (Karlsson et al., 2009).

Queste cellule esprimono inoltre il recettore di crescita dei fibroblasti FGFR-3 e sembrano essere responsabili della crescita ossea (Robinson et al., 1999), confermando passate evidenze secondo cui, andando a rimuovere la gola di Ranvier, la crescita longitudinale ossea ne risultava significativamente compromessa (Rodríguez et al., 1985).

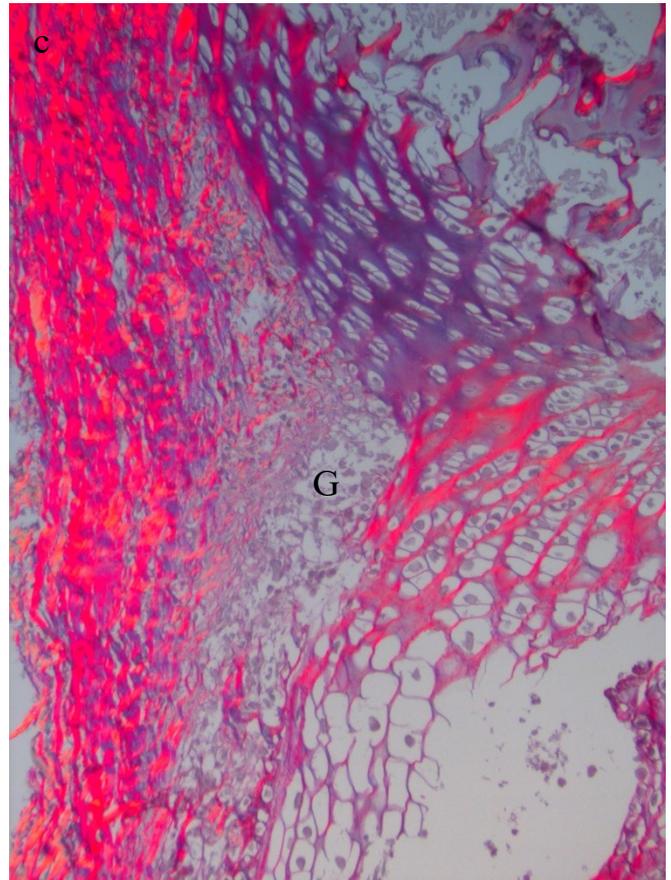
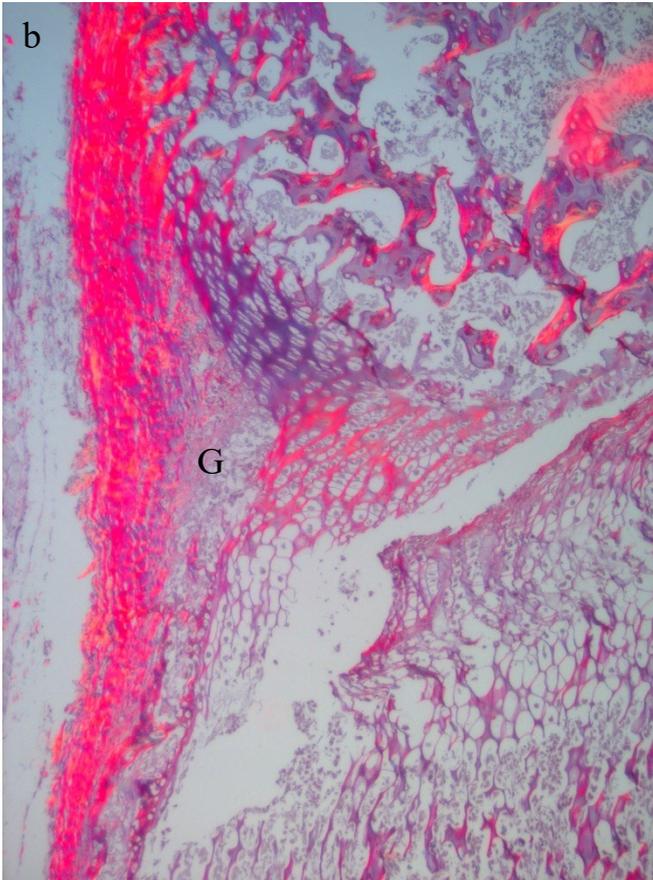
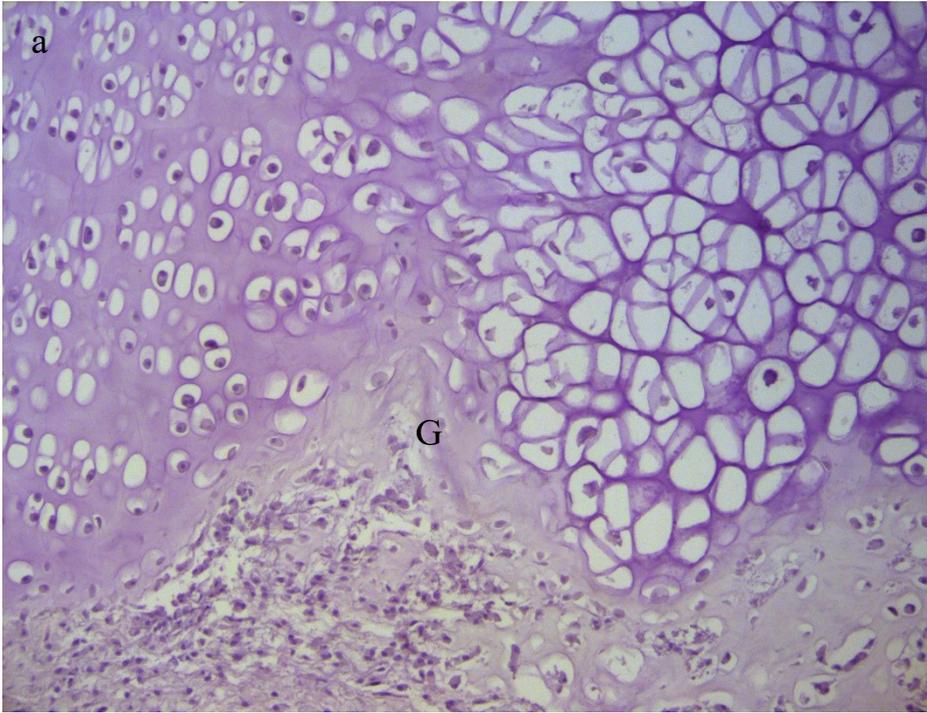


Figure 5-7. Gola di Ranvier (G). Colorazione sirius red (b, c), ingrandimento 20x (a, c) 10x (b)

## **Anelli fibroso e osseo pericondrale di Lacroix**

Gli anelli fibroso e osseo pericondrale sono due strutture descritte inizialmente da Lacroix e riprese successivamente da Shapiro (Lacroix, 1951; Shapiro et al., 1977); essi circondano e delimitano la gola di Ranvier.

- a. *Anello fibroso pericondrale di Lacroix*, si continua profondamente con l'involucro fibroso formato dai fasci collagene della zona esterna della Gola, e superficialmente con il pericondrio-periostio che avvolge il complesso di accrescimento epifiso-metafisario
- b. *Anello osseo pericondrale di Lacroix*, è collocato internamente alla Gola, a contatto con la cartilagine ipertrofica e l'osso metafisario neoformato; funge infatti da sostegno esterno per la cartilagine di accrescimento e, tramite un processo di riassorbimento osteoclastico della sua superficie interna, partecipa al rimodellamento dell'osso metafisario.

## **Fibre collagene**

Le fibre collagene rappresentano una componente fondamentale dei tessuti connettivi del nostro organismo.

L'unità elementare della fibra collagene è il tropocollagene, la cui struttura, dopo numerosi studi, è stata definita come una superelica ad andamento destrorso, formata a sua volta dall'avvolgimento reciproco di tre catene polipeptidiche ad elica sinistrorsa (Astbury & Bell, 1940; Cowan et al., 1955; Pauling & Corey, 1951; Ramachandran & Kartha, 1954, 1955; Rich & Crick, 1955, 1961).

Ogni catena di tropocollagene conta circa mille residui amminoacidici, con una struttura primaria rappresentata dalla sequenza Gly-X-Y che si ripete per n volte; solitamente come Glicina-Prolina-X e Glicina-X-Idrossiprolina, dove X può rappresentare qualsiasi amminoacido.

Le molecole di tropocollagene hanno la capacità di associarsi spontaneamente, andando a disporsi sfalsate tra di loro di circa  $\frac{1}{4}$  della propria lunghezza, formando così una fibrilla collagene. Le fibrille possono disporsi a loro volta in fasci, così da formare le fibre, che a loro volta possono associarsi in fasci di fibre.

I diversi residui amminoacidici che vanno a costituire le molecole di tropocollagene hanno un significato fondamentale, in quanto permettono diversi tipi di organizzazione delle eliche, che corrisponderanno a diversi tipi di collagene.

A livello del tessuto osseo, il collagene che rappresenta la componente preponderante è quello di tipo I, anche se, soprattutto in fase di accrescimento, sono stati descritti al suo interno anche i tipo III e VI (Keene et al., 1991).

Più precisamente, a livello del complesso di accrescimento, sono stati individuati sette principali gruppi di fibre collagene (Shapiro et al., 1977; Speer, 1982):

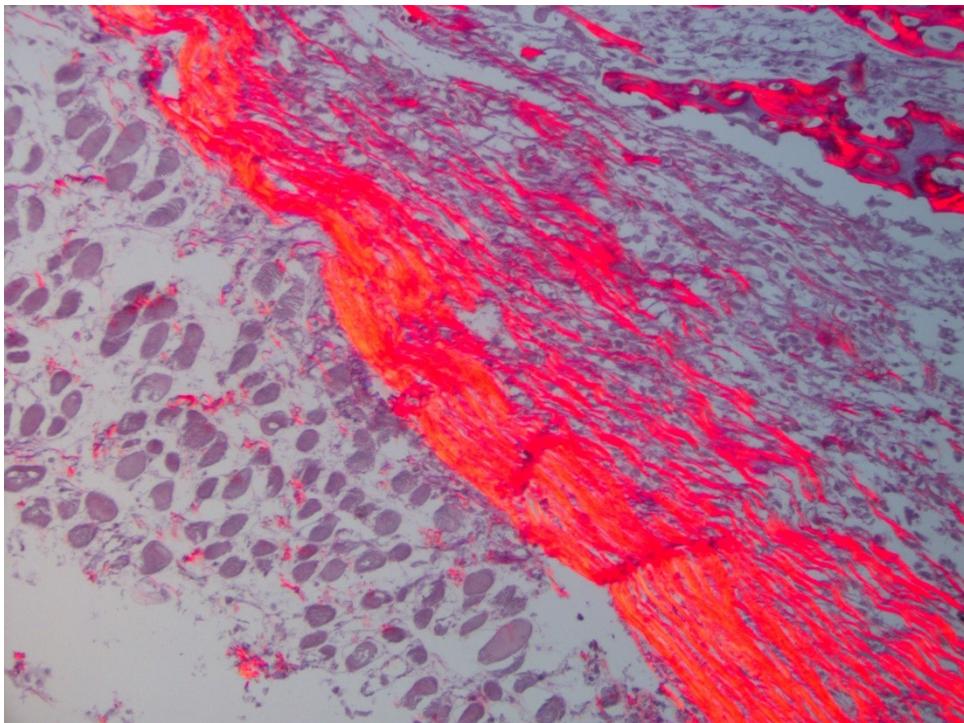
- a) Fibre transfisiali (longitudinali) dello strato proliferativo
- b) Fibre epifisarie (radiali o trasverse)
- c) Fibre transfisiali (longitudinali) dello strato ipertrofico
- d) Fibre dell'osso metafisario (circonferenziali e oblique)
- e) Fibre della gola di Ranvier (longitudinali e circonferenziali)
- f) Fibre della ghiera ossea pericondrale di Lacroix (circonferenziali)

Le fibre transfisiali dello strato proliferativo vanno a continuarsi con quelle dello strato ipertrofico, andando così dai margini della cartilagine calcificata fino alla cartilagine epifisaria e al centro di ossificazione secondario, in cui si embricano con le fibre epifisarie ad andamento radiale.

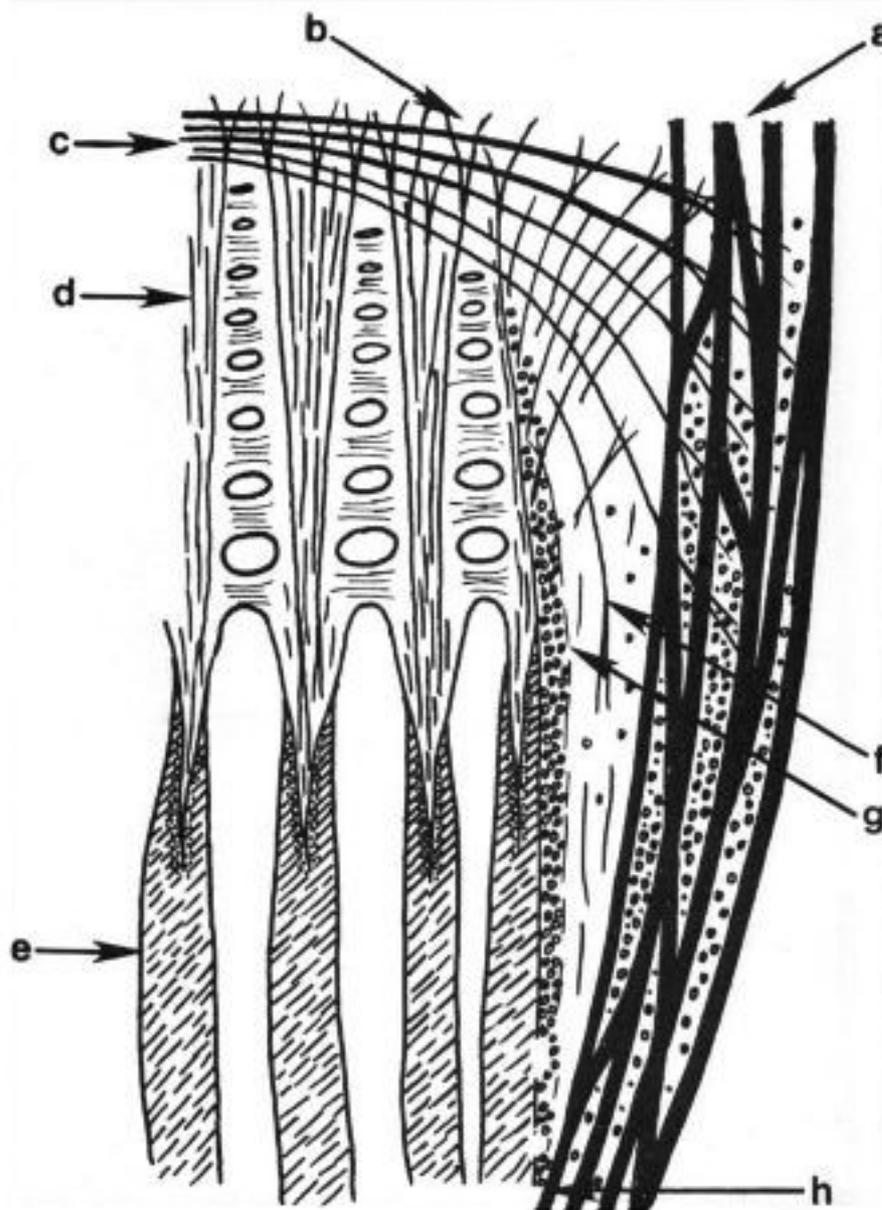
Nel pericondrio-periostio predominano fibre ad andamento longitudinale; qui sono presenti anche fibre ad andamento circonferenziale, soprattutto nella parte che avvolge la gola di Ranvier e nella gola stessa.

Nella spongiosa primaria, invece, prevalgono fibre orientate in senso obliquo e circonferenziale rispetto ai setti di cartilagine calcificata (Shapiro et al., 1977; Speer, 1982).

La presenza di queste fibre, il loro orientamento, le loro proprietà tensili, e quindi la loro architettura, avranno una funzione fondamentale nel determinare le proprietà biomeccaniche del complesso di accrescimento.



*Figura 8. Fibre collagene. Colorazione sirius red, ingrandimento 40x*



*Figura 9.* Illustrazione di una sezione longitudinale dell'estremità epifisaria di un osso in crescita. I gruppi di fibre collagene e le loro relazioni sono designati come segue.

- a,** Gruppo di fibre pericondrali e periostali (longitudinale).
- b,** Fibre transverse (longitudinali) al centro di ossificazione secondario dopo aver attraversato la regione delle fibre epifisarie radiali e la cartilagine di accrescimento.
- c,** Gruppo di fibre epifisarie (radiali o trasversali) tra la cartilagine di accrescimento e il centro di ossificazione secondario.
- d,** gruppo di fibre transverse (longitudinali) che si estende dall'epifisi alla metafisi nei setti cartilaginei longitudinali tra le colonne di condrociti della cartilagine di accrescimento.
- e,** gruppo di fibre ossee metafisarie (circonferenziali o oblique) formate sui setti cartilaginei longitudinali residui.
- f,** area cellulare del solco di ossificazione pericondrale, con poche fibre longitudinali e circonferenziali.
- g,** gruppo di fibre dell'anello osseo pericondrale (circonferenziale).
- h,** intersezione del pericondrio-periostio e dell'anello osseo pericondrale, che termina il solco pericondrale.

*Immagine tratta da: Speer, D. P. (1982). Collagenous architecture of the growth plate and perichondrial ossification groove. The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 64(3), 399-407.*

## **Fibre elastiche**

Filogeneticamente parlando, le fibre elastiche sono la componente più antica tra quelle che vanno a costituire il tessuto connettivo, conferendo ad esso proprietà elastomeriche (ROSS, 1973).

Ad oggi, si tende a considerarle come un sistema propriamente detto, in quanto risultano costituite da due componenti: elastine e microfibrille. In particolare, una fibra è formata da un cilindro solido di elastina amorfa ed omogenea, situato centralmente, circondato da microfibrille tubulari (Montes, 1996). Ulteriori analisi a livello ultrastrutturale hanno dimostrato che il nucleo centrale, in realtà, non risulta amorfo, ma è invece costituito da filamenti sottili ordinati e impaccati lateralmente (Pasquali-Ronchetti & Baccarani-Contri, 1997).

Ad ogni modo, si ritiene che sia l'elastina a determinare le proprietà elastomeriche del tessuto, mentre le microfibrille conferiscano proprietà di resistenza se sottoposte a stimoli meccanici, in quanto non posseggono proprietà elongative (Cotta-Pereira & Iruela-Arispe, 1989).

A seconda di come le due componenti si associno tra di loro, è possibile distinguere tre tipi diversi di fibre:

- a. Fibre elastiche propriamente dette, o fibre mature
- b. Fibre di elaunina
- c. Fibre oxytalan (dal greco οξύσ acido e ταλαν resistente)

Questi possono essere identificati e distinti tra loro tramite tecniche istochimiche, immunoistochimiche e ultrastrutturali.

Le *fibre mature* si colorano con la fucsina resorcinolo di Weigert e l'aldeide fucsica di Gomori, in microscopia elettronica appaiono composte da un core di elastina circondato da una componente fibrillare di 10-12 nm di diametro (Ghadially & More, 1989).

Le *fibre di elaunina* si colorano anch'esse con fucsina resorcinolo di Weigert e l'aldeide fucsica di Gomori, ma non con l'ematossilina ferrica di Verhoeff (Ghadially & More, 1989), all'analisi ultrastrutturale si osservano fasci di fibrille che attraversano discontinui aggregati di elastina (Ghadially & More, 1989).

Le *fibre oxytalan* si evidenziano, dopo ossidazione, con la colorazione di Fullmer e Lillie (Fullmer & Lillie, 1958), al microscopio elettronico sono costituite soltanto da fasci di fibrille, manca infatti il core centrale di elastina (Ghadially & More, 1989).

Questi tipi di fibre, in realtà, rappresentano diversi stadi evolutivi e maturativi della formazione delle fibre elastiche. Inizialmente, infatti, vengono prodotte le fibrille e poi l'elastina viene depositata tra queste, si passa quindi dalle fibre oxytalan a quelle di elaunina, e infine alle fibre elastiche mature (Pasquali-Ronchetti et al., 1995).

Il sistema delle fibre elastiche riveste un ruolo fondamentale in diversi tessuti, come i vasi sanguigni, in cui predominano le fibre elastiche mature, e periodonto (Fullmer & Lillie, 1958), giunzione dermo-epidermica e la zonula ciliare (Cotta-Pereira & Iruela-Arispe, 1989), in cui sono presenti le fibre oxytalan, a garantire maggior resistenza agli stress meccanici.

Successivamente, (Gigante et al., 1994, 1996), è stata dimostrata la presenza di questo sistema di fibre anche nella giunzione epifiso-metafisaria, più precisamente nel pericondrio epifisario, nella zona esterna delle fibre pericondrio-periostali, e nella zona intermedia della gola di Ranvier.

A questo livello, assumono un orientamento sia longitudinale che circonferenziale, a seconda della zona: nella zona esterna prevalgono fibre longitudinali, mentre nella zona intermedia della gola di Ranvier sono maggiormente presenti fibre circonferenziali.

È inoltre possibile osservare, anche qui, il gradiente maturativo delle fibre, in quanto le oxytalan abbondano nelle zone più interne e nelle prime fasi di sviluppo, mentre le fibre più mature si ritrovano nelle zone più esterne della gola di Ranvier e in soggetti in fasi di

sviluppo più avanzate; infatti, andando avanti con l'età non è la quantità delle fibre elastiche mature a cambiare, ma quella di fibre oxytalan e elaunina, che risultano più numerose nel periostio di individui più giovani e più rare in individui più adulti (Gigante et al., n.d.).

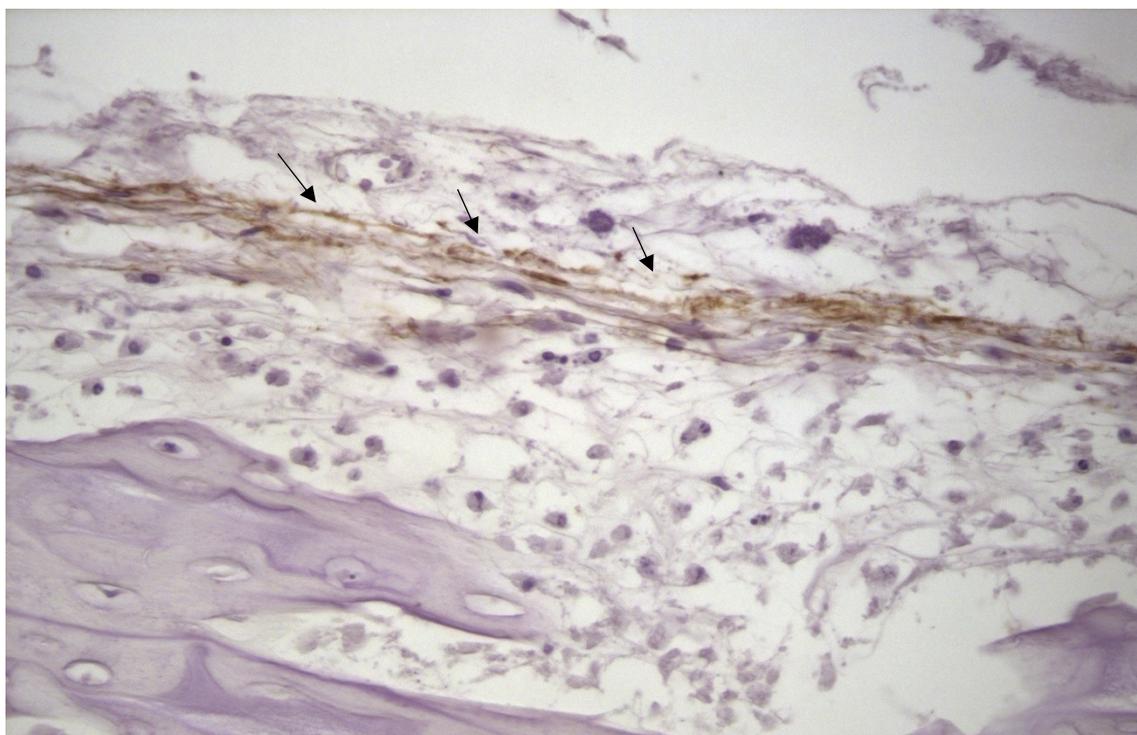
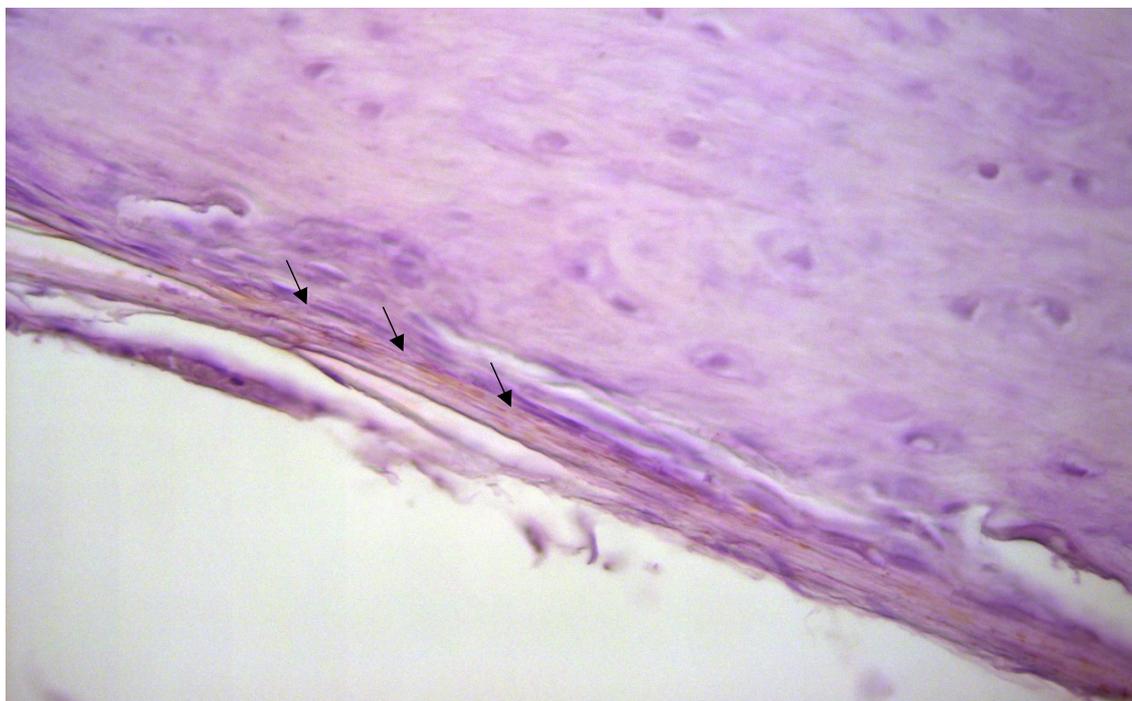
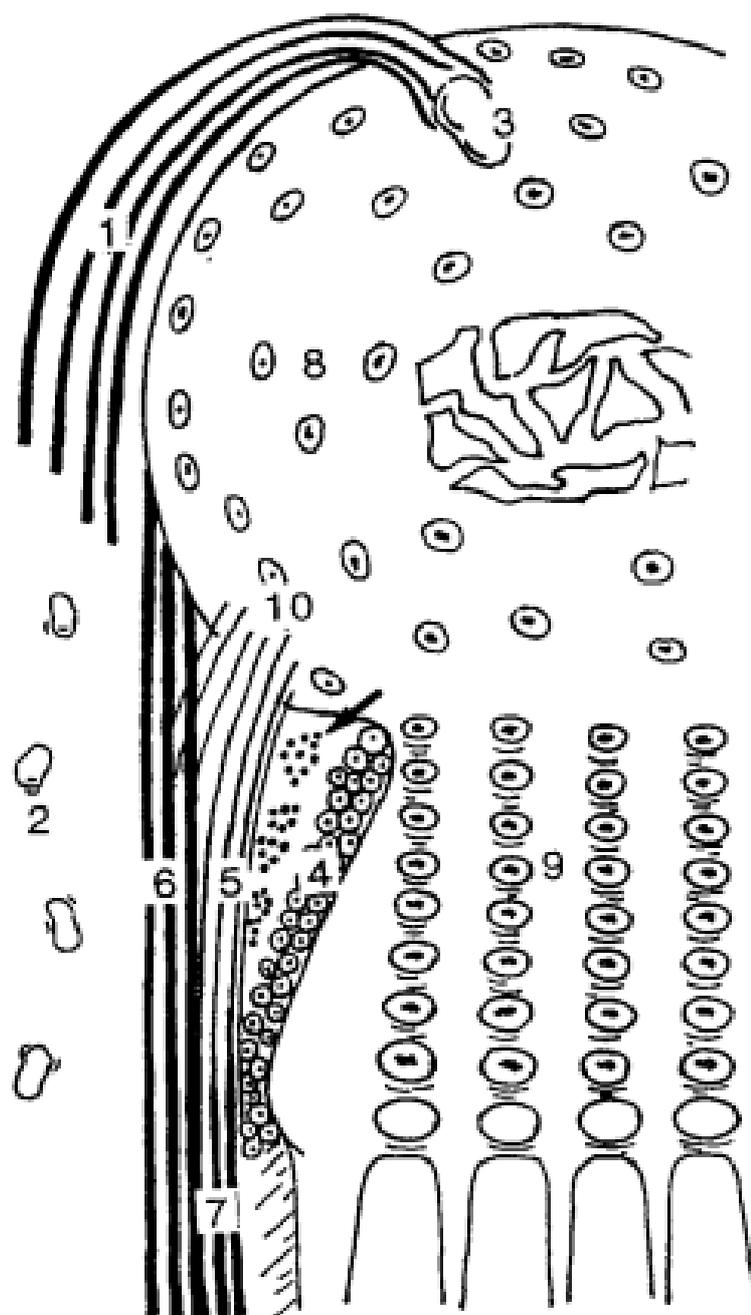


Figure 10-11. Fibre elastiche (freccie) nel periostio. Anticorpo anti-elastina, ingrandimento 40x



*Figura 12.* Illustrazione della localizzazione delle fibre elastiche nella regione epifiso-metafisaria in sezione longitudinale. Fibre elastiche a livello di: (1) pericondrio (prevalentemente fibre mature e longitudinali), (2) arteriole pericondrali, (3) vasi epifisari sottili, (4) zona interna della gola di Ranvier (fibre assenti), (5) zona intermedia della gola (fibre oxytalan e elaunina con orientamento longitudinale e circonferenziale [freccia]), (6) zona esterna della gola (fibre mature e longitudinali), (7) strato esterno dell'anello osseo pericondrale (fibre prevalentemente mature e longitudinali), (8) cartilagine epifisaria (fibre assenti) e (9) cartilagine di accrescimento (fibre assenti). Alcune fibre longitudinali di elaunina e oxytalan provenienti dalla zona centrale della gola (5) penetrano per un breve tratto nella cartilagine epifisaria (10).

*Immagine tratta da Gigante A, Specchia N, Nori S, Greco F. Distribution of elastic fiber types in the epiphyseal region. J Orthop Res. 1996 Sep;14(5):810-7. doi: 10.1002/jor.1100140519. PMID: 8893776.*

## CRESCITA E SVILUPPO

### *Accrescimento scheletrico*

L'accrescimento longitudinale dell'osso è permesso dalla presenza della cartilagine di coniugazione, ma su di esso agiscono diversi fattori, sia locali, come forze meccaniche, vascolarizzazione e strutture fibrose pericondrio-periostali, che sistemici, come fattori genetici e ormonali (Carvell, 1983; Cohen et al., 1992; Houghton & Dekel, 1979; Jenkins et al., 1975; Lutfi, 1974; Lynch & Taylor, 1987; McLain & Vig, 1983; Speer, 1982; Trueta & Morgan, 1960; Warrell & Taylor, 1979).

Per quanto riguarda l'accrescimento in larghezza, invece, non è stato ancora del tutto chiarito come questo avvenga. Alcuni autori affermano che questo avvenga per apposizione dal pericondrio, secondo altri invece potrebbe avvenire tramite un meccanismo interstiziale mediato da tre fattori, quali la spiccata attività proliferativa dello strato cellulare profondo e della zona marginale della cartilagine epifisaria, l'ipertrofia delle cellule cartilaginee epifisarie, e il graduale aumento della produzione di matrice.

### **Fattori sistemici**

*Ormone della crescita – Somatomedine.* Il GH, o ormone della crescita, è un ormone di natura polipeptidica prodotto dall'adenoipofisi. Esso riveste un ruolo fondamentale per l'accrescimento armonico dell'organismo, dal periodo post-natale fino al termine della pubertà.

La sua azione nell'organismo è vicariata da molecole chiamate somatomedine, tra cui l'IGF-I, la cui produzione è stimolata direttamente dall'azione dell'ormone sui recettori presenti a livello epatico.

Studi hanno dimostrato come i condrociti del complesso di accrescimento epifiso-metafisario presentino entrambi i recettori, sia per le somatomedine che per il GH (Nilsson et al., 1989; Trippel et al., 1986), anche se, in realtà, i due ormoni paiono agire

su popolazioni differenti, infatti, il GH sembra esercitare il suo effetto principalmente su cellule più mature (Lindahl et al., 1987).

Ad ogni modo, la loro azione si esplica sia aumentando la proliferazione condrocitaria, sia incrementando la quantità di matrice depositata (Trippel, 1995; Van Wyk et al., 1984)

*TGFβ*. Il fattore di crescita trasformante β, TGFβ, svolge il suo ruolo nell'embriogenesi di osso e cartilagine (Seyedin et al., 1986) tramite l'inibizione di alcune fasi dell'ossificazione encondrale, sia direttamente che attraverso l'incremento di PTHrP (Serra et al., 1999; Terkeltaub et al., 1998).

Il suo effetto sulla sintesi dei proteoglicani e sulla proliferazione cellulare varia sia in modo dose-dipendente (H et al., 1989; Hiraki et al., 1988; O'Keefe et al., 1988; Rosier et al., 1989), che in funzione dello stato di differenziazione dei condrociti, con una risposta più importante nelle cellule meno differenziate (Galéra et al., 1992; van Beuningen et al., 1993; van der Kraan et al., 1992).

Inoltre, i condrociti del complesso epifiso-metafisario presentano riserve di TGFβ complessato con la molecola LTBPII che lo mantiene in uno stato latente e probabilmente ne regola l'attivazione (Pedrozo et al., 1998).

Anche nell'osso adulto è possibile ritrovarlo in grandi quantità, e i suoi livelli aumentano nel callo di guarigione delle fratture, suggerendo un suo ruolo anche in questo processo (Sporn & Roberts, 1989).

*Bone Morphogenetic Protein*. Con il termine Bone Morphogenetic Protein, BMP, si intende una sostanza in grado di indurre lo sviluppo di tessuto cartilagineo e osseo in sede ectopica (Urist et al., n.d.).

Sette diverse molecole sono state identificate, da BMP-1 a BMP-7, queste, ad eccezione del BMP-1, rientrano all'interno della famiglia del TGFβ.

Durante il periodo embrionale svolgono un ruolo centrale nello sviluppo di cartilagine e osso, promuovendo la crescita radiale della cartilagine e contrastando la formazione delle

articolazioni; la loro azione si sviluppa soprattutto nella morfogenesi degli arti (Chang et al., 1994).

Esse inviano segnali differenziativi al mesenchima, indirizzandolo verso la linea condro-osteogenetica (Wozney et al., 1988); infatti, durante l'embriogenesi, sotto la spinta di queste molecole si ottiene la formazione di cartilagine ed osso a partire dalle cellule del manicotto perivascolare mesenchimale (Urist et al., 1984).

Anche nel periodo post-natale, le BMP risultano attive in contesti patologici, come ad esempio in caso di fratture dove aumenta l'espressione di BMP-2 e BMP-4 (Bostrom et al., 1995).

*Basic Fibroblast Growth Factor.* Il bFGF è un fattore di crescita sintetizzato da condrociti ed osteociti e immagazzinato nella matrice extracellulare (Bolander, 1992; Twal et al., 1994); esso induce la produzione di tessuto osseo in maniera dose dipendente, infatti, a dosi diverse va a stimolare o inibire i processi di sintesi e degradazione dei proteoglicani (Aspenberg et al., 1991; Aspenberg & Lohmander, 1989; Trippel, 1995). Sia in vitro che in vivo è stata inoltre dimostrata anche una capacità di induzione della neoangiogenesi (Eppley et al., 1988).

È stata dimostrata la sua presenza sia nel complesso di accrescimento che nelle fasi di riparative del callo di frattura (Bolander, 1992; Twal et al., 1994)

*Paratormone e Calcitonina.* Il paratormone ha un ruolo fondamentale nel normale sviluppo scheletrico fetale (Miao et al., 2002), ma anche nelle fasi successive di accrescimento esercita la sua azione stimolando la crescita ossea (Ogawa et al., 2002).

La sua somministrazione esogena induce sia una maggiore sintesi di proteoglicani e quindi un aumento del volume a livello epifiso-metafisario, che un aumento dell'attività enzimatica dei condrociti della zona ipertrofica (Havelka et al., 1979).

Per quanto riguarda la calcitonina non si hanno certezze sull'effettivo meccanismo d'azione, ma gli effetti sono sovrapponibili a quelli del PTH.

*Estrogeni.* L'effetto degli estrogeni è correlato all'età e al sesso dell'individuo. In generale la loro azione sulla crescita delle ossa lunghe è di tipo inibitorio, anche se il loro meccanismo d'azione sulle cellule del complesso di accrescimento non è ancora del tutto noto. La somministrazione esogena in dosi di estrogeni superiori alla norma determina una chiusura precoce della cartilagine di accrescimento (M. S. Silberberg & Silberberg, 1971).

*Testosterone.* Promuove la maturazione dei condrociti e l'ossificazione metafisaria; un suo eccesso causa ossificazione precoce, anche se non è ancora stato ben definito il suo meccanismo d'azione sulla cartilagine di accrescimento (M. Silberberg & Silberberg, 1956).

*Glucocorticoidi.* I glucocorticoidi hanno un'azione di rallentamento della crescita scheletrica (Friedman & Strang, 1966), andando ad inibire l'azione delle somatomedine sul complesso di accrescimento.

*Tirosina.* Agisce in sinergia con il GH, tuttavia un suo eccesso determina un difetto di crescita per un aumento del catabolismo proteico.

*Vitamina D e Metaboliti.* La cartilagine del complesso di accrescimento presenta entrambi i recettori intracellulari per i metaboliti della vitamina D, 24-25 diidrossicolecalciferolo e 1-25 diidrossicolecalciferolo, questi sono localizzato nella zona proliferativa e nello strato superiore della zona ipertrofica. La reazione tra ligando e recettore ha l'effetto di stimolazione della matrice tramite un meccanismo non ancora definito.

Il tessuto cartilagineo ha, inoltre, la capacità di convertire il 25 idrossi-D3 in 24-25 diidrossi-D3 (Garabedian et al., 1978).

## **Meccanismi locali**

*Sollecitazioni meccaniche.* Il carico è in grado di stimolare i processi di proliferazione cellulare e sintesi proteica del complesso epifiso-metafisario (J. C. Copray et al., 1983; J. C. V. M. Copray et al., 1985). Infatti, è stato dimostrato che, se si applicano compressioni intermittenti su condrociti in coltura, questi mostrano un aumento della proliferazione cellulare, produzione di matrice e aumento della deposizione di fosfati di calcio nella matrice stessa; lo stesso effetto si esplica, in misura minore, anche se sottoposti a pressioni continue (Greco et al., 1989; Klein-Nulend et al., 1986; van Kampen et al., 1985).

Anche nella cartilagine di accrescimento, quindi, lo stimolo meccanico rappresenta uno degli stimoli più importanti per il mantenimento della sua omeostasi; essa è infatti in grado di riconoscere la diversità dello stimolo e di adattare la propria cinetica metabolica in funzione di questo (Greco et al., 1989).

*Hedgehog protein - PTHrP.* Nei condrociti maturi e ipertrofici della cartilagine embrionale e neonatale è stata dimostrata la presenza dell'Indian Hedgehog Protein, Ihh (Iwasaki et al., 1997, 1999; Vortkamp et al., 1996), nelle fasi più avanzate di accrescimento la sua espressione si riduce progressivamente fino a scomparire, ma in seguito torna ad essere espressa in seguito ad un insulto traumatico (Iwasaki et al., 1999).

Questa proteina va a regolare la differenziazione condrocitaria nella cartilagine di accrescimento, mediante l'interazione con la proteina correlata al paratormone, PTHrP (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996). In particolare, l'Ihh è prodotto dai condrociti in fase ipertrofica, e attraverso i recettori Ptc, espressi dal pericondrio adiacente, aumenta l'espressione del PTHrP, che va ad agire sui condrociti pre-ipertrofici bloccando la maturazione di una quota di essi; in questo modo si va ad esercitare un feedback negativo sull'espressione di Ihh.

Nel modello murino, l'ablazione dei geni per la PTHrP o dei suoi recettori determina ossificazione precoce (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996); questa azione è però più difficile da realizzare su tessuti post-embryonali, suggerendo il coinvolgimento di altri

meccanismi nel processo (Farquharson et al., 2001; Grimsrud et al., 1999; Reppe et al., 2000; van der Eerden et al., 2000).

L'Ihh ha azione sul tessuto osseo anche tramite un meccanismo PTHrP-indipendente: sopprimendo l'espressione di Ihh, il PTHrP riesce comunque a prevenire l'ossificazione precoce, ma non ad impedire la brevità degli arti. Sembra quindi che la presenza di Ihh sia indispensabile per la proliferazione condrocitaria (Karp et al., 2000).

*Pericondrio-periostio.* È stato ipotizzato che anche le fibre pericondrio-periostali abbiano un ruolo nella modulazione dell'accrescimento (Kuijpers-Jagtman et al., 1988). In particolare, si pensa che queste fibre, messe in tensione dalla proliferazione condrocitaria, esercitino un meccanismo a feedback negativo sulla proliferazione stessa, andando così a modulare l'accrescimento longitudinale dell'osso lungo (Houghton & Dekel, 1979; Jenkins et al., 1975; Lutfi, 1974; Speer, 1982).

## ***Auxologia***

L'auxologia studia i fenomeni, i fattori e le leggi dell'accrescimento, ovvero quel complesso di eventi che dal momento del concepimento al raggiungimento dell'età adulta concorrono alla formazione dell'individuo, alternando momenti di maggiore e minore crescita.

Possiamo suddividere il processo di accrescimento in più fasi.

### **Fase prenatale**

Nella fase prenatale, la crescita aumenta rapidamente fino alla dodicesima settimana, momento in cui inizia invece una decelerazione progressiva, che proseguirà anche nel periodo postnatale (Matthiass HH., 1987). Eventuali danni in questa fase di sviluppo determinano gravi alterazioni nel periodo embrionario, invece, in fase fetale, il danno

determinato da eventuali fattori lesivi è di entità minore, anche in relazione alla ridotta velocità di crescita in questa fase.

Per la valutazione della crescita intrauterina ci si serve di appositi grafici di riferimento, specifici sia per la fase embrionale che fetale, utilizzando come parametri la circonferenza cranica, la lunghezza e il peso (Hensinger RN, 1986).

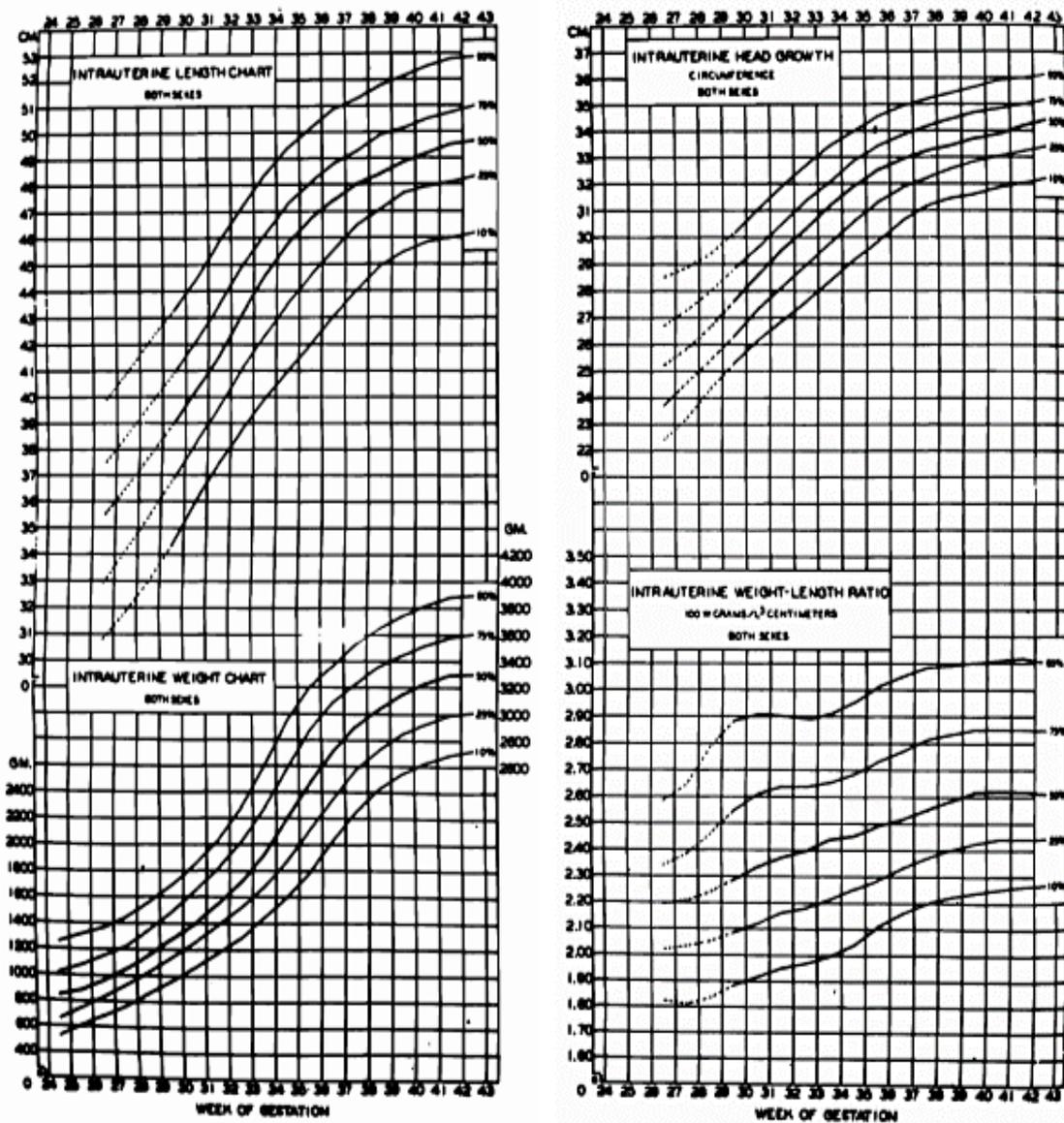


Figura 13. Percentili di crescita intrauterina in peso, lunghezza, circonferenza cranica e rapporto peso/altezza stimati in funzione dell'età gestazionale  
 Immagine tratta da Hensinger RN. (1986). *Standards in Pediatric Orthopedics. Tables, Charts, Graphs illustrating growth.* Raven Press.

## **Fase postnatale**

Alla nascita le meta-epifisi delle ossa lunghe e brevi sono ancora cartilaginee e seguiranno tempi e tappe differenti in base al distretto interessato, seguendo una cronologia definita (Matthiass HH., 1987). Infatti, per la definizione della crescita dell'individuo, alcuni centri di ossificazione hanno un valore predittivo maggiore rispetto ad altri: si prendono in considerazione soprattutto i centri di ossificazione di mani, soprattutto per valutare la maturità ossea, piedi e ginocchia.

Il processo di maturazione procede influenzato sia da eventi esterni che si combinano tra loro in diverso gradi (Matthiass HH., 1987), ma anche da eventi interni, tra cui giocano un ruolo di spicco patologie sistemiche e alterazioni ormonali che possono alterare la crescita dell'individuo (Tanner JM, 1981; Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N, 1990).

Anche in questa fase l'andamento della crescita viene monitorato tramite curve standard, che variano per età e sesso. Infatti, la crescita tra i due sessi è diversa già dalla nascita: gli individui di sesso femminile sono scheletricamente più maturi dei maschi, completando la crescita mediamente due anni prima. Inoltre, l'esposizione a condizioni avverse risulta più nociva per gli individui di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile (Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N, 1990).

La fase postnatale può essere a sua volta suddivisa in tre sottofasi:

- a. Prima infanzia
- b. Pre-pubertà
- c. Pubertà

*Prima infanzia.* È il periodo in cui il bambino inizia ad assumere la posizione eretta e a deambulare, il suo corpo deve quindi adattarsi alla forza di gravità che questo comporta. Gli arti inferiori si sviluppano notevolmente soprattutto nei primi tre anni, dopodiché la velocità di crescita subisce una riduzione (Matthiass HH., 1987).

*Pre-pubertà.* In questa fase si osserva un rallentamento dello sviluppo somatico; le proporzioni somatiche non subiscono variazioni significative.

*Pubertà.* Quest'ultima fase è caratterizzata da una generale spinta alla crescita, che procede in senso disarmonico tra crescita scheletrica e muscolare. La spinta puberale inizia dagli arti inferiori e procede in senso disto-proximale; infatti, caudalmente si arresta più precocemente rispetto al tronco, a circa tredici anni di età nella femmina e quindici nel maschio (Dimeglio A, 1994)

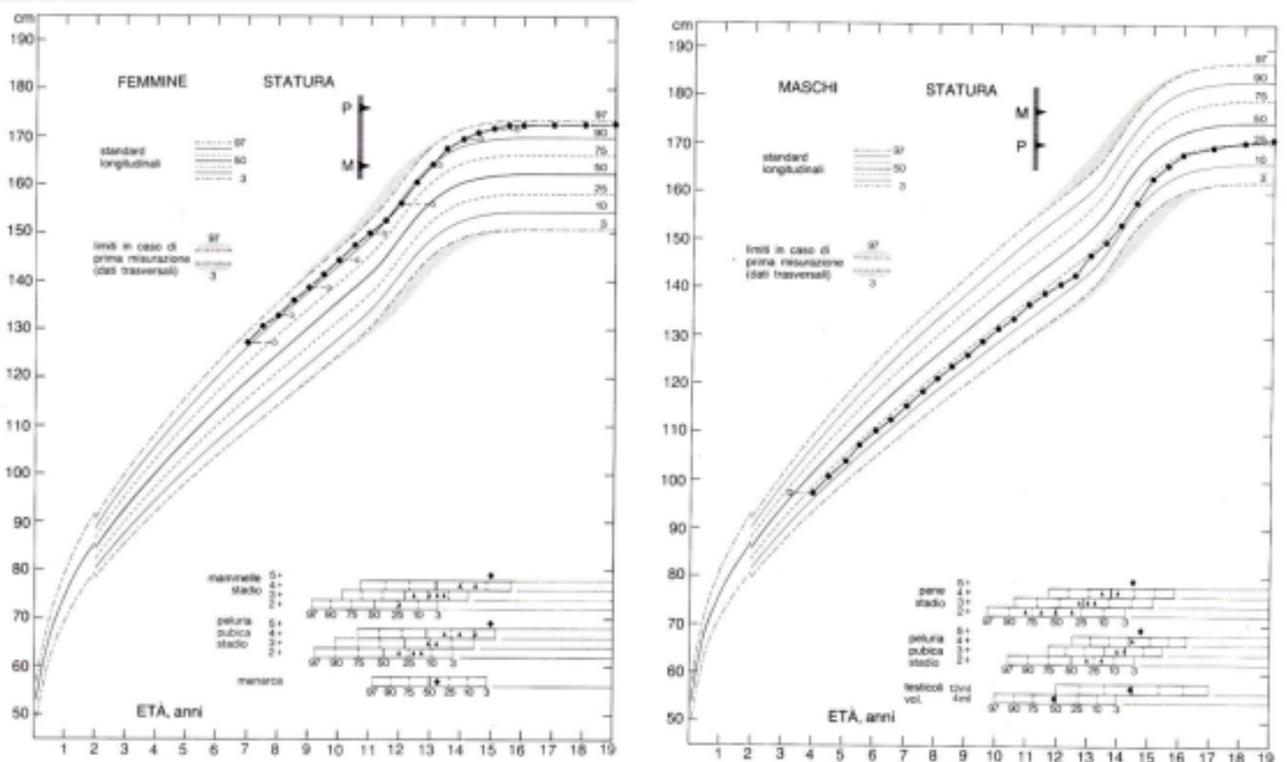


Figura 14. Standard staturali per femmine e maschi. I cerchi scuri rappresentano le stature normali per età, i cerchi chiari l'età ossea

### ***Auxologia del ratto Wistar***

Negli studi effettuati il modello animale utilizzato è stato quello del ratto Wistar, per questo ne sono di seguito esposte le caratteristiche auxologiche.

Questo modello murino cresce maggiormente nelle prime cinque settimane di vita, con un tasso di crescita che aumenta progressivamente dalla prima alla quinta settimana, per poi diminuire fino alla maturità scheletrica, ossia tipicamente tra le undici e le tredici settimane (Hunziker & Schenk, 1989; Kember, 1973). Nonostante la diminuzione progressiva del tasso di crescita, le ossa continuano ad allungarsi, con un ritmo ridotto, fino a circa ventisei settimane, momento in cui l'accrescimento cessa definitivamente (Walker & Kember, 1972).

Guardando alla cartilagine di accrescimento, la sua altezza è massima nel periodo di rapida crescita, per poi iniziare a ridursi di pari passo alla riduzione del tasso di crescita. Questo fenomeno è presumibilmente dovuto ad un ridotto tasso di proliferazione o ad un aumentato tasso di morte cellulare dei condrociti terminali alla giunzione osteo-cartilaginea (Roach et al., 2003).

Nonostante l'accrescimento termini definitivamente a ventisei settimane, la piastra di crescita permane nel ratto, con un razionale non ancora ben indagato (Walker & Kember, 1972).

Dal punto di vista istologico, la fisi murina appare costituita nella sua zona ipertrofica inferiore da grandi condrociti estremamente idratati, che gradualmente si riducono in numero e dimensioni successivamente allo scatto di crescita; rimane invece costante l'altezza della zona proliferativa e il tasso di proliferazione dei condrociti qui collocati, almeno fino alle dodici settimane (Roach et al., 2003). L'altezza della cartilagine di accrescimento correla primariamente col volume cellulare dei condrociti della zona ipertrofica; infatti, la riduzione cellulare successiva allo scatto di crescita correla con la riduzione in altezza della fisi stessa (Breur et al., 1991; Farnum et al., 2002; Kuhn et al., 1996; Roach et al., 2003; Wilsman et al., 1996).

Nel ratto più anziano, i grandi condrociti idratati sono del tutto assenti, indice del fatto che, con l'età, le capacità accrescitive si perdono (Roach et al., 2003). Tuttavia, anche dopo le ventisei settimane, si verificano ancora dei cambiamenti strutturali nella cartilagine di accrescimento, come (Db, 1991; Kalu et al., 1984):

- riduzione della cellularità, che invece aumenta nelle regioni adiacenti alla fisi
- rimodellamento della cartilagine nella porzione più centrale
- neoformazione ossea a partire dagli ex-condrociti
- sigillatura del bordo metafisario con matrice ossea

Anche l'osso trabecolare subisce modificazioni con l'avanzare delle settimane, si assiste infatti ad una diminuzione del volume osseo, ad una riduzione del numero di trabecole che però non sembrano ridursi in larghezza, e ad un aumento del numero di osteoclasti, in concordanza alla riduzione del volume osseo rilevato (Nenda et al., 2016).

## **BIOMECCANICA DEL COMPLESSO EPIFISO-METAFISARIO**

Come già detto, il processo di crescita è influenzato da una combinazione complessa di fattori, in cui vanno ad agire sinergicamente nutrizione, ormoni, genetica ed età. Non si può però non considerare l'influenza dell'ambiente meccanico circostante, come il carico e lo stress applicati all'osso, sulla crescita della cartilagine di accrescimento epifisaria.

Alterazioni di uno di questi fattori durante l'infanzia e l'adolescenza, infatti, possono avere un impatto negativo sulla normale crescita e portare a deformità muscolo-scheletriche come ginocchio varo, scoliosi, spondilolistesi, o epifisiolisi femorale (Alonso et al., 2022; Villemure & Stokes, 2009). Per questo è indispensabile valutare, nel processo di accrescimento osseo, il comportamento biomeccanico del complesso epifiso-metafisario, studiando le sue reazioni a sollecitazioni sia statiche che dinamiche.

Questo argomento risulta tutt'oggi ancora non ben chiarito, anche per la difficoltà nel creare un modello che possa rappresentare una struttura così complessa, ma generalmente la biomeccanica ossea vede come riferimenti la legge di Hueter-Volkmann, secondo cui la crescita ossea longitudinale è stimolata dalla tensione e inibita dalla compressione, e la legge di Wolf, che dimostra come l'osso si adatti allo stress meccanico applicato in modo intermittente, andando a favorire l'apposizione ossea quando è presente lo stimolo e a favorire il riassorbimento quando questo viene interrotto (D'Andrea et al., 2021; Mehlman et al., 1997; Villemure & Stokes, 2009).

Studi condotti su diversi modelli animali, in cui sono stati applicati carichi statici di trazione o compressione a tibie o vertebre durante lo scatto di crescita, hanno confermato questa legge, dimostrando una correlazione apparentemente lineare tra lo stress applicato e la crescita percentuale, con la trazione che accelera la crescita, e la compressione che invece la rallenta (Lerner et al., 1998; Stokes et al., 2006).

In particolare, i segnali meccanici applicati all'osso si riflettono sui condrociti della cartilagine di accrescimento, la quale mostra un tipico comportamento viscoelastico, ma

gli effetti sono diversi sia in base alla direzione della compressione, sia in base alla zona di cartilagine considerata.

Infatti, questa risulta circa dieci volte più cedevole nella direzione assiale, quindi di crescita longitudinale, che nella sua direzione trasversale. Inoltre, la zona meno rigida, e quindi maggiormente sottoposta a deviazioni compressive, risulta essere quella della zona ipertrofica, seguita dalla zona di riserva, mentre le deviazioni sono di gran lunga inferiori nella zona proliferativa (Hunziker, 1994; Sergerie et al., 2009; Villemure et al., 2007).

Quindi, la compressione della piastra di crescita va a ridurre lo spessore della zona ipertrofica, diminuendo il volume dei condrociti ipertrofici, oltre a produrre una perdita della disposizione colonnare ipertrofica e una riduzione dell'espressione delle principali proteine collagene della matrice extracellulare, come collagene di tipo II e X (D'Andrea et al., 2021; Sergerie et al., 2011; Villemure & Stokes, 2009).

Questi effetti sono stati studiati principalmente come risposta alla somministrazione di carichi statici, mentre risultano ancora controversi gli effetti di carichi somministrati in modo dinamico (Alonso et al., 2022). Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che la frequenza e l'ampiezza del carico possono influenzare la proliferazione dei condrociti e la mineralizzazione ossea (Department of Bioengineering, Imperial College London, London, SW7 2AZ, UK et al., 2021; Ueki et al., 2008), ma ci sono ancora risultati contrastanti in termini degli effetti specifici della dinamica del carico sulla crescita ossea (Lerner et al., 1998; Robling et al., 2001; Sergerie et al., 2011; Valteau et al., 2011; Wang & Mao, 2002).

### ***Biomeccanica delle fibre elastiche***

Anche il sistema delle fibre elastiche potrebbe giocare un ruolo nella biomeccanica del complesso epifiso-metafisario, come suggerito dalla loro importante presenza.

La loro distribuzione assicura un'ottimale distribuzione dello stress e minimizza la tensione interna, e potrebbe essere correlata al comportamento meccanico di ogni

struttura; infatti, sono presenti più fibre elastiche all'interfaccia tra materiali con un modulo elastico molto differente, come nella giunzione osteoperiostale, o in tessuti sottoposti ad una elevata tensione, come la capsula articolare, la membrana sinoviale, il periostio e il perimisio (Gigante et al., 1994).

A livello della cartilagine di accrescimento, sembrerebbero esercitare un feedback negativo sulla crescita e proliferazione dei condrociti, che a loro volta, aumentando in numero e dimensioni, metterebbero in tensione il sistema di contenzione stesso, andando a stressare il circuito inibitorio. Infatti, modificazioni della tensione nel complesso epifiso-metafisario, causate da incisioni periostali o da amputazioni, determinerebbero l'insorgenza di malformazioni per la perdita di questa capacità contenitiva (D'Souza & Shah, 1999; Gigante et al., 2001; Houghton & Dekel, 1979; McLain & Vig, 1983; Speer, 1981)

Le proprietà meccaniche del sistema delle fibre elastiche non dipendono, però, solamente dalla caratteristica resilienza intrinseca all'elastina e alla componente fibrillare, ma anche dalla stretta relazione che si instaura tra elastina e fibre collagene, innescando una sinergia biomeccanica positiva che stabilizza il complesso epifiso-metafisario, andando a distribuire le sollecitazioni all'intera struttura (Gigante et al., 1996; Hill et al., 2020; Strocchi et al., 1992).

## **MALATTIE CORRELATE ALLE FIBRE ELASTICHE**

È innegabile il ruolo che il sistema delle fibre elastiche riveste come costituente dei tessuti connettivi dell'organismo; infatti, alterazioni nell'assemblaggio di queste fibre possono condurre ad una serie di condizioni cliniche, sia ereditarie che acquisite, che possono variare da lievi alterazioni della plasticità connettivale ad anomalie della crescita, fino ad arrivare a disturbi vascolari con implicazioni potenzialmente letali (Hill et al., 2020; Kielty, 2006).

Tra le condizioni più comuni la cui patogenesi sia riconducibile ad un'alterazione delle fibre elastiche si annoverano: sindrome di Williams-Breuren, cutis laxa, sindrome di Marfan e sindrome di Weill-Marchesani. Tra queste, verrà presa in esame la sindrome di Marfan, in quanto in questa condizione risulta evidente il ruolo che il sistema delle fibre elastiche svolgerebbe nell'accrescimento osseo.

### ***Sindrome di Marfan***

La sindrome di Marfan è una malattia sistemica del tessuto connettivo ad ereditarietà autosomica dominante a penetranza variabile. Il difetto genetico primario è localizzato sul cromosoma 15q21.1, che corrisponde alla regione codificante del gene della fibrillina-1, principale componente delle microfibrille che costituiscono l'impalcatura su cui prendono forma le fibre elastiche (Dietz et al., 2005; Dietz & Pyeritz, 1995; Kielty et al., 2002, 2005; Ramirez et al., 2018; Zeigler et al., 2021).

Approfondendo nella fisiopatologia, è stato evidenziato come le manifestazioni di questa sindrome non dipendano solamente dal formarsi di un network di microfibrille disordinate, ma anche dal fatto che la fibrillina-1 riveste un ruolo fondamentale nel sequestro del fattore di crescita trasformante beta, TGF- $\beta$ . La perdita di microfibrille funzionali, infatti, causa un'eccessiva attivazione di questo fattore, con effetti deleteri sullo sviluppo della muscolatura vasale liscia e sull'integrità della matrice extracellulare (Ramirez et al., 2018; Yuan et al., 2011; Zeigler et al., 2021).

Le manifestazioni cliniche di questa sindrome possono essere molto eterogenee, ma coinvolgono principalmente scheletro, occhi e sistema cardiovascolare; infatti, la diagnosi viene effettuata tramite l'integrazione di diversi criteri, che più recentemente sono stati riassunti nella nosologia di Ghent del 2010 (Loeys et al., 2010; Zeigler et al., 2021).

### **Manifestazioni oculari e anomalie cranio-facciali**

I disturbi visivi sono molto comuni nella sindrome di Marfan e vedono come principale manifestazione l'ectopia lentis, ovvero una sublussazione o dislocazione del cristallino che si sposta nella camera anteriore dell'occhio o giace direttamente sulla retina, dovuto ad un indebolimento dei filamenti strutturali a causa della fibrillina alterata (CLARKE, 1939). Questa condizione può essere ritrovata in circa il 30% degli affetti da sindrome di Marfan, ed è di raro riscontro al di fuori di questa malattia, tanto da rientrare tra le caratteristiche cardinali della nosologia di Ghent.

Altre manifestazioni oculari comprendono: endoftalmo con globo oculare allungato e cornea più piatta e sottile, ipertelorismo, miopia, astigmatismo e distacco di retina (Child, 2017).

Ulteriori reperti craniofacciali includono dolicocefalia, quindi cranio la cui lunghezza è maggiore della larghezza, retrognazia, iposviluppo mascellare superiore e fessure palpebrali oblique verso il basso (Zeigler et al., 2021).

### **Manifestazioni cardiovascolari**

Le manifestazioni cardiovascolari sono il principale fattore prognostico quoad vitam degli affetti da questa sindrome (Groth et al., 2018; van Karnebeek et al., 2001). Tra queste si annoverano: la dilatazione aneurismatica della radice aortica e delle arterie polmonari, la dissezione della radice aortica, il prolasso delle valvole mitrale e tricuspide, cardiomiopatie e aritmie sopraventricolari. Il maggior peso è rivestito dall'aneurisma aortico, che interessa anche l'anulus e i seni di Valsalva, e che, se non tempestivamente

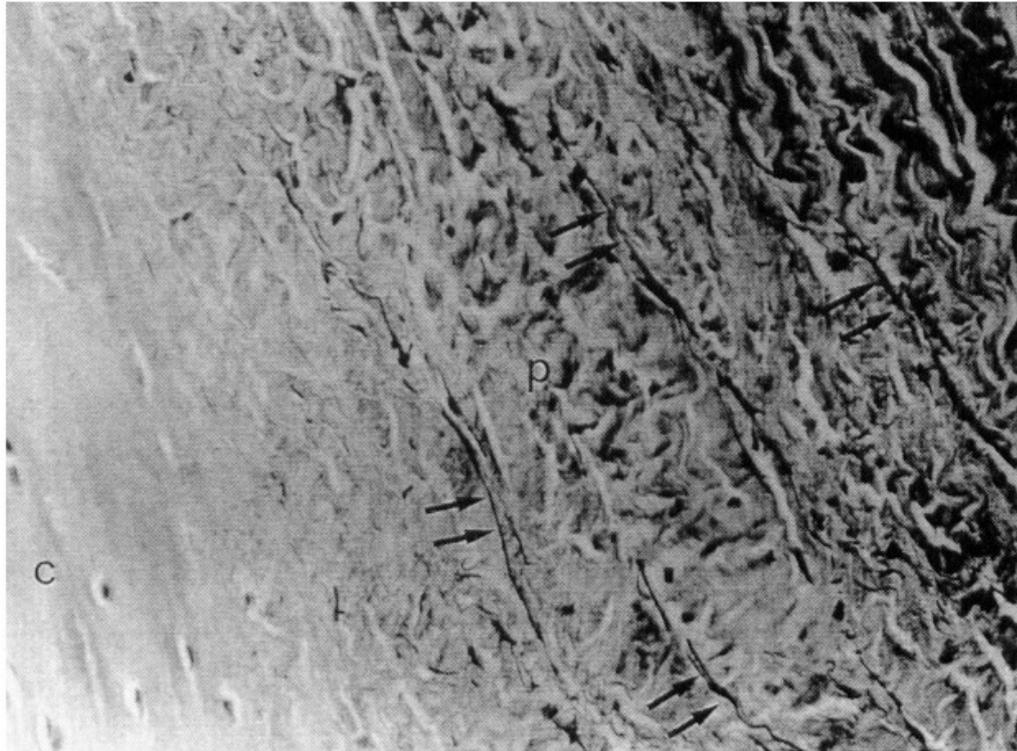
corretto, può portare a insufficienza aortica, dissezione e insufficienza cardiaca congestizia, con seri rischi per la vita dei pazienti (Groth et al., 2018; Zeigler et al., 2021).

### **Manifestazioni muscolo-scheletriche**

Le anomalie a questo livello sono spesso il primo reperto a sollevare il sospetto di sindrome di Marfan. Il classico fenotipo include un'eccessiva crescita delle ossa lunghe, con dolicomorfismo e aracnodattilia, che si accompagna a scoliosi, deformità del petto che si presenta tipicamente scavato o carenato per anomala crescita delle coste, e aumento della lassità articolare (F. Greco, A. Gigante, C. Chillemi, L. de Palma, 1997; Gigante et al., 1999; Zeigler et al., 2021).

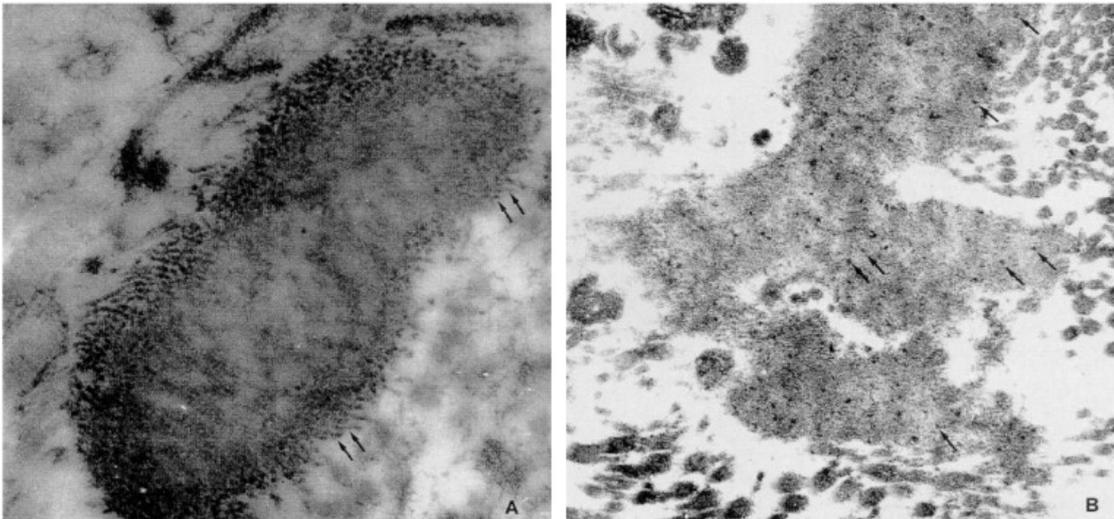
Studi effettuati su modelli bovini di sindrome di Marfan hanno dimostrato la diminuzione di fibre elastiche nella capsula articolare degli affetti, suggerendo che, grazie al ruolo esercitato dalle microfibrille, queste abbiano un ruolo nella stabilizzazione articolare. La loro mancanza, quindi, renderebbe le articolazioni incapaci di resistere a sollecitazioni meccaniche, causando lassità e dislocazioni (Gigante et al., 1999).

Per quanto riguarda l'eccessiva crescita delle ossa lunghe, questa non è riferibile alla ritardata chiusura della fisi, che in realtà tendono a chiudersi più precocemente del normale (Van Bechem, 1958), causando una discrepanza tra altezza e sviluppo fisiologico. Piuttosto, la causa di questo fenomeno sarebbe da ricercarsi nella diminuzione del numero di fibre elastiche a livello pericondrio-periostale durante lo sviluppo, che determinando una ridotta contenzione dei condrociti in crescita, esiterebbe in un aumentato accrescimento dell'individuo (F. Greco, A. Gigante, C. Chillemi, L. de Palma, 1997; Gigante et al., 1999).



*Figura 15.* Pericondrio da individui MFS. Le fibre elastiche (→) mantengono il normale orientamento nei diversi strati, ma sono drasticamente ridotte di numero. Appaiono frammentati, più sottili e più rari rispetto ai controlli (colorazione con ematossilina di ferro di Verhoeff, ingrandimento originale × 200). C, cartilagine; P, pericondrio.

*Immagine tratta da Gigante A, Chillemi C, Greco F. Changes of elastic fibers in musculoskeletal tissues of Marfan syndrome: a possible mechanism of joint laxity and skeletal overgrowth. J Pediatr Orthop. 1999 May-Jun;19(3):283-8. PMID: 10344308.*



*Figure 16-17. A:* Pericondrio normale: le fibre elastiche presentano le consuete caratteristiche ultrastrutturali: un nucleo amorfo ed omogeneo circondato da più filamenti (→), ciascuno di 10-12 nm di diametro. Queste fibre mostrano una struttura compatta, margini definiti e una forma ellissoidale o doppia concava in sezione trasversale (microscopia elettronica a trasmissione, ingrandimento originale × 50.000). *B:* Pericondrio MFS: la struttura delle fibre elastiche appare frammentata e frastagliata, a causa della presenza di aggregati discontinui di elastina tra filamenti dispersi in modo casuale (→) (microscopia elettronica a trasmissione, ingrandimento originale × 30.000).

*Immagine tratta da Gigante A, Chillemi C, Greco F. Changes of elastic fibers in musculoskeletal tissues of Marfan syndrome: a possible mechanism of joint laxity and skeletal overgrowth. J Pediatr Orthop. 1999 May-Jun;19(3):283-8. PMID: 10344308.*

## STATO DELL'ARTE

---

Questo progetto di studio è il proseguimento di un filone di ricerca che tenta di comprendere i meccanismi locali di regolazione dell'accrescimento scheletrico.

Già da tempo la letteratura ha evidenziato come, in individui in età di accrescimento che subivano un'amputazione, il moncone osseo andava incontro ad una crescita eccessiva. È infatti noto come questa eccessiva crescita rappresenti la complicanza più comune di questo tipo di intervento (Jahmani et al., 2019; Michels & De Smet, 2001; Tenholder et al., 2004; Vocke & Schmid, 2000); le punte ossee neoformate, infatti, crescono più rapidamente dei tessuti molli circostanti, andando a causare perforazioni e conseguenti infezioni (Beekman, 1938; Frantz & Aitken, 1959; Kurtz & Hand, 1939).

Molte ipotesi sono state proposte per spiegare questo fenomeno. Pellicore et al. ha osservato la stimolazione della crescita ossea dopo l'amputazione, sostenendo che alla base ci fosse un'eccessiva crescita della fisi, non compensata dalla corrispettiva crescita dei tessuti circostanti (Pellicore et al., 1974); tuttavia, l'epifisiodesi prossimale che è stata applicata per cercare di risolvere questa discrepanza è fallita, mettendo in discussione questa ipotesi (Aitken GT, 1968; Drvaric & Kruger, 2001; Pfeil et al., 1991; Saal, 1939).

Successivamente, si è notato come amputazioni di origine traumatica (Michels & De Smet, 2001; O'Neal et al., 1996; Tenholder et al., 2004; Vocke & Schmid, 2000) andassero più frequentemente incontro a questo fenomeno rispetto ad amputazioni per disarticolazione, o a condizioni quali l'agenesia congenita (Aitken, 1963; Firth et al., 2011).

La crescita eccessiva, in questa ipotesi, sarebbe riferibile non tanto alla crescita della fisi prossimale, ma ad un meccanismo di riparazione locale del moncone distale conseguente al trauma osseo. Aitken, infatti, andando ad impiantare un marcatore radiografico nel moncone osseo, ha dimostrato come la crescita eccessiva si verificasse distalmente al marcatore, e quindi che non dipendesse da un contributo epifisario, ma piuttosto da un fenomeno locale di guarigione ossea (Aitken, 1963; Aitken GT, 1962), motivo per cui

non si verificherebbe nei casi di disarticolazione, in cui è presente cartilagine articolare intatta piuttosto che osso sezionato.

Tuttavia, questo processo non sembra verificarsi negli adulti, rimanendo una complicanza dell'età pediatrica. Speer ha spiegato questa differenza sostenendo che negli individui in accrescimento il moncone cresce per deposizione ossea intramembranosa, possibile grazie alle caratteristiche elastiche del periostio (Speer, 1981).

Infatti, nella pratica clinica, il ruolo del periostio nella crescita ossea è sfruttato per interventi di stripping periostali che hanno come obiettivo la correzione di dismetrie, come dimostrato da studi riportanti risultati significativi nella compensazione della differenza di crescita dei due arti (D'Souza & Shah, 1999; Jenkins et al., 1975; Limpaphayom & Prasongchin, 2011).

## **FIBRE ELASTICHE ED ELASTASI**

Valutando il ruolo del periostio sulla crescita degli arti, sono stati realizzati studi volti a chiarire la funzione delle fibre elastiche all'interno del complesso di accrescimento epifiso-metafisario, data la loro rilevante e ben organizzata presenza in tale distretto (Gigante et al., 1994, 1996).

Una possibile metodica di riduzione della componente elastica del pericondrio-periostio è quella realizzata mediante digestione enzimatica con elastasi. Le elastasi sono enzimi proteolitici che catalizzano la solubilizzazione dell'elastina e della fibrillina attraverso un clivaggio proteolitico (Baló & Banga, 1949); tuttavia la loro attività non è esclusiva sull'elastina, in quanto possono esercitare un'azione potente tanto quanto quella della tripsina nel clivaggio di proteine come caseina ed emoglobina, molte componenti della matrice extracellulare e fibronectina.

L'effetto proteolitico selettivo dell'elastasi sulle fibre elastiche del periostio è stato dimostrato tramite analisi istochimica, immunoistochimica e istomorfometrica: si è osservata la riduzione dose-dipendente delle fibre elastiche e la sostanziale conservazione del patrimonio collagenico (Chillemi et al., 1999).

L'alterazione delle fibre elastiche è stata realizzata anche mediante utilizzo di DL-penicillamina, sostanza in grado di inibire la formazione di legami crociati di desmosina nell'elastina e quindi indurre un aumento della componente microfibrillare di tali fibre, senza influenzare la rete e i marcatori biochimici del collagene (Gigante et al., 2001). La crescita drasticamente ridotta delle ossa lunghe rispetto al controllo ha suggerito un possibile ruolo delle fibre elastiche anche se con meccanismi ancora del tutto da chiarire.

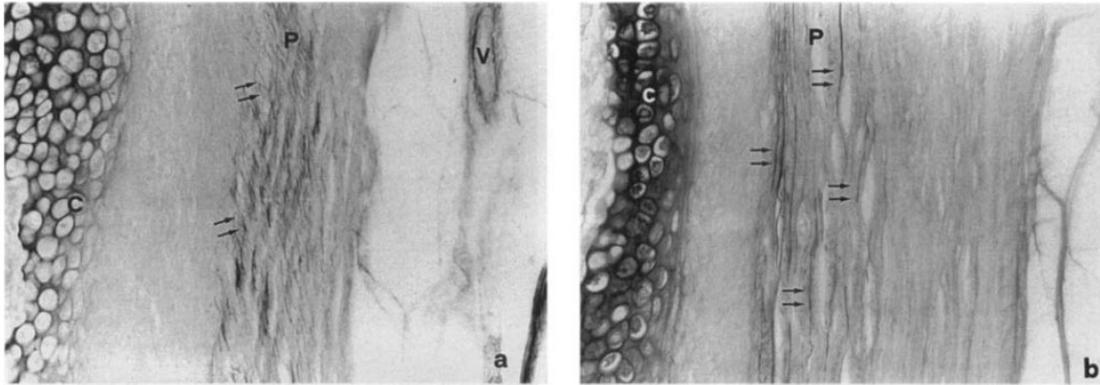


Figure 18-19. Sezioni longitudinali della metafisi prossimale della tibia di un pulcino di 30 giorni (colorazione Verhoeff dopo ossidazione): le fibre elastiche trattate con DL-PNA (a) mantengono il normale orientamento ma sono più dense, più corte e più spesse (freccie); nel controllo (b) le fibre hanno un decorso prevalentemente longitudinale, parallelo all'asse principale dell'osso (freccie). (C: cartilagine; P: periostio; V: vasi pericondrali). Immagine tratta da Gigante A, Chillemi C, Quaglino D, Miselli M, Pasquali-Ronchetti I. DL-penicillamine induced alteration of elastic fibers of periosteum-perichondrium and associated growth inhibition: an experimental study. *J Orthop Res.* 2001 May;19(3):398-404. doi: 10.1016/S0736-0266(00)90033-0. PMID: 11398852.

## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

---

Il presente lavoro è stato realizzato con lo scopo di approfondire il ruolo delle fibre elastiche nell'accrescimento scheletrico, andando a verificare l'azione enzimatica dell'elastasi in termini di efficacia, selettività e sicurezza.

Questo obiettivo è stato perseguito mediante la realizzazione di una fase di studio in vitro e di una in vivo.

Lo studio in vitro ha previsto la realizzazione di un nuovo modello sperimentale di colture d'organo (tibiae di ratto) che permettesse di stabilire il miglior rapporto dose-effetto dell'enzima e di studiare i fattori locali di controllo della crescita ossea senza influenze sistemiche.

Lo studio in vivo ha testato gli effetti di una somministrazione locale mininvasiva dell'enzima sulla crescita ossea, valutandone efficacia ed eventuali tossicità.

## STUDI SPERIMENTALI

---

Il modello sperimentale utilizzato è il ratto Wistar. Tutti i campioni erano provenienti dalla stessa nidiata, al fine di rendere più omogenei e paragonabili i gruppi.

Sono stati eseguiti due studi sperimentali:

1. Studio in vitro: analisi morfologica, istologica e ultrastrutturale dell'accrescimento osseo in coltura d'organo in condizioni basali e a seguito di incubazione con enzima Elastasi
2. Studio in vivo: analisi degli effetti della somministrazione locale di Elastasi sull'accrescimento degli arti in termini di accrescimento longitudinale, allineamento e aspetto morfologico

Questi sono stati eseguiti previa richiesta e ottenimento di specifica autorizzazione ministeriale.

## STUDIO IN VITRO

### *Materiali e metodi*

#### **Colture d'organo**

Lo studio è stato realizzato su campioni sperimentali a diverse età di sviluppo: in particolare sono stati utilizzati sia ratti neonati che, successivamente, ratti in fase di crescita più avanzata (5 settimane) provenienti dalla stessa nidiata.

Per le colture d'organo sono state prelevate in asepsi entrambe le tibie di 20 ratti, di cui 12 in età neonatale e 8 a cinque settimane di vita; in ogni coppia una tibia è stata assegnata in modo randomizzato al gruppo trattati, mentre la controlaterale al gruppo controlli, così da mantenere il confronto sia tra i due gruppi che all'interno dello stesso animale.

Si sono pertanto creati due gruppi:

- a. **Gruppo Controlli:** posti immediatamente dopo l'espianto in terreno di coltura con DMEM, 10% FBS (siero bovino fetale), 1% Penicillina-Streptomicina (Sigma), 1% Fungizone (Thermofisher), a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% di umidità
- b. **Gruppo Trattati:** trattamento per 1h con Elastasi (Sigma) a 30 UI in 0,7 ml in terreno di coltura DMEM con 1% FBS, 1% Penicillina-Streptomicina, 1% Fungizone e messi in incubazione a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% di umidità. Terminata l'ora di trattamento i campioni sono stati lavati con PBS (Tampone fosfato salino) e posti in coltura in multiwell con DMEM, 10% FBS, 1% Penicillina-Streptomicina, 1% Fungizone a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% di umidità

I campioni sono stati mantenuti in incubazione per un totale di 14 giorni; il cambio del terreno di coltura è stato effettuato ogni 72h, le misurazioni sono state effettuate al momento dell'espianto (T0), a 7 giorni di coltura (T7) e a 14 giorni (T14).

Al termine della coltura, le tibie sono state fissate in 4% para-formaldeide in 0.1 M tampone fosfato, pH 7.4 e processate per le analisi istochimiche, immuno-istochimiche, morfometriche e ultrastrutturali.

Ad ogni intervallo di riferimento (T0 e T7) da ogni gruppo è stata prelevata una coppia di tibie per lo studio morfologico, istochimico, immuno-istochimico e ultrastrutturale.

### **Analisi morfometrica**

In una prima fase si è proceduto con l'acquisizione delle immagini tramite microscopio Leica Leitz DMRBE (Leica Microsystem) equipaggiato con analizzatore digitale (Leica LAS 4.0) e collegato ad una video camera a colori e ad un computer.

Le tibie sono state fotografate sia in posizione anteroposteriore che in laterolaterale, e i dati ottenuti sono stati opportunamente registrati sul PC.

Successivamente si è passati alla misurazione delle tibie in posizione laterolaterale tramite il software ImageJ. I dati sono stati registrati ed analizzati, calcolando le

differenze di crescita sia nel totale del periodo di incubazione che nei sottoperiodi considerati, sia nei trattati che nei controlli. Sono state anche calcolate le rispettive percentuali di crescita.

Infine, le differenze di crescita e le percentuali ottenute sono state sottoposte ad analisi statistica tramite Test t di Student per dati appaiati.

### **Analisi istochimica**

Per la microscopia ottica i campioni sono stati sottoposti a trattamento decalcificante con Osteodec e processati per l'inclusione in paraffina. Sono state poi ottenute sezioni longitudinali (spessore compreso tra 3 – 5  $\mu\text{m}$ ), e colorate con ematossilina-eosina per la valutazione della qualità del tessuto, con colorazione di Verhoeff ed orceina acida per le fibre elastiche, e colorazione Sirius Red per le fibre collagene.

### **Analisi immunostochimica**

Dal campione di tessuto incluso in paraffina sono state ottenute sezioni consecutive di spessore compreso tra 3-5  $\mu\text{m}$ . L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata mediante immersione in acqua distillata contenente 3% di perossido di idrogeno per 6 minuti.

Sono stati adoperati: anticorpo anti-elastina, anti-collagene di tipo I, anti-collagene di tipo IV (tutti Abcam) e anti-collagene di tipo II (Oncogene).

Per il collagene di tipo I e per l'elastina i preparati sono stati sottoposti a smascheramento al calore con tampone rispettivamente a pH 6 e pH 9.

Per il collagene di tipo II e IV i preparati sono stati sottoposti a trattamento proteolitico rispettivamente con tripsina (0,1%) e con pepsina (4mg/ml) (entrambe Dako), per 30 min a 37° C, e successivamente lavati in acqua e 0.05M Tris/HCl.

Gli anticorpi sono stati preparati in Dako diluent with background reducing components, alle diluizioni di: collagene I 1:800, collagene II 10 µg/ml, collagene IV 1:500, elastina 1:2000.

Tutte le sezioni sono state incubate per 1h a temperatura ambiente. Il complesso antigene-anticorpo è stato evidenziato usando il kit Dako EnVision™ + Dual Link System, HRP/DAB, seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice.

Le sezioni sono state contrastate con ematossilina di Mayer (Bio-Optica SpA).

Per controllo negativo sono state utilizzate sezioni non trattate con anticorpo primario.

Le sezioni sono state esaminate con microscopio Leica Leitz DMRBE (Leica Microsystem), equipaggiato con analizzatore digitale (Leica LAS 4.0).

Tramite questo, si è anche proceduto alla quantizzazione delle fibre elastiche, sia nei trattati che nei controlli, prendendo in considerazione per ognuno di questi 5 campi ad ingrandimento 20x. Sono stati ricavati valori espressi come frazione percentuale di area occupata dalle suddette fibre, da questi è stata poi calcolata la media e messa a confronto con la media della tibia controlaterale.

### **Analisi ultrastrutturale**

I campioni sono stati sottoposti a fissazione in tampone cacodilato 0.1 M in soluzione con glutaraldeide al 2.5% a pH 7,4.

Sono stati ottenuti blocchetti di tessuto di 1 mm<sup>3</sup> post-fissati in tetrossido di osmio (Merk), e disidratati nella serie ascendente degli alcool ed inclusi in resina epossidica. Un ultratomo MT-X (RMC) è stato utilizzato per ottenere sezioni ultrasottili (~ 70 nm) che sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, ed esaminate al microscopio elettronico a trasmissione (Philips CM10).

## ***Risultati***

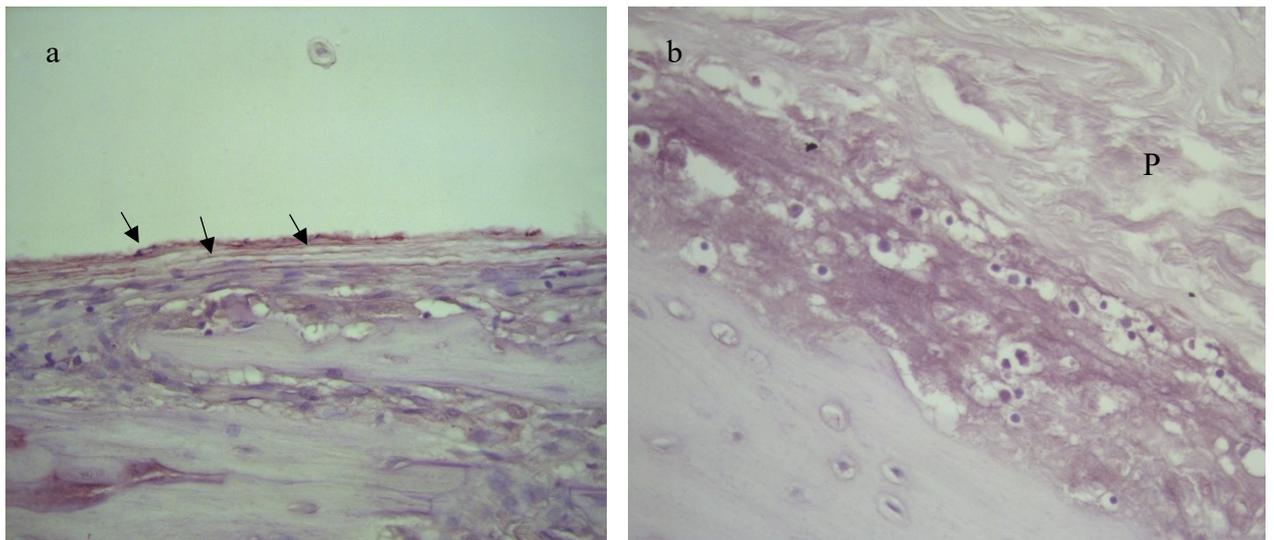
### **Colture d'organo**

Le colture sono state mantenute sotto osservazione tramite il microscopio e si sono mantenute vitali per tutta la durata dello studio, con fibroblasti e adipociti in proliferazione sul fondo della piastra. Inoltre, il medium è rimasto pulito e senza crescita di funghi e batteri.

### **Analisi istochimica e immunoistochimica**

Nei campioni trattati con Elastasi si è osservata una pressoché totale scomparsa delle fibre elastiche del periostio rispetto ai controlli. Non si sono invece evidenziate differenze di rilievo tra i vari gruppi per quanto riguarda la componente collagenica di tipo I, II e IV.

Dalla quantizzazione è emersa una significativa differenza in percentuale di fibre elastiche tra trattati e controlli, con una media di 0,008% nei primi, contro 0,55% nei secondi, confermando la quasi totale assenza di fibre elastiche dopo digestione enzimatica.



*Figure 20-21. Analisi istochimica: (a) controllo, visibili fibre elastiche integre e ordinate (freccie); (b) trattato, nel periostio (P) non sono visibili fibre elastiche marcate. Colorazione orceina acida, ingrandimento 40x*

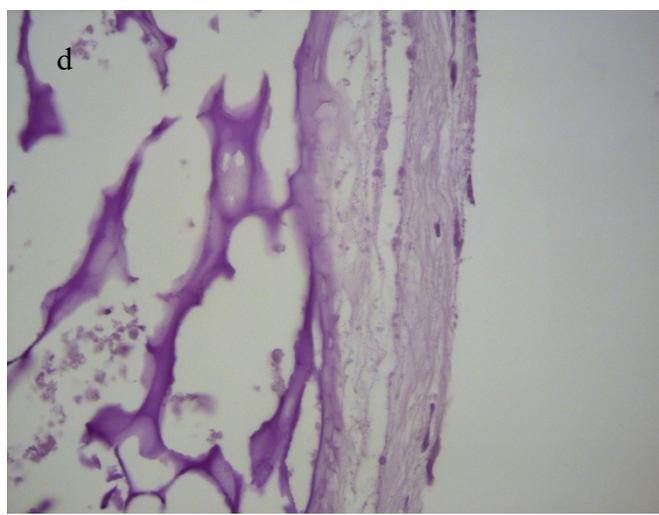
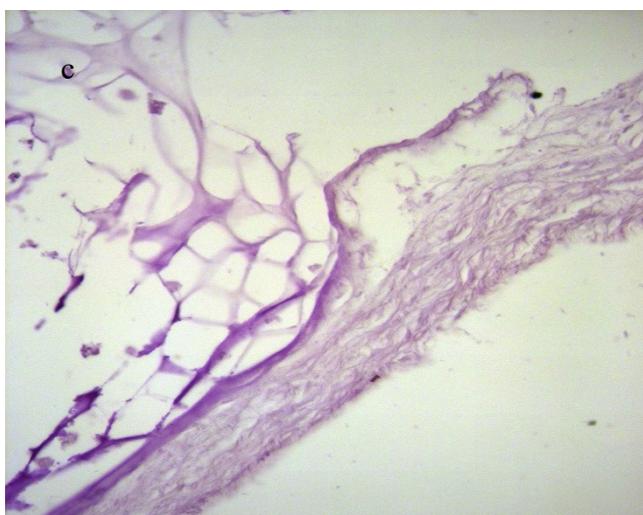
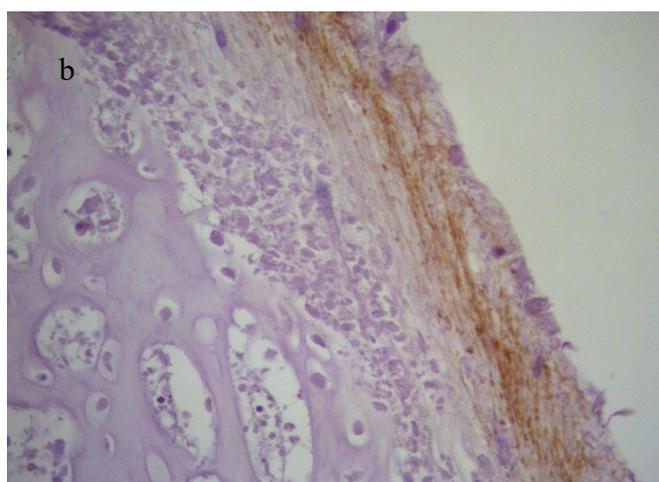
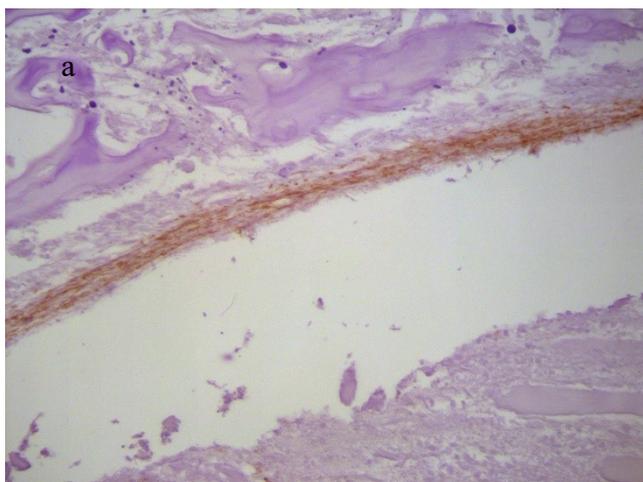


Figure 22-25. Analisi immuno-istochimica: (a, b) controlli, ricca presenza di fibre elastiche (marcate in marrone) nel periostio; (c, d) trattati, assenza di fibre elastiche. *Anticorpo anti-elastina, ingrandimento 40x*

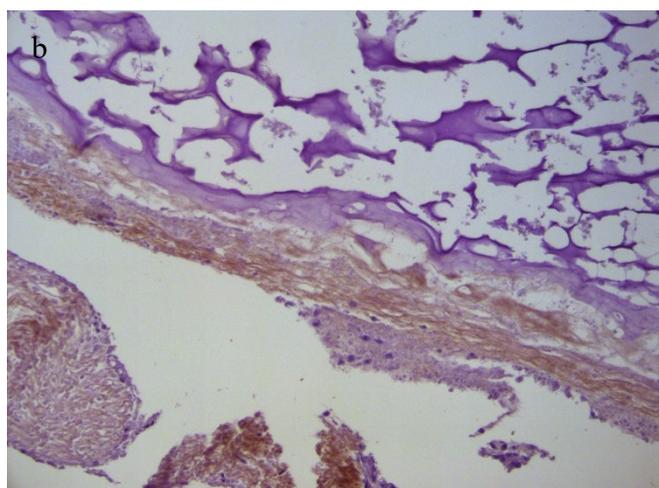
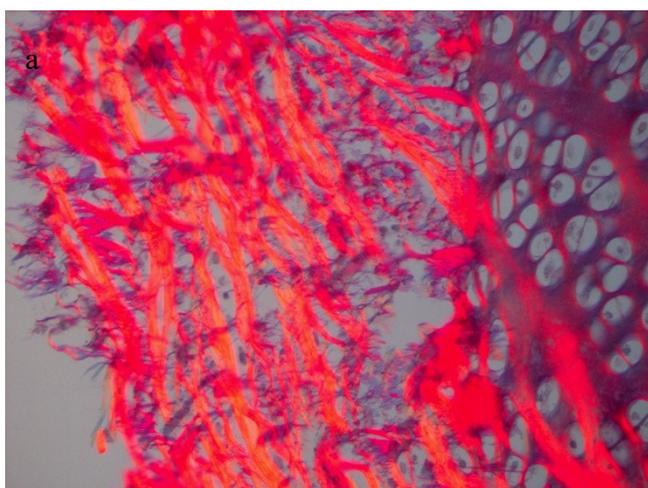
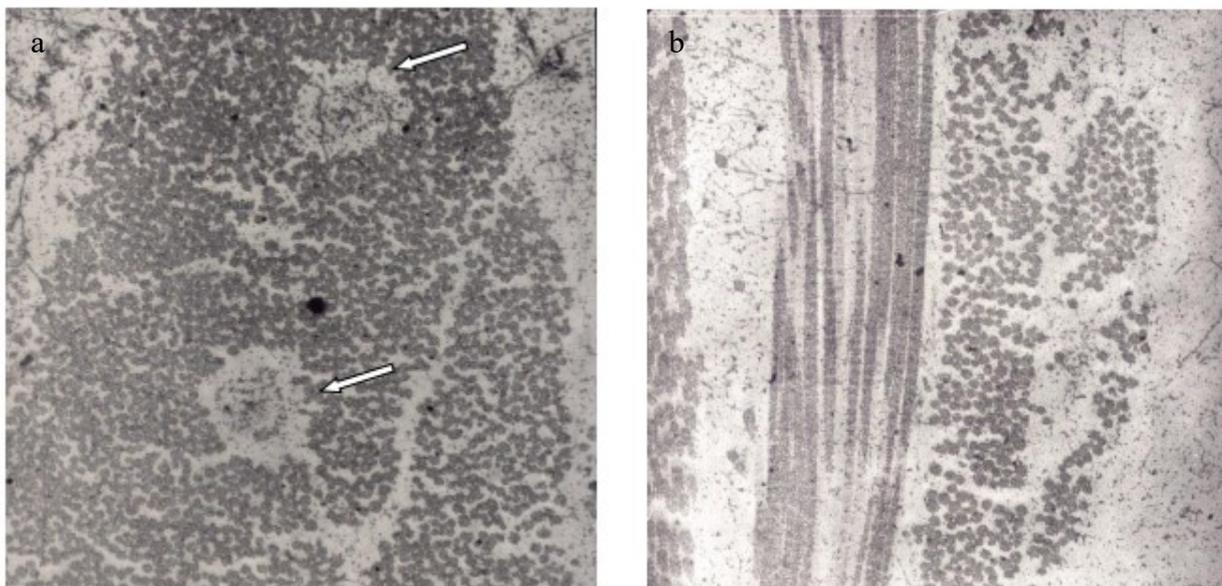


Figure 26-27. Analisi istochimica (a) e immuno-istochimica (b): nei trattati il patrimonio delle fibre collagene è rimasto inalterato. *Colorazione sirius red, ingrandimento 40x (a), anticorpo anti-collagene I, ingrandimento 20x (b)*

### **Analisi ultrastrutturale**

Nei campioni trattati con Elastasi non erano evidenziabili fibre elastiche integre, ma soltanto, talora, strutture riferibili a residui della digestione enzimatica. Si osservavano invece fasci di fibrille collagene normali per morfologia e distribuzione.



*Figure 28-29. Analisi ultrastrutturale: nei trattati sono visibili solo residui di fibre elastiche (freccie) (a), mentre le fibre collagene risultano inalterate (b)*

### **Analisi morfometrica**

Sono di seguito riportati solamente i risultati relativi ai ratti neonatali, in quanto nei modelli di cinque settimane non è stato possibile apprezzare differenze nella crescita dei campioni, che mostravano inoltre segni di sofferenza tissutale.

Nei campioni prelevati da ratti neonatali, i dati raccolti mostrano come tutti, sia trattati che controlli, siano cresciuti durante i quattordici giorni di coltura (media 10,63% nei trattati contro 5,54% nei controlli).

In particolare, nel primo periodo (T0-T7), si è avuto, per entrambi i gruppi, il maggior accrescimento longitudinale (in media 7,02% nei trattati, 3,69% nei controlli). L'allungamento è stato minore in valore assoluto nel secondo periodo (T7-T14), pur risultando maggiore nei trattati rispetto ai controlli (in media 3,37% vs 1,86%).

La crescita longitudinale delle tibie incubate con Elastasi è risultata maggiore in percentuale rispetto ai corrispondenti controlli in modo statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sia per quanto riguarda l'intervallo T0-T7 ( $p = 0,04$ ), che per l'intero periodo di osservazione ( $p \ll 0,01$ ). Non risulta, invece, statisticamente significativa la differenza di crescita nel periodo T7-T14 ( $p = 0,91$ ).

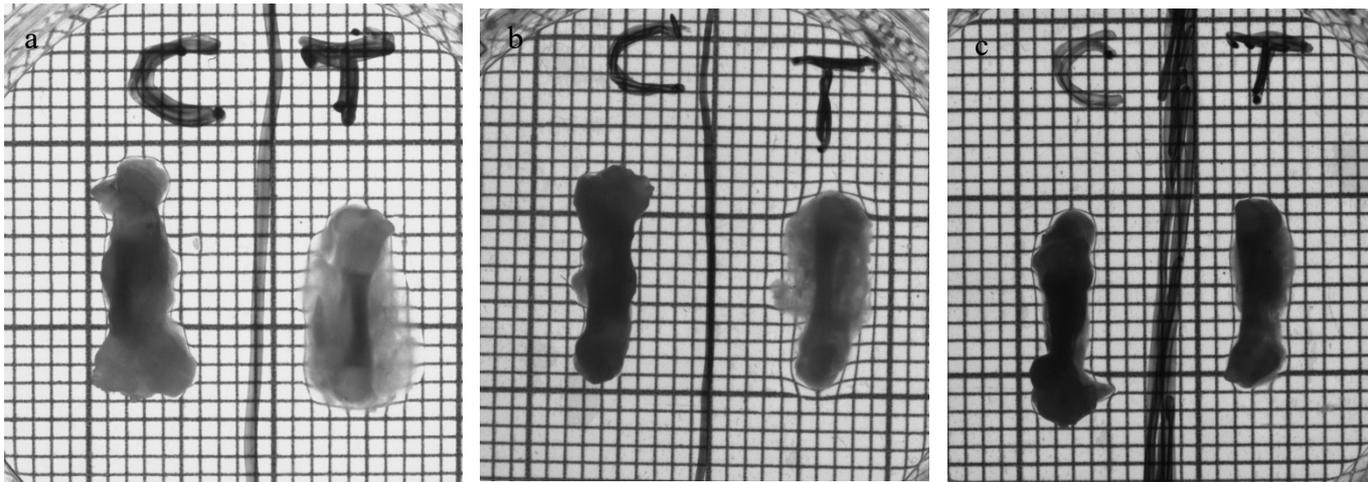


Figure 30-32. Analisi morfometrica: crescita dei campioni da T0 (a), a T7 (b) e a T14 (c)

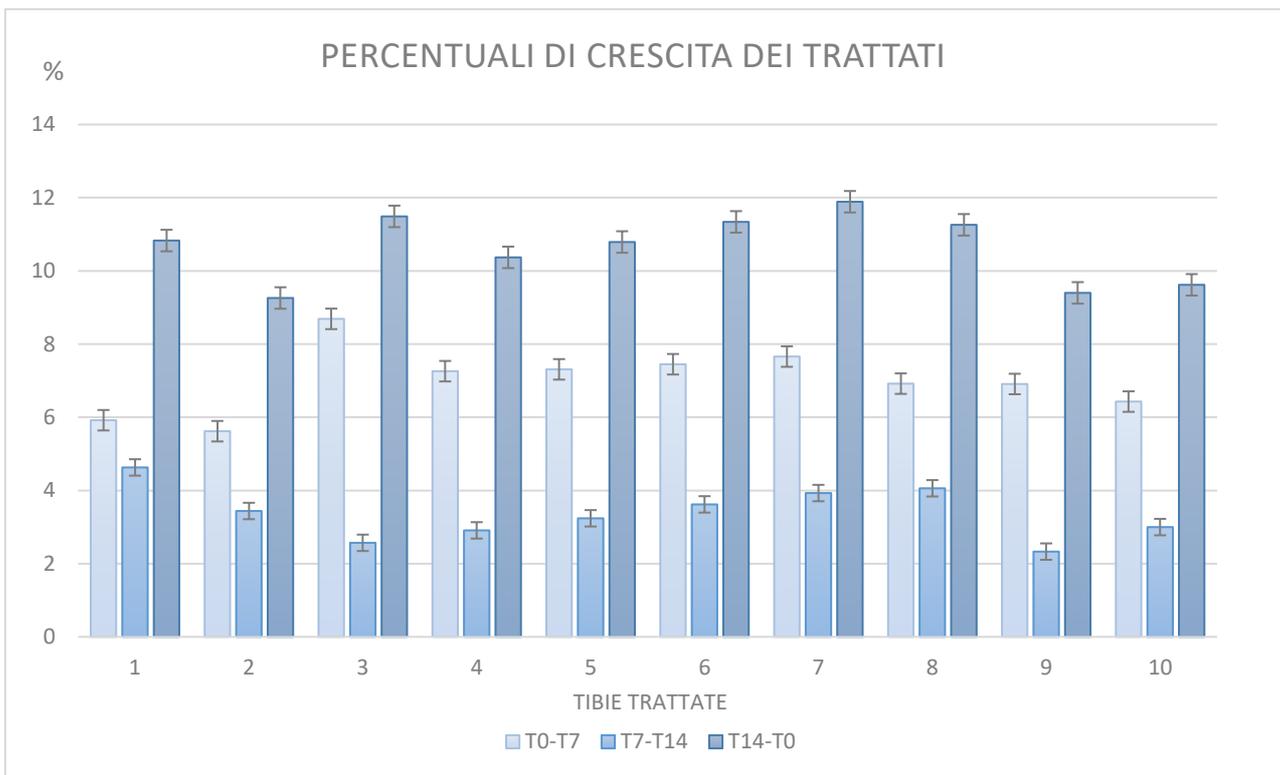


Grafico 1. Rappresentazione delle percentuali di crescita dei campioni trattati. In ascissa i campioni, in ordinata le relative percentuali

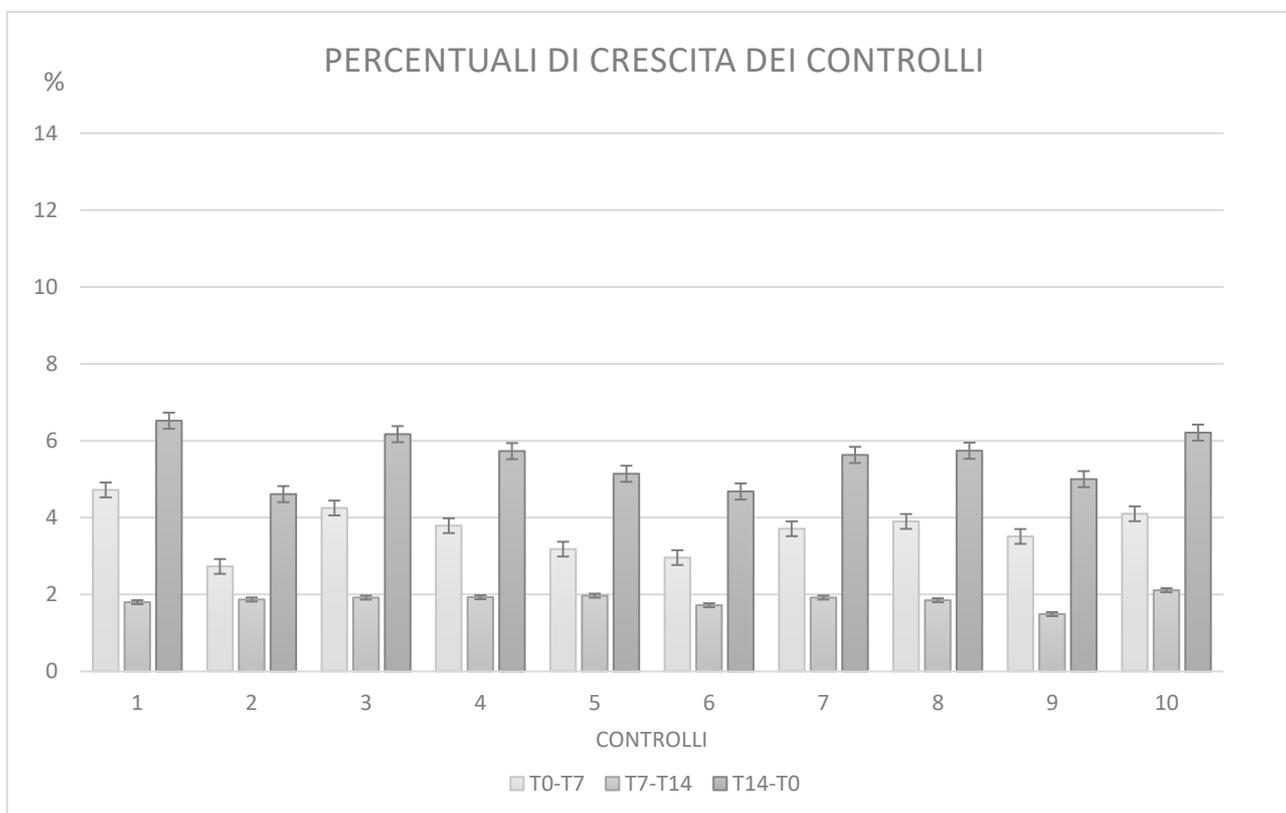


Grafico 2. Rappresentazione delle percentuali di crescita dei controlli. In ascissa i campioni, in ordinata le relative percentuali

## **STUDIO IN VIVO**

### ***Materiali e metodi***

#### **Modello sperimentale**

Sono stati reclutati 12 ratti ceppo Wistar di 6 settimane, ai quali sono state iniettati 0,1 ml di soluzione contenente 4UI di Elastasi in prossimità del terzo medio diafisario della tibia mediale destra. La tibia controlaterale, non trattata, è stata usata come controllo.

Gli animali sono stati stabulati e tenuti in osservazione, poi a 35 giorni dal trattamento, sono stati sacrificati in modo da prelevare entrambe le tibie, che sono state poi poste in formalina neutra tamponata al 4%.

Tutti i campioni sono stati sottoposti a esame morfologico-macroscopico, radiografico, istochimico e immuno-istochimico; per queste ultime due analisi sono state analizzate sezioni della porzione medio-proximale di ciascuna tibia.

#### **Esame radiografico**

Sono state acquisite radiografie sia in proiezione anteroposteriore che laterolaterale, al fine di verificare eventuali deviazioni assiali e differenze di crescita e di calcificazione tra trattato e controllo.

Le immagini sono state successivamente analizzate con ImageJ.

#### **Analisi morfometrica**

In una prima fase le tibie sono state osservate macroscopicamente e fotografate. Sono stati misurati in lunghezza tutti i campioni e gli assi in proiezione antero-posteriore, per misurare la crescita longitudinale ed eventuali deformazioni degli arti.

Si è poi proceduto con l'acquisizione delle immagini tramite microscopio Leica Leitz DMRBE (Leica Microsystem) equipaggiato con analizzatore digitale (Leica LAS 4.0) e collegato ad una video camera a colori e ad un computer.

Le immagini sono state acquisite sia in posizione anteroposteriore che in laterolaterale, e i dati ottenuti sono stati opportunamente registrati sul PC.

Successivamente si è passati alla misurazione delle tibie in posizione laterolaterale tramite il software ImageJ. Le misure ottenute sono state registrate e sono state ricavate le differenze di crescita tra trattato e rispettivo controllo.

Infine, questi dati sono stati sottoposti ad analisi statistica tramite Test t di Student per dati appaiati.

### **Analisi istochimica**

Per la microscopia ottica i campioni sono stati sottoposti a trattamento decalcificante con Osteodec e processati per l'inclusione in paraffina. Sono state poi ottenute sezioni longitudinali (spessore compreso tra 3 – 5  $\mu\text{m}$ ), e colorate con ematossilina-eosina per la valutazione della qualità del tessuto, con colorazione di Verhoeff ed orceina acida per le fibre elastiche, e colorazione Sirius Red per le fibre collagene.

### **Analisi immunoistochimica**

Dal campione di tessuto incluso in paraffina sono state ottenute sezioni consecutive di spessore compreso tra 3-5  $\mu\text{m}$ . L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata mediante immersione in acqua distillata contenente 3% di perossido di idrogeno per 6 min.

Sono stati adoperati: anticorpo anti-elastina, anti-collagene di tipo I, anti-collagene di tipo IV (tutti Abcam) e anti-collagene di tipo II (Oncogene).

Per il collagene di tipo I e per l'elastina i preparati sono stati sottoposti a smascheramento al calore con tampone rispettivamente a pH 6 e pH 9.

Per il collagene di tipo II e IV i preparati sono stati sottoposti a trattamento proteolitico rispettivamente con tripsina (0,1%) e con pepsina (4mg/ml) (entrambe Dako), per 30 min a 37° C, e successivamente lavati in acqua e 0.05M Tris/HCl.

Gli anticorpi sono stati preparati in Dako diluent with background reducing components, alle diluizioni di: collagene I 1:800, collagene II 10 µg/ml, collagene IV 1:500, elastina 1:2000.

Tutte le sezioni sono state incubate per 1h a temperatura ambiente. Il complesso antigene-anticorpo è stato evidenziato usando il kit Dako EnVision™ + Dual Link System, HRP/DAB, seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice.

Le sezioni sono state contrastate con ematossilina di Mayer (Bio-Optica SpA).

Per controllo negativo sono state utilizzate sezioni non trattate con anticorpo primario.

Le sezioni sono state esaminate con microscopio Leica Leitz DMRBE (Leica Microsystem), equipaggiato con analizzatore digitale (Leica LAS 4.0).

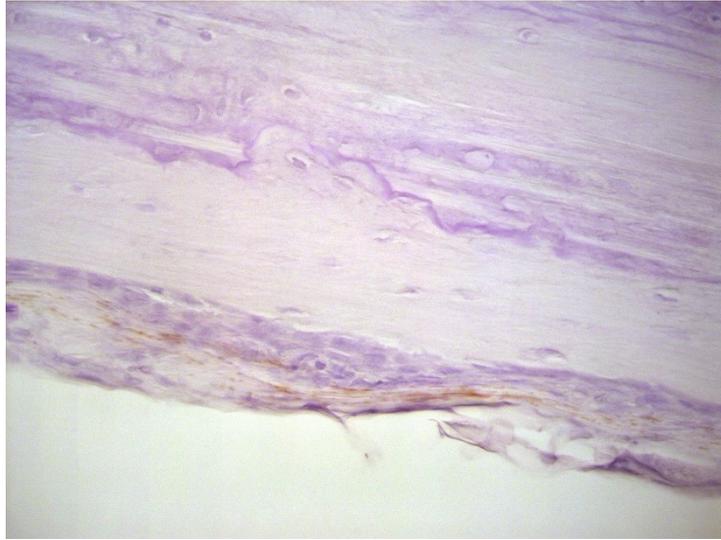
## ***Risultati***

### **Modello sperimentale**

Durante i 35 giorni di stabulario tutti gli animali sono cresciuti normalmente e non hanno accusato zoppie. Non sono state riscontrate alterazioni dei tessuti molli e cutanei.

### **Analisi istochimica e immunoistochimica**

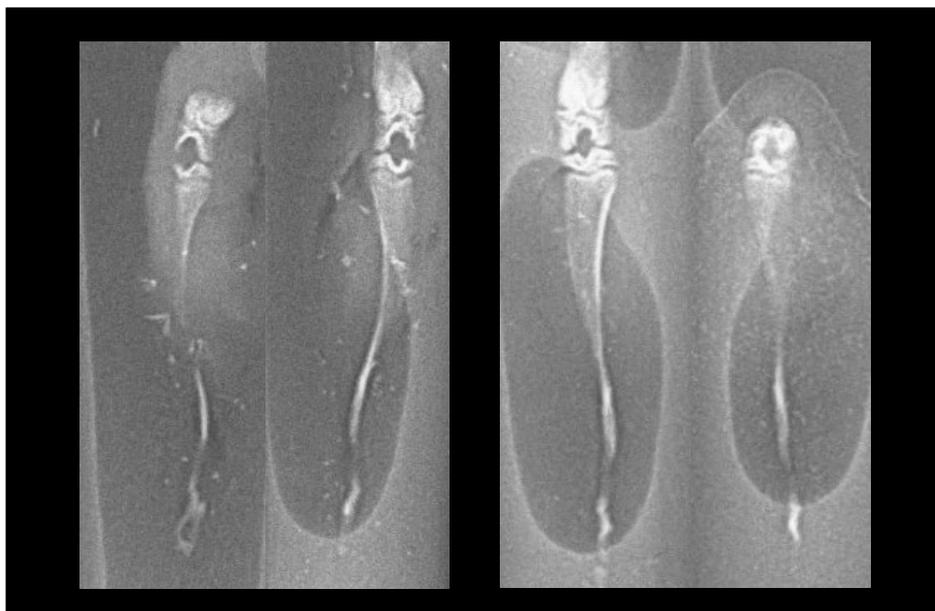
Nei campioni trattati con Elastasi si è osservata una pressoché totale scomparsa delle fibre elastiche del periostio rispetto ai controlli. Non si sono invece evidenziate differenze di rilievo tra i vari gruppi per quanto riguarda la componente collagenica di tipo I, II e IV.



*Figura 33. Analisi immuno-istochimica: tracce di fibre elastiche nel trattato. Anticorpo anti-elastina, ingrandimento 40x*

### **Esame radiografico**

All'esame radiografico i campioni risultano tra loro paragonabili, non sono evidenti deviazioni assiali né alterazioni della qualità dell'osso tra trattati e controlli. Alla misurazione dei radiogrammi è confermata la differenza di lunghezza riscontrata all'analisi morfometrica.



*Figura 34. Immagini radiografiche delle tibie trattate con Elastasi e relativi controlli. Per ogni coppia, a destra il trattato a sinistra il controllo.*

## Analisi morfometrica

Le misurazioni effettuate mostrano come, in tutti i campioni, i trattati con Elastasi siano cresciuti maggiormente rispetto ai controlli (lunghezza media 39,21 mm nei trattati, contro 36,32 mm nei controlli), con una differenza di crescita media di 2,89 mm.

All'analisi statistica le differenze di lunghezza si sono rivelate significative ( $p \ll 0,01$ ).

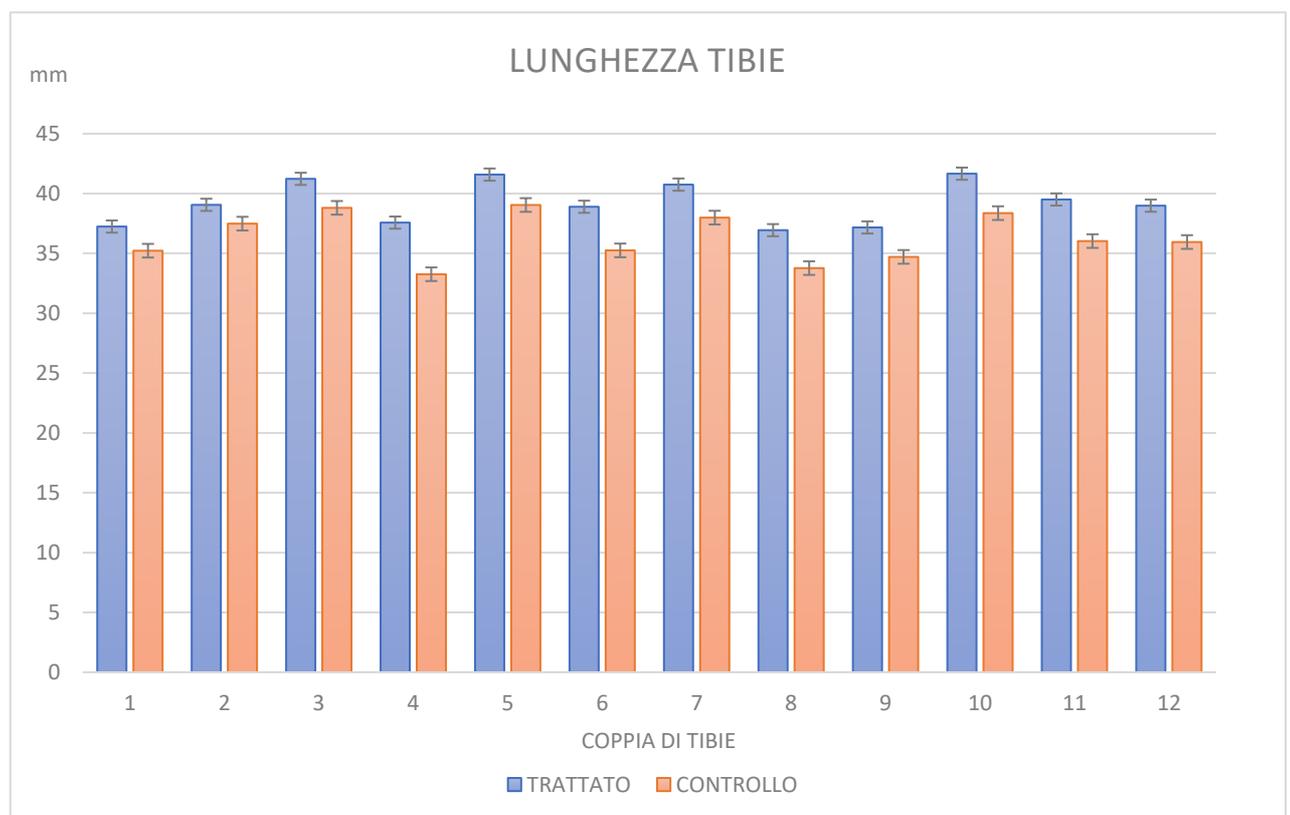


Grafico 3. Rappresentazione delle dimensioni raggiunte a fine osservazione da parte dei trattati e dei relativi controlli. In ascissa le coppie di campioni, in ordinata le relative lunghezze in millimetri

## DISCUSSIONE

---

Dagli studi effettuati è emerso come il modello murino si sia rivelato adatto allo scopo dello studio, infatti:

- a. Le colture d'organo si sono mantenute integre durante il periodo in esame, non hanno mostrato segni di colonizzazione batterica o fungina, ma anzi la piastra appariva colonizzata da fibroblasti e adipociti in proliferazione, dimostrando la vitalità del tessuto in coltura.
- b. L'Elastasi è in grado di determinare la solubilizzazione dell'elastina e dei microfilamenti, portando alla digestione delle fibre elastiche presenti nel pericondrio-periostio.
- c. La dose di Elastasi utilizzata, identificata in precedenti studi, si è rivelata idonea anche in questo nuovo modello sperimentale, mostrando un'azione efficace e al contempo selettiva. Non si sono infatti osservati danni a livello delle strutture limitrofe, in particolare fibre collagene e tessuto muscolare, che apparivano integre e normo-rappresentate all'analisi immunohistochimica e ultrastrutturale.
- d. Tutte le tibie in coltura sono andate incontro ad un accrescimento longitudinale, che si è mostrato significativamente maggiore nei campioni trattati con Elastasi, soprattutto per quanto riguarda i ratti neonati, con una media percentuale di crescita nei quattordici giorni del 10,63% vs 5,54% nei controlli. Questo accrescimento risulta maggiore nei primi sette giorni di coltura (per quanto riguarda i trattati, media 7,02% nella prima settimana vs 3,37% nella seconda), probabilmente per problematiche legate alla crescita in vitro stessa, come ad esempio una diminuita vitalità del campione con il passare dei giorni.
- e. Prendendo in esame modelli murini a diverse età di sviluppo, si sono potute osservare differenze tra campioni più giovani e campioni più maturi. Infatti, nei

ratti a tre giorni di vita l'ossificazione non è ancora completa, pertanto il tessuto risulta in gran parte cartilagineo; questo consente di osservare in coltura un significativo tasso di crescita accompagnato da un aumento dell'ossificazione. Nei ratti più adulti, invece, il campione risultava già ben ossificato al momento del prelievo, ma ciò ha comportato scarsi tassi di crescita e diminuita vitalità dei campioni. Il ratto neonato si è pertanto rivelato un modello sperimentale più funzionale rispetto a quello di 5 settimane.

- f. Nei campioni trattati con l'enzima, la crescita longitudinale è risultata significativamente maggiore rispetto ai controlli. Questo dato supporta l'ipotesi di partenza, ovvero che il sistema delle fibre elastiche rivesta un ruolo centrale nell'accrescimento osseo in individui in età di sviluppo.
  
- g. Nello studio in vivo i risultati sono stati confermati, si è osservata infatti una maggiore crescita dell'arto trattato rispetto al controlaterale ( $p \ll 0,01$ ) e una buona tollerabilità dell'enzima che non ha apportato evidenti danni ai tessuti circostanti e quindi all'animale in studio.

## CONCLUSIONI

---

In questa tesi si è voluto indagare e approfondire l'accrescimento osseo e i meccanismi che lo regolano, passando dai fattori sistemici a quelli locali, fino ad arrivare al ruolo svolto dalla componente fibrosa del complesso di accrescimento.

In particolare, si è approfondito il ruolo che il sistema delle fibre elastiche riveste in questo processo in continuo divenire. Il fatto che in alcune patologie, come la S. di Marfan, in cui c'è un'alterazione di tali fibre, si riscontri un eccessivo allungamento degli arti, suggerisce che abbiano un'azione determinante nella crescita dell'individuo.

Pertanto, partendo da evidenze ottenute da precedenti studi sull'argomento, è stato disegnato uno studio su un nuovo modello sperimentale, che è stato realizzato dapprima in vitro su colture d'organo, poi in vivo, per andare a verificare gli effetti su un modello vitale in accrescimento.

Entrambi gli studi hanno restituito dati significativi, dimostrando in primis la validità del nuovo modello proposto, che risulta essere più accurato in caso di campioni in età neonatale, in cui il processo di ossificazione è ancora iniziale e le potenzialità di crescita sono elevate.

L'enzima utilizzato, inoltre, ha confermato la sua efficacia e selettività, portando alla solubilizzazione dell'elastina e dei microfilamenti, senza apportare danni ai tessuti limitrofi e alla componente rappresentata dalle fibre collagene. Questa azione è stata dimostrata sia in vitro tramite analisi istochimiche, immuno-istochimiche e ultrastrutturali, sia in vivo, dove non sono stati evidenziati segni di sofferenza nell'animale né lesioni dei tessuti molli circostanti l'iniezione.

Infine, i dati raccolti si sono dimostrati significativi nel dimostrare un effettivo ruolo del sistema delle fibre elastiche nell'accrescimento, confermando l'iniziale ipotesi di un

possibile feedback negativo che queste svolgano sui condrociti in proliferazione della cartilagine di accrescimento.

Alla luce di ciò, si potrebbero aprire nuove prospettive di studi futuri volti ad indagare l'effetto che modificazioni di questa componente fibrosa possano avere sulle alterazioni delle ossa lunghe di individui in età di accrescimento, col fine di giungere a nuove opportunità terapeutiche.

## REFERENZE

---

1. Aitken, G. T. (1963). Surgical amputation in children. *JBJS*, 45(8), 1735–1741.
2. Aitken GT. (1962). *Overgrowth of the amputation stump*.
3. Aitken GT. (1968). *The child with an acquired amputation*.
4. Ali, S. Y. (1976). Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. *Federation Proceedings*, 35(2), 135–142.
5. Alonso, G., Yawny, A., & Bertolino, G. (2022). How do bones grow? A mathematical description of the mechanobiological behavior of the epiphyseal plate. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 21(5), 1585–1601. <https://doi.org/10.1007/s10237-022-01608-y>
6. Aspenberg, P., & Lohmander, L. S. (1989). Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 60(4), 473–476. <https://doi.org/10.3109/17453678909149323>
7. Aspenberg, P., Thorngren, K.-G., & Lohmander, L. S. (1991). Dose-dependent stimulation of bone induction by basic fibroblast growth factor in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 62(5), 481–484. <https://doi.org/10.3109/17453679108996650>
8. Astbury, W. T., & Bell, F. O. (1940). Molecular Structure of the Collagen Fibres. *Nature*, 145(3672), Article 3672. <https://doi.org/10.1038/145421a0>
9. Baló, J., & Banga, I. (1949). Elastase and Elastase-Inhibitor. *Nature*, 164(4168), Article 4168. <https://doi.org/10.1038/164491a0>
10. Beekman, F. (1938). Amputations during childhood. *The Surgical Clinics of North America*, 18, 425.
11. Bolander, M. E. (1992). Regulation of Fracture Repair by Growth Factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 165–170. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43410A>
12. Bostrom, M. P., Lane, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S. B., Glaser, D., & Rosen, V. M. (1995). Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the*

*Orthopaedic Research Society*, 13(3), 357–367.

<https://doi.org/10.1002/jor.1100130309>

13. Breur, G. J., VanEnkevort, B. A., Farnum, C. E., & Wilsman, N. J. (1991). Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(3), 348–359. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090306>
14. Brighton, C. T. (1978). Structure and function of the growth plate. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 136, 22–32.
15. Brighton, C. T., Sugioka, Y., & Hunt, R. M. (1973). Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes. Quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with special reference to the fate of hypertrophic cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 55(4), 771–784.
16. Carvell, J. E. (1983). The relationship of the periosteum to angular deformities of long bones. Experimental operations in rabbits. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 173, 262–274.
17. Chang, S. C., Hoang, B., Thomas, J. T., Vukicevic, S., Luyten, F. P., Ryba, N. J., Kozak, C. A., Reddi, A. H., & Moos, M. (1994). Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28227–28234.
18. Child, A. H. (2017). Non-cardiac manifestations of Marfan syndrome. *Annals of Cardiothoracic Surgery*, 6(6), 599–609. <https://doi.org/10.21037/acs.2017.10.02>
19. Chillemi, C., Bevilacqua, C., & Gigante, A. (1999). In vitro effects of elastase on periosteum of long bones: An histochemical, immunohistochemical and morphometric study. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 43(3), 227–233.
20. CLARKE, C. C. (1939). ECTOPIA LENTIS: A PATHOLOGIC AND CLINICAL STUDY. *Archives of Ophthalmology*, 21(1), 124–153. <https://doi.org/10.1001/archophth.1939.00860010140014>

21. Cohen, B., Chorney, G. S., Phillips, D. P., Dick, H. M., Buckwalter, J. A., Ratcliffe, A., & Mow, V. C. (1992). The microstructural tensile properties and biochemical composition of the bovine distal femoral growth plate. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, *10*(2), 263–275. <https://doi.org/10.1002/jor.1100100214>
22. Copray, J. C., Jansen, H. W., & Duterloo, H. S. (1983). Growth of the mandibular condylar cartilage of the rat in serum-free organ culture. *Archives of Oral Biology*, *28*(10), 967–974. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(83\)90095-x](https://doi.org/10.1016/0003-9969(83)90095-x)
23. Copray, J. C. V. M., Jansen, H. W. B., & Duterloo, H. S. (1985). An in-vitro system for studying the effect of variable compressive forces on the mandibular condylar cartilage of the rat. *Archives of Oral Biology*, *30*(4), 305–311. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(85\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(85)90002-0)
24. Cotta-Pereira, G., & Iruela-Arispe, M. L. (1989). Extracellular matrix: Functional significance of oxytalan, elaunin and elastic fibers. *Progress in Clinical and Biological Research*, *295*, 101–107.
25. Cowan, P. M., McGAVIN, S., & North, A. C. T. (1955). The Polypeptide Chain Configuration of Collagen. *Nature*, *176*(4492), Article 4492. <https://doi.org/10.1038/1761062a0>
26. D’Andrea, C. R., Alfraihat, A., Singh, A., Anari, J. B., Cahill, P. J., Schaer, T., Snyder, B. D., Elliott, D., & Balasubramanian, S. (2021). Part 2. Review and meta-analysis of studies on modulation of longitudinal bone growth and growth plate activity: A micro-scale perspective. *Journal of Orthopaedic Research*, *39*(5), 919–928. <https://doi.org/10.1002/jor.24992>
27. Db, K. (1991). Quantitative histological changes in the proximal tibial growth cartilage of aged female rats. *Cells Materials*, *1*, 11–18.
28. Department of Bioengineering, Imperial College London, London, SW7 2AZ, UK, Khatib, N., Parisi, C., & Nowlan, N. (2021). Differential effect of frequency and duration of mechanical loading on fetal chick cartilage and bone development. *European Cells and Materials*, *41*, 531–545. <https://doi.org/10.22203/eCM.v041a34>
29. Dietz, H. C., Loeys, B., Carta, L., & Ramirez, F. (2005). Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *American Journal of*

*Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics, 139C(1), 4–9.*

<https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30068>

30. Dietz, H. C., & Pyeritz, R. E. (1995). Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Human Molecular Genetics, 4 Spec No*, 1799–1809. [https://doi.org/10.1093/hmg/4.suppl\\_1.1799](https://doi.org/10.1093/hmg/4.suppl_1.1799)
31. Dimeglio A. (1994). *L'accrescimento in Ortopedia* (Seconda edizione). ESC.
32. Drvaric, D. M., & Kruger, L. M. (2001). Modified Ertl Osteomyoplasty for Terminal Overgrowth in Childhood Limb Deficiencies. *Journal of Pediatric Orthopaedics, 21(3)*, 392.
33. D'Souza, H., & Shah, N. M. (1999). Circumferential periosteal sleeve resection: Results in limb-length discrepancy secondary to poliomyelitis. *Journal of Pediatric Orthopedics, 19(2)*, 215–221. <https://doi.org/10.1097/00004694-199903000-00016>
34. Eppley, B. L., Doucet, M., Connolly, D. T., & Feder, J. (1988). Enhancement of angiogenesis by bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 46(5)*, 391–398. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(88\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0278-2391(88)90223-6)
35. F. Greco, A. Gigante, C. Chillemi, L. de Palma. (1997). *Skeletal features of the Marfan syndrome: Diagnosis and management*. 878–883.
36. Farnum, C. E., Lee, R., O'Hara, K., & Urban, J. P. G. (2002). Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: The contribution of organic osmolytes. *Bone, 30(4)*, 574–581. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(01\)00710-4](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(01)00710-4)
37. Farquharson, C., Jefferies, D., Seawright, E., & Houston, B. (2001). Regulation of chondrocyte terminal differentiation in the postembryonic growth plate: The role of the PTHrP-Indian hedgehog axis. *Endocrinology, 142(9)*, 4131–4140. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8396>
38. Firth, G. B., Masquijo, J. J., & Kontio, K. (2011). Transtibial Ertl amputation for children and adolescents: A case series and literature review. *Journal of Children's Orthopaedics, 5(5)*, 357–362. <https://doi.org/10.1007/s11832-011-0364-0>

39. Fleish, H., & Neuman, W. F. (1961). Mechanisms of calcification: Role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 200(6), 1296–1300.  
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.200.6.1296>
40. Frantz, C. H., & Aitken, G. T. (1959). Management of the Juvenile Amputee. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 14, 30.
41. Friedman, M., & Strang, L. B. (1966). Effect of long-term corticosteroids and corticotrophin on the growth of children. *Lancet (London, England)*, 2(7463), 569–572.
42. Fullmer, H. M., & Lillie, R. D. (1958). The oxytalan fiber: A previously undescribed connective tissue fiber. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 6(6), 425–430.  
<https://doi.org/10.1177/6.6.425>
43. Galéra, P., Vivien, D., Pronost, S., Bonaventure, J., Rédini, F., Loyau, G., & Pujol, J. P. (1992). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) up-regulation of collagen type II in primary cultures of rabbit articular chondrocytes (RAC) involves increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. *Journal of Cellular Physiology*, 153(3), 596–606.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.1041530322>
44. Garabedian, M., Du Bois, M. B., Corvol, M. T., Pezant, E., & Balsan, S. (1978). Vitamin D and cartilage. I. In vitro metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by cartilage. *Endocrinology*, 102(4), 1262–1268. <https://doi.org/10.1210/endo-102-4-1262>
45. Gardner, E. (1956). CHAPTER XIII - OSTEOGENESIS IN THE HUMAN EMBRYO AND FETUS. In G. H. Bourne (Ed.), *The Biochemistry and Physiology of Bone* (pp. 359–399). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3286-7.50017-8>
46. Ghadially, F. N., & More, I. a. R. (1989). Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix 3rd edition. *Histopathology*, 15(1), 102–102.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1989.tb03049.x>
47. Gigante, A., Chillemi, C., Potter, K. A., Bertoni-Freddari, C., & Greco, F. (1999). Elastic fibers of musculoskeletal tissues in bovine Marfan syndrome: A

- morphometric study. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 17(4), 624–628.  
<https://doi.org/10.1002/jor.1100170424>
48. Gigante, A., Chillemi, C., Quaglino, D., Miselli, M., & Pasquali-Ronchetti, I. (2001). DL-penicillamine induced alteration of elastic fibers of periosteum-perichondrium and associated growth inhibition: An experimental study. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 19(3), 398–404. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(00\)90033-0](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(00)90033-0)
49. Gigante, A., Specchia, N., & Greco, F. (1994). Age-related distribution of elastic fibers in the rabbit knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 308, 33–42.
50. Gigante, A., Specchia, N., Nori, S., & Greco, F. (1996). Distribution of elastic fiber types in the epiphyseal region. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 14(5), 810–817.  
<https://doi.org/10.1002/jor.1100140519>
51. Gigante et al. (n.d.). *Ruolo del Sistema delle Fibre Elastiche nelle diartrosi*.
52. Glimcher, M. J. (1987). The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instructional Course Lectures*, 36, 49–69.
53. Greco, F., de Palma, L., Specchia, N., & Mannarini, M. (1989). Growth-plate cartilage metabolic response to mechanical stress. *Journal of Pediatric Orthopedics*, 9(5), 520–524. <https://doi.org/10.1097/01241398-198909010-00004>
54. Grimsrud, C. D., Romano, P. R., D’Souza, M., Puzas, J. E., Reynolds, P. R., Rosier, R. N., & O’Keefe, R. J. (1999). BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(4), 475–482. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.4.475>
55. Groth, K. A., Stochholm, K., Hove, H., Andersen, N. H., & Gravholt, C. H. (2018). Causes of Mortality in the Marfan Syndrome (from a Nationwide Register Study). *The American Journal of Cardiology*, 122(7), 1231–1235.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2018.06.034>

56. H, I., Y, K., M, I., Y, H., M, S., & F, S. (1989). Stimulation of cartilage-matrix proteoglycan synthesis by morphologically transformed chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Journal of Cellular Physiology*, 138(2). <https://doi.org/10.1002/jcp.1041380216>
57. Havelka, S., Babický, A., Musilová, J., Rohožková, D., & Tesárek, B. (1979). Effect of Osteotropic Hormones on Cartilage Metabolism. *Hormone and Metabolic Research*, 11(1), 83–84. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1095761>
58. Hensinger RN. (1986). *Standards in Pediatric Orthopedics. Tables, Charts, Graphs illustrating growth*. Raven Press.
59. Hill, J. R., Eekhoff, J. D., Brophy, R. H., & Lake, S. P. (2020). Elastic fibers in orthopedics: Form and function in tendons and ligaments, clinical implications, and future directions. *Journal of Orthopaedic Research*, 38(11), 2305–2317. <https://doi.org/10.1002/jor.24695>
60. Hiraki, Y., Inoue, H., Hirai, R., Kato, Y., & Suzuki, F. (1988). Effect of transforming growth factor beta on cell proliferation and glycosaminoglycan synthesis by rabbit growth-plate chondrocytes in culture. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 969(1), 91–99. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(88\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0167-4889(88)90092-4)
61. Houghton, G. R., & Dekel, S. (1979). The periosteal control of long bone growth. An experimental study in the rat. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 50(6 Pt 1), 635–637. <https://doi.org/10.3109/17453677908991285>
62. Hunziker, E. B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microscopy Research and Technique*, 28(6), 505–519. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070280606>
63. Hunziker, E. B., & Schenk, R. K. (1989). Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *The Journal of Physiology*, 414, 55–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017676>
64. Iwasaki, M., Jikko, A., & Le, A. X. (1999). Age-dependent effects of hedgehog protein on chondrocytes. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 81(6), 1076–1082. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.81b6.8851>
65. Iwasaki, M., Le, A. X., & Helms, J. A. (1997). Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis.

- Mechanisms of Development*, 69(1–2), 197–202. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00145-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00145-7)
66. Jahmani, R., Paley, D., Jahmani, R., & Paley, D. (2019). Stump Overgrowth after Limb Amputation in Children. In *Limb Amputation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90532>
67. Jenkins, D. H., Cheng, D. H., & Hodgson, A. R. (1975). Stimulation of bone growth by periosteal stripping. A clinical study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 57(4), 482–484.
68. Kalu, D. N., Hardin, R. H., Cockerham, R., & Yu, B. P. (1984). Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone. *Endocrinology*, 115(4), 1239–1247. <https://doi.org/10.1210/endo-115-4-1239>
69. Karlsson, C., Thornemo, M., Henriksson, H. B., & Lindahl, A. (2009). Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint. *Journal of Anatomy*, 215(3), 355–363. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01115.x>
70. Karp, S. J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., & McMahon, A. P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development (Cambridge, England)*, 127(3), 543–548. <https://doi.org/10.1242/dev.127.3.543>
71. Keene, D. R., Sakai, L. Y., & Burgeson, R. E. (1991). Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: Type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 39(1), 59–69. <https://doi.org/10.1177/39.1.1983874>
72. Kember, N. F. (1973). Aspects of the Maturation Process in Growth Cartilage in the Rat Tibia. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 95, 288.
73. Kielty, C. M. (2006). Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 8(19), 1–23. <https://doi.org/10.1017/S146239940600007X>

74. Kielty, C. M., Baldock, C., Lee, D., Rock, M. J., Ashworth, J. L., & Shuttleworth, C. A. (2002). Fibrillin: From microfibril assembly to biomechanical function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 357(1418), 207–217.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1029>
75. Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Marson, A., & Baldock, C. (2005). Fibrillin microfibrils. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 405–436.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70012-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70012-7)
76. Klagsbrun, M., & Smith, S. (1980). Purification of a cartilage-derived growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 255(22), 10859–10866.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)70386-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)70386-X)
77. Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J. P., & Burger, E. H. (1986). Increased calcification of growth plate cartilage as a result of compressive force in vitro. *Arthritis and Rheumatism*, 29(8), 1002–1009.  
<https://doi.org/10.1002/art.1780290809>
78. Kuhn, J. L., DeLacey, J. H., & Leenellett, E. E. (1996). Relationship between bone growth rate and hypertrophic chondrocyte volume in New Zealand white rabbits of varying ages. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 14(5), 706–711.  
<https://doi.org/10.1002/jor.1100140505>
79. Kuijpers-Jagtman, A. M., Bex, J. H., Maltha, J. C., & Daggars, J. G. (1988). Longitudinal growth of the rabbit femur after vascular and periosteal interference. *Anatomischer Anzeiger*, 167(5), 349–358.
80. Kurtz, A. D., & Hand, R. C. (1939). Bone growth following amputation in childhood. *The American Journal of Surgery*, 43(3), 773–775.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(39\)90639-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(39)90639-2)
81. Lacroix, P. (1951). The Organization of Bones. *Academic Medicine*, 26(6), 493.
82. Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., Abou-Samra, A. B., Jüppner, H., Segre, G. V., & Kronenberg, H. M. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5275), 663–666. <https://doi.org/10.1126/science.273.5275.663>

83. Lerner, A. L., Kuhn, J. L., & Hollister, S. J. (1998). Are regional variations in bone growth related to mechanical stress and strain parameters? *Journal of Biomechanics*, 31(4), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00015-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00015-3)
84. Limpaphayom, N., & Prasongchin, P. (2011). Surgical Technique: Lower Limb-length Equalization by Periosteal Stripping and Periosteal Division. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 469(11), 3181. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-2013-9>
85. Lindahl, A., Isgaard, J., Carlsson, L., & Isaksson, O. G. (1987). Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology*, 121(3), 1061–1069. <https://doi.org/10.1210/endo-121-3-1061>
86. Loeys, B. L., Dietz, H. C., Braverman, A. C., Callewaert, B. L., Backer, J. D., Devereux, R. B., Hilhorst-Hofstee, Y., Jondeau, G., Faivre, L., Milewicz, D. M., Pyeritz, R. E., Sponseller, P. D., Wordsworth, P., & Paepe, A. M. D. (2010). The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 47(7), 476–485. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.072785>
87. Lutfi, A. M. (1974). The role of cartilage in long bone growth: A reappraisal. *Journal of Anatomy*, 117(Pt 2), 413–417.
88. Lynch, M. C., & Taylor, J. F. (1987). Periosteal division and longitudinal growth in the tibia of the rat. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 69(5), 812–816. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.69B5.3680349>
89. Matthiass HH. (1987). Sviluppo, crescita e maturazione dell'apparato di sostegno e di movimento. In *Trattato di Ortopedia* (Seconda edizione, Vol. 1). Piccin.
90. McLain, J. B., & Vig, P. S. (1983). Transverse periosteal sectioning and femur growth in the rat. *The Anatomical Record*, 207(2), 339–348. <https://doi.org/10.1002/ar.1092070213>
91. Mehlman, C. T., Araghi, A., & Roy, D. R. (1997). Hyphenated history: The Hueter-Volkmann law. *American Journal of Orthopedics (Belle Mead, N.J.)*, 26(11), 798–800.

92. Miao, D., He, B., Karaplis, A. C., & Goltzman, D. (2002). Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*(9), 1173–1182. <https://doi.org/10.1172/JCI14817>
93. Michels, F., & De Smet, L. (2001). Osseous overgrowth in congenital amputations of the upper limb: Report of 3 cases treated with autologous stump plasty. *Acta Orthopaedica Belgica*, *67*(5), 452–455.
94. Montes, G. S. (1996). Structural Biology of the Fibres of the Collagenous and Elastic Systems. *Cell Biology International*, *20*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0004>
95. Nenda, M. M., Lewicki, M., & Mandalunis, P. M. (2016). Histomorphometry of the tibia and mandible of healthy female Wistar rats at different stages of growth. *Experimental Animals*, *65*(2), 109–116. <https://doi.org/10.1538/expanim.15-0069>
96. Nilsson, A., Lindahl, A., Edén, S., & Isaksson, O. G. (1989). Demonstration of growth hormone receptors in cultured rat epiphyseal chondrocytes by specific binding of growth hormone and immunohistochemistry. *The Journal of Endocrinology*, *122*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1220069>
97. Nistala, H., Lee-Arteaga, S., Smaldone, S., Siciliano, G., Carta, L., Ono, R. N., Sengle, G., Arteaga-Solis, E., Levasseur, R., Ducy, P., Sakai, L. Y., Karsenty, G., & Ramirez, F. (2010). Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- $\beta$  and BMP bioavailability during bone formation. *The Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1107–1121. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003089>
98. Ogawa, T., Yamagiwa, H., Hayami, T., Liu, Z., Huang, K.-Y., Tokunaga, K., Murai, T., & Endo, N. (2002). Human PTH (1-34) induces longitudinal bone growth in rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *20*(2), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s007740200011>
99. O’Keefe, R. J., Puzas, J. E., Brand, J. S., & Rosier, R. N. (1988). Effects of transforming growth factor-beta on matrix synthesis by chick growth plate chondrocytes. *Endocrinology*, *122*(6), 2953–2961. <https://doi.org/10.1210/endo-122-6-2953>
100. O’Neal, M. L., Bahner, R., Ganey, T. M., & Ogden, J. A. (1996). Osseous overgrowth after amputation in adolescents and children. *Journal of*

- Pediatric Orthopedics*, 16(1), 78–84. <https://doi.org/10.1097/00004694-199601000-00016>
101. O’Rahilly, R., Gardner, E., & Gray, D. J. (1956). The Ectodermal Thickening and Ridge in the Limbs of Staged Human Embryos1. *Development*, 4(3), 254–264. <https://doi.org/10.1242/dev.4.3.254>
102. Pasquali-Ronchetti, I., & Baccarani-Contri, M. (1997). Elastic fiber during development and aging. *Microscopy Research and Technique*, 38(4), 428–435. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970815\)38:4<428::AID-JEMT10>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970815)38:4<428::AID-JEMT10>3.0.CO;2-L)
103. Pasquali-Ronchetti, I., Fornieri, C., Baccarani-Contri, M., & Quaglino, D. (1995). Ultrastructure of elastin. *Ciba Foundation Symposium*, 192, 31–42; discussion 42-50.
104. Pauling, L., & Corey, R. B. (1951). The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gelatin Group. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(5), 272–281.
105. Pedrozo, H. A., Schwartz, Z., Gomez, R., Ornoy, A., Xin-Sheng, W., Dallas, S. L., Bonewald, L. F., Dean, D. D., & Boyan, B. D. (1998). Growth plate chondrocytes store latent transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 in their matrix through latent TGF- $\beta$ 1 binding protein-1. *Journal of Cellular Physiology*, 177(2), 343–354. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199811\)177:2<343::AID-JCP16>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199811)177:2<343::AID-JCP16>3.0.CO;2-A)
106. Pellicore, R. J., Sciora, J., Lambert, C. N., & Hamilton, R. C. (1974). Incidence of bone overgrowth in the juvenile amputee population. *Interclin Inform Bull*, 13, 1–8.
107. Pfeil, J., Marquardt, E., Holtz, T., Niethard, F. U., Schneider, E., & Carstens, C. (1991). The stump capping procedure to prevent or treat terminal osseous overgrowth. *Prosthetics and Orthotics International*, 15(2), 96–99. <https://doi.org/10.3109/03093649109164641>
108. Ramachandran, G. N., & Kartha, G. (1954). Structure of collagen. *Nature*, 174(4423), 269–270. <https://doi.org/10.1038/174269c0>
109. Ramachandran, G. N., & Kartha, G. (1955). Structure of collagen. *Nature*, 176(4482), 593–595. <https://doi.org/10.1038/176593a0>

110. Ramirez, F., Caescu, C., Wondimu, E., & Galatioto, J. (2018). Marfan syndrome; a connective tissue disease at the crossroads of mechanotransduction, TGF $\beta$  signaling and cell stemness. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, 71–72, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.07.004>
111. Ranvier, L. (1873). Quelques faits relatifs au developpement du tissu osseux. *Comptes Rend Acad Sci*, 77, 1105–1109. Scopus.
112. Reppe, S., Rian, E., Jemtland, R., Olstad, O. K., Gautvik, V. T., & Gautvik, K. M. (2000). Sox-4 messenger RNA is expressed in the embryonic growth plate and regulated via the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 15(12), 2402–2412. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.12.2402>
113. Rich, A., & Crick, F. H. (1955). The structure of collagen. *Nature*, 176(4489), 915–916. <https://doi.org/10.1038/176915a0>
114. Rich, A., & Crick, F. H. (1961). The molecular structure of collagen. *Journal of Molecular Biology*, 3, 483–506. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80016-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80016-8)
115. Roach, H. I., Mehta, G., Oreffo, R. O. C., Clarke, N. M. P., & Cooper, C. (2003). Temporal Analysis of Rat Growth Plates: Cessation of Growth with Age Despite Presence of a Physis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(3), 373–383. <https://doi.org/10.1177/002215540305100312>
116. Robertson, W. W. (1990). Newest knowledge of the growth plate. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 253, 270–278.
117. Robinson, D., Hasharoni, A., Cohen, N., Yayon, A., Moskowitz, R. M., & Nevo, Z. (1999). Fibroblast growth factor receptor-3 as a marker for precartilaginous stem cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 367 Suppl, S163-175. <https://doi.org/10.1097/00003086-199910001-00018>
118. Robling, A. G., Duijvelaar, K. M., Gevers, J. V., Ohashi, N., & Turner, C. H. (2001). Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone*, 29(2), 105–113. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00488-4](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00488-4)

119. Rodríguez, J. I., Delgado, E., & Paniagua, R. (1985). Changes in young rat radius following excision of the perichondrial ring. *Calcified Tissue International*, 37(6), 677–683. <https://doi.org/10.1007/BF02554930>
120. Rosier, R. N., O’Keefe, R. J., Crabb, I. D., & Puzas, J. E. (1989). Transforming growth factor beta: An autocrine regulator of chondrocytes. *Connective Tissue Research*, 20(1–4), 295–301. <https://doi.org/10.3109/03008208909023900>
121. ROSS, R. (1973). THE ELASTIC FIBER A REVIEW. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 21(3), 199–208. <https://doi.org/10.1177/21.3.199>
122. Saal, F. V. (1939). EPIPHYSIODESIS COMBINED WITH AMPUTATION. *JBJS*, 21(2), 442.
123. Sergerie, K., Lacoursière, M.-O., Lévesque, M., & Villemure, I. (2009). Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. *Journal of Biomechanics*, 42(4), 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.11.026>
124. Sergerie, K., Parent, S., Beauchemin, P.-F., Londoño, I., Moldovan, F., & Villemure, I. (2011). Growth plate explants respond differently to in vitro static and dynamic loadings. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(4), 473–480. <https://doi.org/10.1002/jor.21282>
125. Serra, R., Karaplis, A., & Sohn, P. (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 783–794. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.783>
126. Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bentz, H., Rosen, D. M., McPherson, J. M., Conti, A., Siegel, N. R., Galluppi, G. R., & Piez, K. A. (1986). Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *Journal of Biological Chemistry*, 261(13), 5693–5695. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38436-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38436-3)
127. Shapiro, F., Holtrop, M. E., & Glimcher, M. J. (1977). Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier: A

- morphological study in rabbits. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 59(6), 703–723.
128. Silberberg, M. S., & Silberberg, R. (1971). *Skeletal growth and ageing*. Ciba-Geigy.
129. Silberberg, M., & Silberberg, R. (1956). CHAPTER XX - STEROID HORMONES AND BONE<sup>11</sup>From the Department of Pathology, Washington University, School of Medicine, St. Louis, and the Snodgras Laboratory, Hospital Division, City of St. Louis, Missouri, U.S.A.<sup>22</sup>The preparation of this chapter was aided by Research Grant PHS A-22 from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases of the National Institutes of Health, Public Health Service. In G. H. Bourne (Ed.), *The Biochemistry and Physiology of Bone* (pp. 623–670). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3286-7.50024-5>
130. Speer, D. P. (1981). The pathogenesis of amputation stump overgrowth. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 159, 294–307.
131. Speer, D. P. (1982). Collagenous architecture of the growth plate and perichondrial ossification groove. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 64(3), 399–407.
132. Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1989). Transforming Growth Factor— $\beta$ : Multiple Actions and Potential Clinical Applications. *JAMA*, 262(7), 938–941. <https://doi.org/10.1001/jama.1989.03430070086036>
133. Stokes, I. A. F., Aronsson, D. D., Dimock, A. N., Cortright, V., & Beck, S. (2006). ENDOCHONDRAL GROWTH IN GROWTH PLATES OF THREE SPECIES AT TWO ANATOMICAL LOCATIONS MODULATED BY MECHANICAL COMPRESSION AND TENSION. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 24(6), 1327–1334. <https://doi.org/10.1002/jor.20189>
134. Streeter, G. L. (1949). Developmental horizons in human embryos; a review of the histogenesis of cartilage and bone. *Contributions to Embryology*, 33(213–221), 149–168.
135. Strocchi, R., de Pasquale, V., Gubellini, P., Facchini, A., Marcacci, M., Buda, R., Zaffagnini, S., & Ruggeri, A. (1992). The human anterior cruciate

- ligament: Histological and ultrastructural observations. *Journal of Anatomy*, 180 (Pt 3)(Pt 3), 515–519.
136. Tanner JM. (1981). *Auxologia. Dal feto all'uomo: La crescita fisica dal concepimento alla maturità*. Tipografica Torinese.
137. Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N. (1990). *Valutazione della maturazione scheletrica e predizione dell'età adulta*. Martinucci Pubblicazioni Mediche.
138. Tenholder, M., Davids, J. R., Gruber, H. E., & Blackhurst, D. W. (2004). Surgical management of juvenile amputation overgrowth with a synthetic cap. *Journal of Pediatric Orthopedics*, 24(2), 218–226.  
<https://doi.org/10.1097/00004694-200403000-00016>
139. Terkeltaub, R., Lotz, M., Johnson, K., Deng, D., Hashimoto, S., Goldring, M. B., Burton, D., & Deftos, L. J. (1998). Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritic cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis and Rheumatism*, 41(12), 2152–2164. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199812\)41:12<2152::AID-ART10>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199812)41:12<2152::AID-ART10>3.0.CO;2-X)
140. Trippel, S. B. (1995). Growth factor actions on articular cartilage. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 43, 129–132.
141. Trippel, S. B., Van Wyk, J. J., & Mankin, H. J. (1986). Localization of somatomedin-C binding to bovine growth-plate chondrocytes in situ. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 68(6), 897–903.
142. Trueta, J., & Morgan, J. D. (1960). The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 42-B, 97–109. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.42B1.97>
143. Twal, W. O., Vasilatos-Younken, R., Gay, C. V., & Leach, R. M. (1994). Isolation and localization of basic fibroblast growth factor-immunoreactive substance in the epiphyseal growth plate. *Journal of Bone and Mineral*

- Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 9(11), 1737–1744. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650091110>
144. Ueki, M., Tanaka, N., Tanimoto, K., Nishio, C., Honda, K., Lin, Y.-Y., Tanne, Y., Ohkuma, S., Kamiya, T., Tanaka, E., & Tanne, K. (2008). The Effect of Mechanical Loading on the Metabolism of Growth Plate Chondrocytes. *Annals of Biomedical Engineering*, 36(5), 793–800. <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9462-7>
145. Urist et al. (n.d.). *Experimental Delivery Systems for Bone Morphogenetic Protein*.
146. Urist, M. R., Huo, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M., & DeLange, R. J. (1984). Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(2), 371–375. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.2.371>
147. Valteau, B., Grimard, G., Londono, I., Moldovan, F., & Villemure, I. (2011). In vivo dynamic bone growth modulation is less detrimental but as effective as static growth modulation. *Bone*, 49(5), 996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.008>
148. Van Bechem, F. S. (1958). Cardiovascular disease in arachnodactyly. *Acta Medica Scandinavica*, 161(3), 197–205.
149. van Beuningen, H. M., van der Kraan, P. M., Arntz, O. J., & van den Berg, W. B. (1993). Protection from interleukin 1 induced destruction of articular cartilage by transforming growth factor beta: Studies in anatomically intact cartilage in vitro and in vivo. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 52(3), 185–191. <https://doi.org/10.1136/ard.52.3.185>
150. van der Eerden, B. C., Karperien, M., Gevers, E. F., Löwik, C. W., & Wit, J. M. (2000). Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: Evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 15(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.6.1045>

151. van der Kraan, P. M., Vitters, E. L., & van den Berg, W. B. (1992). Inhibition of proteoglycan synthesis by transforming growth factor beta in anatomically intact articular cartilage of murine patellae. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *51*(5), 643–647. <https://doi.org/10.1136/ard.51.5.643>
152. van Kampen, G. P., Veldhuijzen, J. P., Kuijer, R., van de Stadt, R. J., & Schipper, C. A. (1985). Cartilage response to mechanical force in high-density chondrocyte cultures. *Arthritis and Rheumatism*, *28*(4), 419–424. <https://doi.org/10.1002/art.1780280410>
153. van Karnebeek, C. D., Naeff, M. S., Mulder, B. J., Hennekam, R. C., & Offringa, M. (2001). Natural history of cardiovascular manifestations in Marfan syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, *84*(2), 129–137. <https://doi.org/10.1136/adc.84.2.129>
154. Van Wyk, J. J., Russell, W. E., & Li, C. H. (1984). Synthetic somatomedin C: Comparison with natural hormone isolated from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(3), 740–742.
155. Villemure, I., Cloutier, L., Matyas, J. R., & Duncan, N. A. (2007). Non-uniform strain distribution within rat cartilaginous growth plate under uniaxial compression. *Journal of Biomechanics*, *40*(1), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.11.008>
156. Villemure, I., & Stokes, I. A. F. (2009). Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *Journal of Biomechanics*, *42*(12), 1793–1803. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.05.021>
157. Vocke, A. K., & Schmid, A. (2000). Osseous overgrowth after post-traumatic amputation of the lower extremity in childhood. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, *120*(7–8), 452–454. <https://doi.org/10.1007/s004029900128>
158. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., & Tabin, C. J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science (New York, N.Y.)*, *273*(5275), 613–622. <https://doi.org/10.1126/science.273.5275.613>

159. Walker, K. V., & Kember, N. F. (1972). Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. II. Measurements during ageing. *Cell and Tissue Kinetics*, 5(5), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1972.tb00379.x>
160. Wang, X., & Mao, J. J. (2002). Accelerated Chondrogenesis of the Rabbit Cranial Base Growth Plate by Oscillatory Mechanical Stimuli. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(10), 1843–1850. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.10.1843>
161. Warrell, E., & Taylor, J. F. (1979). The role of periosteal tension in the growth of long bones. *Journal of Anatomy*, 128(Pt 1), 179–184.
162. Wilsman, N. J., Farnum, C. E., Leiferman, E. M., Fry, M., & Barreto, C. (1996). Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 14(6), 927–936. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140613>
163. Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., & Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4885), 1528–1534. <https://doi.org/10.1126/science.3201241>
164. Yuan, S.-M., Ma, H.-H., Zhang, R.-S., & Jing, H. (2011). Transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway in Marfan's syndrome: A preliminary histopathological study. *VASA. Zeitschrift Fur Gefasskrankheiten*, 40(5), 369–374. <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000133>
165. Zeigler, S., Sloan, B., & Jones, J. A. (2021). The Pathophysiology and Pathogenesis of Marfan Syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1348, 185–206. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9_8)