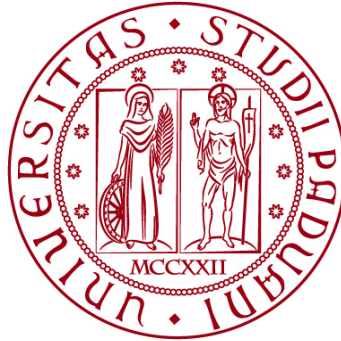


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**CELLULE STAMINALI DEL CUSCINETTO ADIPOSO
INFRAPATELLARE E MICROAMBIENTE
NELL'OSTEOARTRITE**

**Tutor: Prof.ssa Silvia Barbon
Dipartimento di Neuroscienze**

**Co-tutor: Prof.ssa Elena Stocco
Dipartimento di Neuroscienze**

Laureanda: Beatrice Salgarella

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

1 SOMMARIO

| | |
|--|----|
| ABSTRACT..... | 1 |
| 1 INTRODUZIONE..... | 2 |
| 1.1 Osteoartrite: la patologia, sintomi e cause..... | 2 |
| 1.2 Infrapatellar Fat Pad (IFP): | 2 |
| caratteristiche morfologiche e le interazioni con i tessuti articolari | 2 |
| 1.3 Cellule staminali mesenchimali nella terapia contro l'osteoartrite. | 4 |
| 1.4 Ambiente infiammatorio dell'osteoartrite..... | 5 |
| 2 MATERIALI E METODI..... | 6 |
| 2.1 Isolamento delle cellule staminali adipose | 6 |
| 2.2 Population Doubling Level (PDL) | 6 |
| 2.3 Saggio MTT per il calcolo dell'attività metabolica | 7 |
| 2.4 Osservazione morfologica al microscopio elettronico a trasmissione | 7 |
| 2.5 Real Time PCR (RT-qPCR)..... | 7 |
| 2.6 Citofluorimetria (FCM) | 8 |
| 2.7 risposta al microambiente e agli stimoli meccanici..... | 8 |
| 3 RISULTATI..... | 9 |
| 3.1 Isolamento della popolazione cellulare e morfologia in coltura | 9 |
| 3.2 Proliferazione e attività metabolica..... | 9 |
| 3.3 Morfologia e marker relativi allo stress metabolico..... | 10 |
| 3.4 Valutazione della multipotenza | 11 |
| 3.5 Valutazione del potenziale differenziativo e della risposta agli stimoli ambientali | 12 |
| 4 DISCUSSIONE..... | 14 |
| 5 Bibliografia | 17 |

ABSTRACT

Studi recenti hanno individuato nel cuscinetto adiposo infrapatellare (IFP) una popolazione di cellule staminali che, attraverso strategie di medicina rigenerativa/ingegneria tissutale, sembra possa ricoprire un ruolo importante nella rigenerazione del tessuto cartilagineo nell'eventualità di osteoartrite (OA). Tuttavia, condizioni di stress come quelle legate all'OA, potrebbero innescare una riprogrammazione della componente staminale stessa, compromettendone l'adeguatezza d'impiego. Nel contesto dello scenario descritto, lo scopo di questo studio è stato quello di isolare e caratterizzare, sia morfologicamente che funzionalmente, una popolazione di cellule staminali da OA-IFP. Specificatamente, n=9 pazienti con OA, arruolati per un intervento di protesi totale di ginocchio, hanno costituito la coorte dello studio. Dopo isolamento, le cellule da OA-IFP sono state caratterizzate per morfologia/staminalità/profilo metabolico/potenziale multi-differenziativo mediante microscopia elettronica a trasmissione/analisi citofluorimetrica/studio dell'espressione genica. Le cellule hanno mostrato una morfologia allungata, un elevato potenziale di auto-rinnovamento e reattività al microambiente (CD44, CD105, VEGFR2, FGFR2, IL1R, and IL6R), un alto grado di staminalità (STAT3, NOTCH1, c-Myc, OCT-4, KLF4, and NANOG) e peculiari proprietà immunofenotipiche (CD73⁺/CD39⁺/CD90⁺/CD105⁺/CD44^{-/+}/CD45⁻) mostrando dunque l'espressione di marker indicativi di una possibile riprogrammazione indotta dall'ambiente infiammatorio.

1 INTRODUZIONE

1.1 OSTEOARTRITE: LA PATOLOGIA, SINTOMI E CAUSE

L'osteoartrite (OA) è una patologia degenerativa cronica che colpisce le articolazioni e si caratterizza per la presenza di un ambiente infiammatorio che si contraddistingue per segni clinici quali lo swelling, la rigidità, ed il dolore. Ad oggi, c'è consenso nell'affermare che l'OA non è una patologia della cartilagine bensì dell'intera articolazione. Nel tempo, la conseguenza finale dell'OA è la degenerazione completa del tessuto cartilagineo. Tipicamente, l'OA è più diffusa tra le persone anziane, con una comparsa più precoce tra le donne rispetto agli uomini. Inoltre, la manifestazione clinica è molto soggettiva sia a livello di sintomi, che a livello di target (www.niams.nih.gov/health-topics/osteoarthritis). Non si conoscono ancora bene le cause che scatenano l'infiammazione articolare, ma si suppone che alla base di questa malattia ci siano condizioni quali l'invecchiamento, l'obesità, la familiarità per la patologia ed il sovraccarico delle articolazioni.

Come viene presentato nell'articolo di Stocco et al. (2019), al momento non esiste ancora una cura efficace volta a rallentare la progressione della malattia. Purtroppo, l'unica strategia risolutiva rimane l'impianto di protesi che vadano a sostituire l'articolazione danneggiata. In tale contesto, discipline come la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale propongono la possibilità di promuovere la rigenerazione del tessuto cartilagineo compromesso, rallentando la progressione del danno associato alla patologia stessa. Tale obiettivo può essere raggiunto tramite l'impianto di cellule autologhe (staminali o differenziate) in presenza o meno di una struttura di supporto detta scaffold. Recentemente, il cuscinetto adiposo infrapatellare (IFP), un tessuto intracapsulare ed extrasinoviale dell'articolazione del ginocchio, è stato rivalutato come un potenziale candidato per l'isolamento di cellule staminali adipose (autologhe) potenzialmente utili nella gestione dell'OA, tramite gli approcci d'avanguardia descritti.

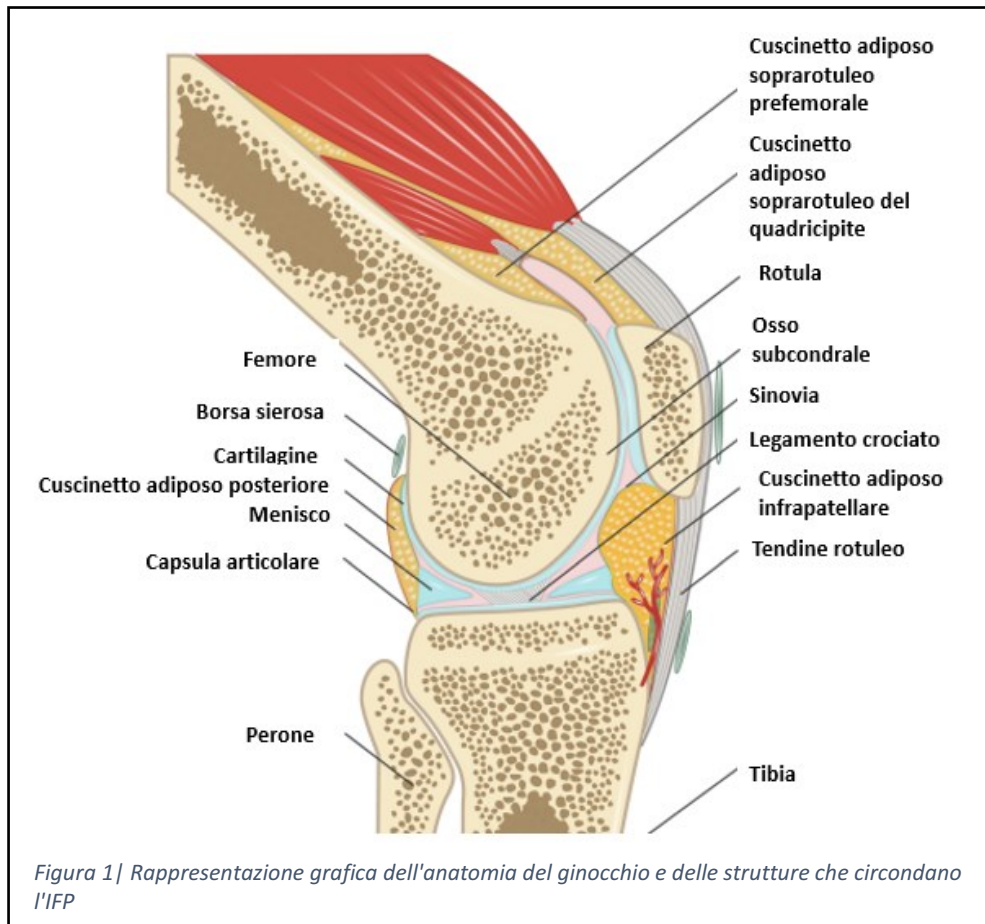
L'obiettivo del lavoro illustrato nell'articolo è l'isolamento e la caratterizzazione delle cellule staminali adipose da OA-IFP di pazienti sottoposti a protesi totale di ginocchio per verificarne il potenziale applicativo volto al rallentamento dell'OA e al controllo della sintomatologia dolorosa associata.

1.2 INFRAPATELLAR FAT PAD (IFP):

CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E LE INTERAZIONI CON I TESSUTI ARTICOLARI

Il cuscinetto adiposo infrapatellare (IFP), anche chiamato *Corpo di Hoffa*, è una struttura intracapsulare ed extrasinoviale che si trova nell'articolazione del ginocchio; la sua funzione è quella di *shock-absorber*, essendo attivamente coinvolto nella distribuzione dei carichi e con un ruolo importante anche nella riduzione della frizione tra le strutture ossee (rotula, tibia, femore) e i tendini rotulei. Topograficamente, l'IFP, è localizzato nella parte anteriore del compartimento dell'articolazione del ginocchio ed è delimitato dal polo inferiore della rotula, il retinacolo rotuleo, il tendine, la parte anteriore della tibia, le corna anteriori dei

menischi e i condili femorali. Inoltre, è legato alla fossa intercondiloidea del femore attraverso la plica infrapatellare, chiamata anche ligamento mucoso. La vascolarizzazione dell'IFP discende dalle arteriole originate dalle arterie genicolate ed è innervato da piccoli rami del nervo tibiale (Draghi et al., 2016) (Figura 1).



In relazione all'anatomia microscopica del tessuto, l'IFP si caratterizza per la presenza di sottili strutture fibrose, dette setti, che si approfondano nel tessuto formando dei lobuli adiposi. Il tipo cellulare prevalente è costituito da adipociti, disposti all'interno dei lobuli (Figura 2).

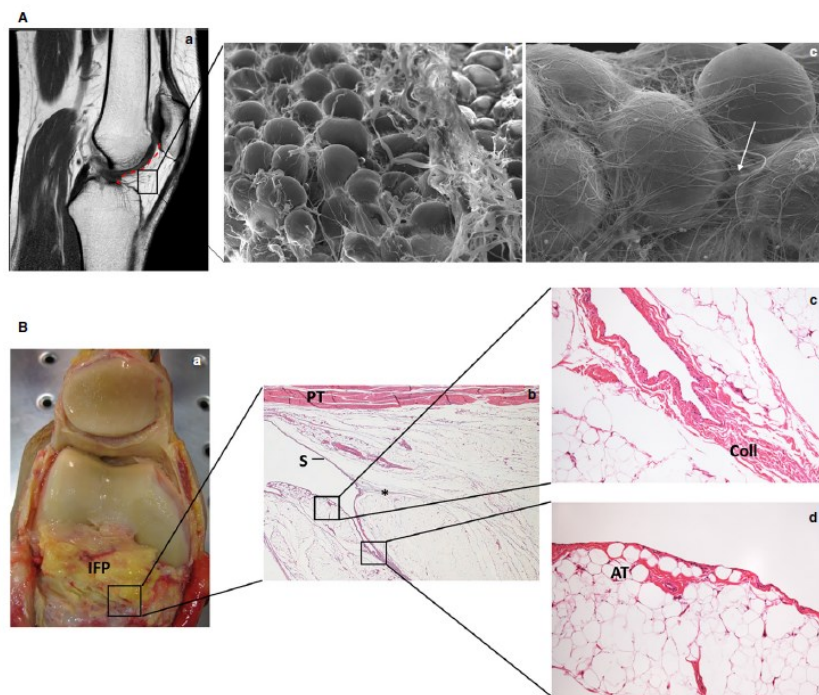


Figura 2|Caratterizzazione microscopica del cuscinetto adiposo infrapatellare (IFP) ed evidenza anatomica dell'interazione con la membrana sinoviale. (Aa) Sezione sagittale del ginocchio in risonanza magnetica che mostra la localizzazione dell'IFP ed evidenzia la relazione con la membrana sinoviale (rosso linea tratteggiata). (Ab,c) Ultrastruttura dell'IFP dove si riconoscono gli adipociti e la presenza di fibre collagene a formare un basket attorno ad esse. (B) Dissezione del ginocchio in flessione che mostra una stretta relazione tra la membrana sinoviale e la superficie profonda dell'IFP (a). Le immagini microscopiche mostrano il decorso della membrana sinoviale (S) e la sua interazione con l'IFP. Lo strato sottosinoviale è caratterizzato da collagene (Coll) (c) e del tessuto adiposo (AT) (d). Tendine rotuleo (PT).

1.3 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NELLA TERAPIA CONTRO L'OSTEOARTRITE.

Le strategie terapeutiche attuali per la gestione clinica del paziente con OA prevedono tipicamente la somministrazione di farmaci antiinfiammatori, antidolorifici fino alle infiltrazioni di acido ialuronico. Tuttavia, tali approcci hanno la semplice funzione di controllare la sintomatologia dolorosa ma non consentono un recupero dell'integrità del tessuto. Inoltre, con il tempo, la cronicità della patologia, unitamente alle sollecitazioni meccaniche a cui l'articolazione stessa è esposta (carico del peso), portano ad una progressiva e severa degenerazione del tessuto tanto che l'impianto della protesi diventa l'unica opzione possibile e risolutiva.

Diversi studi nel corso degli anni hanno spinto verso l'identificazione di nuovi approcci capaci di rallentare in modo significativo la progressione del processo degenerativo. Tra questi si distingue l'ingegneria tissutale. L'ingegneria tissutale è una disciplina complessa la quale, attraverso l'impiego di tre elementi chiave

(scaffold, cellule, fattori di crescita) ha come scopo la completa ricostruzione della struttura danneggiata e il ripristino delle sue normali funzioni fisiologiche.

I condrociti articolari sono stati ampiamente utilizzati in passato per innescare la rigenerazione della cartilagine articolare danneggiata. Campioni di cartilagine ialina, prelevati attraverso artroscopia da punti di non carico dell'articolazione, possono essere processati attraverso digestione enzimatica ai fini dell'ottenimento di un pool cellulare che, dopo espansione, può essere: 1) inoculato come tale nel sito del danno (*Autologous Chondrocytes Implantation* – ACI); 2) seminato su una matrice di acido ialuronico che viene quindi ad essere posizionata sul difetto (*Matrix Assisted Chondrocytes Implantation* – MACI). Tuttavia, oltre a difficoltà di carattere tecnico legato alle fasi di isolamento, espansione, caratterizzazione, l'impiego di condrociti articolari risente della natura stessa delle cellule in oggetto le quali, in virtù del loro stato già differenziato, non possono essere mantenute in coltura per un lungo periodo senza incorrere in fenomeni quali la perdita dell'immunofenotipo specifico e la senescenza. Per superare tali limiti, l'attenzione è stata volta verso le cellule staminali mesenchimali.

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono cellule non immunogeniche, indifferenziate, caratterizzate da un elevato potenziale replicativo ed un'alta capacità di differenziamento, influenzata dal tipo di stimolo a cui sono esposte. Specificatamente, possono differenziare nelle linee cellulari del mesoderma, come per esempio osteoblasti, adipociti, cellule muscolari scheletriche e cardiache, condrociti. Le MSCs risiedono soprattutto nel midollo osseo, ma sono state anche isolate a partire da tessuto adiposo, dal fegato e da tessuti fetali. Fisiologicamente, in risposta a specifici stimoli, si spostano dalle nicchie di appartenenza per raggiungere il tessuto bersaglio dove incorrono in un processo di differenziamento utile a rinnovare o sostituire le cellule danneggiate.

In virtù di queste caratteristiche (potenziale replicativo e differenziativo elevati), è verosimile che da una piccola frazione di tali cellule sia possibile ottenerne un pool con numerosità adatta all'impianto in vivo, in presenza o meno di una matrice di supporto.

Tra i diversi tessuti utili all'isolamento di MSCs, il tessuto adiposo è di particolare interesse, soprattutto per la facilità di accesso ad esso (liposuzione) rispetto, ad esempio, all'isolamento da midollo osseo (Zhu et al., 2020). In realtà, oggi, la comunità scientifica sta volgendo il proprio interesse verso un tessuto adiposo di “scarto” il quale, negli interventi di protesizzazione è comunemente rimosso: l'IFP. È possibile utilizzare l'IFP come fonte di MSCs per il trattamento di lesioni OA-correlate associate ad articolazioni diverse da quella bersaglio (Zhong et al., 2020)

1.4 AMBIENTE INFIAMMATORIO DELL'OSTEOARTRITE

L'OA è una malattia dinamica che progredisce col passare del tempo e riguarda più distretti anatomici dal momento che interessa le articolazioni, sede d'incontro di ossa, legamenti e cartilagini. L'ambiente infiammatorio che si viene a creare è la diretta conseguenza dello squilibrio tra riparazione e degradazione della cartilagine.

È stato osservato come l'evento scatenante del pathway infiammatorio dell'OA possa essere ad esempio il danno recato alla matrice cartilaginea, in particolare alle fibrille di collagene e ai proteoglicani che inducono l'attivazione di meccanismi recettoriali presenti sulle superfici dei condrociti che, a loro volta, innescano il pathway di segnalazione intracellulare di NF-κB. NF-κB è un fattore di trascrizione che se attivato è responsabile dell'espressione di geni che codificano per la produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-1β, IL-6 e TNFα. In particolare, IL-1β è presente ad alti livelli di espressione durante la progressione dell'OA inibendo l'espressione dei componenti della matrice extracellulare cartilaginea. Anche TNF-α gioca un ruolo importante nello sviluppo dell'ambiente infiammatorio dal momento che è in grado di sopprimere l'espressione dei proteoglicani della matrice extracellulare e favorire la produzione di ulteriori molecole pro-infiammatorie che, come un circolo vizioso, contribuiranno a loro volta all'ulteriore danneggiamento della cartilagine. (Zhu et al., 2020)

2 MATERIALI E METODI

2.1 ISOLAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI ADIPOSE

Lo studio di cui tratta l'articolo è stato condotto su un campione di nove pazienti, arruolati per intervento di protesi totale al ginocchio, la coorte era costituita da 6 donne e 3 uomini di età media pari a 73 anni.

Dopo dissezione dell'IFP, i campioni sono stati trasferiti in laboratorio e accuratamente disinfettati mediante lavaggi con una soluzione al 2% di antibiotico/antimicotico (A/A) in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS); quindi, dopo rimozione della membrana sinoviale, i campioni sono stati processati secondo un protocollo che ne ha previsto la digestione enzimatica in un medium costituito da DMEM high-glucose, 1% collagenasi B e 1% A/A (37°C/ overnight). La sospensione cellulare è stata quindi filtrata attraverso cell-strainer (40 μm) e centrifugata, prima di essere risospesa in medium proliferativo e seminata su piastra per l'espansione.

2.2 POPULATION DOUBLING LEVEL (PDL)

Il tasso di proliferazione delle OA-IFPsc è stato verificato attraverso la valutazione del Population Doubling Level (PDL), un'analisi che si basa sulla conta cellulare ad intervalli regolari per determinare il numero di raddoppiamenti che avvengono ad ogni passaggio. Specificatamente, in questo studio, le cellule sono state considerate dalla generazione 8 alla generazione 20. Brevemente, dopo la semina delle OA-IFPsc su piastra multiwell da 6 pozzetti (densità di semina di 5×10^3 cellule/cm²), ad intervalli di 24 ore le cellule sono state staccate e contate. Quindi, il PDL è stato calcolato come sommatoria dei raddoppiamenti (PD, population doublings) calcolati ad ogni passaggio secondo l'equazione:

$$PD = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$$

dove N_t è il numero di celle contate al tempo considerato, e N_0 è il numero di cellule seminate a $t = 0$.

2.3 SAGGIO MTT PER IL CALCOLO DELL'ATTIVITÀ METABOLICA

L'attività metabolica delle OA-IFPsc è stata valutata mediante saggio colorimetrico con (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide) (MTT).

Il saggio MTT sfrutta l'attività metabolica delle cellule come misura della loro vitalità. Il sale di tetrazolo, giallo, viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali di cellule vitali a cristalli viola di formazano, insolubili. I cristalli possono essere estratti mediante l'impiego del solvente organico propan-2-olo acido (0,04 M HCl in propan-2-olo) e successivamente analizzati allo spettrofotometro con lettura dell'assorbanza a 570nm. Più la soluzione è scura, maggiore sarà l'attività metabolica. Inoltre, previo allestimento di una retta di taratura, sarà possibile correlare il valore di assorbanza al numero di cellule e pertanto alla vitalità cellulare stessa.

Il risultato ottenuto è la media di tre prove indipendenti

2.4 OSSERVAZIONE MORFOLOGICA AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE

Dopo caratterizzazione al microscopio ottico delle OA-IFPsc, l'ultrastruttura è stata indagata mediante microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

Le cellule coltivate su vetrino coprioggetto, raggiunta una confluenza di circa 40-45%, sono state fissate con glutaraldeide al 2,5% in 0,1 M tampone fosfato e quindi post-fissate con tetrossido di osmio all'1% in tampone fosfato 0,1M. Dopo disidratazione in scala ascendente di alcoli, i campioni sono stati inclusi in resina epossidica e trattati secondo protocolli di routine prima dell'osservazione al microscopio TEM Hitachi H-300.

2.5 REAL TIME PCR (RT-qPCR)

In questo studio l'espressione di specifici marcatori genetici nelle OA-IFPsc è stata indagata tramite la tecnica della RT-qPCR (*Quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction*). Questa tecnica prevede innanzitutto l'ottenimento del DNA complementare (cDNA) mediante la trascrizione inversa dell'RNA messaggero del campione. In seguito, i frammenti di cDNA vengono amplificati esponenzialmente sfruttando l'appaiamento complementare tra i primer specifici per la sequenza target e il filamento *single-strand* del cDNA stesso. La quantità dei prodotti di PCR viene rilevata mediante metodi ottici. In questo caso specifico sono stati analizzati i livelli di espressione di geni quali: a) *TERT*, *REX1*, *NOTCH1*, *NANOG*, *c-Myc*, *OCT-4* e *KLF4*, associati a caratteristiche di staminalità (i.e., autorinnovamento e pluripotenza); b) *CD38* e Calreticulina (*CALR*), legati al metabolismo cellulare; c) *COL1A1*, *COL2A1*, *COL9A3*, *COL10A1*, *SPARC*, marcatori di differenziamento condrogenico ed osteogenico; d) *GLUT1*, *GLUT4*, codificanti per trasportatori del glucosio. Prima della reazione di RT-qPCR, L'RNA è stato estratto da cellule dell'ottava generazione, grazie alla soluzione *TRI Reagent*

Solution (una soluzione monofasica composta da fenolo e guanidinio tiocianato) e poi quantificato con lo spettrofotometro NANODROP. I risultati sono stati confrontati tra loro con il metodo del $2^{-\Delta Ct}$. Per la normalizzazione dei dati, è stato utilizzato come gene l'*ipoxantina fosforibosiltransferasi (HPRT1)*.

2.6 CITOFLUORIMETRIA (FCM)

La determinazione dell'immunofenotipo è di fondamentale importanza quando si vogliono dimostrare la staminalità e le caratteristiche peculiari di una popolazione cellulare anche in relazione al suo microambiente di origine, nonché per definire l'espressione dei marcatori di membrana che identificano in modo univoco quella specifica popolazione. A tal fine si utilizza la citofluorimetria (FCM), una tecnica che consente di valutare in modo qualitativo e quantitativo le molecole espresse sulla superficie delle cellule permettendo l'identificazione precisa del tipo cellulare. La sospensione cellulare viene incubata con l'anticorpo primario (o primario + secondario) coniugato con fluorocromo, per il legame con l'antigene di interesse. La sospensione cellulare viene fatta scorrere attraverso lo strumento che ne misura la fluorescenza con metodi ottici. Sono rilevate come cellule positive quelle che rispondono alla stimolazione specifica per la sonda fluorescente utilizzata durante la marcatura della sospensione cellulare. Nello studio le cellule staminali dell'ottava generazione sono state analizzate mediante una colorazione singola con il citofluorimetro FACSCanto II a 24 ore dalla semina utilizzando anticorpi contro antigeni umani. Le analisi sono state condotte per valutare l'espressione di marker legati alla staminalità (*CD44*, *CD105*, *CD90*) e alla discendenza ematopoietica (*CD45*, *CD117*, *PDGFR β* , *CD35*), coinvolti nei processi di adesione cellula-matrice e recettori di membrana per citochine/fattori di crescita (Fas, FasL). I campioni trattati solo con l'anticorpo isotipico/secondario sono stati considerati come controlli.

2.7 RISPOSTA AL MICROAMBIENTE E AGLI STIMOLI MECCANICI

È stato allestito un modello *in vitro* per valutare la risposta delle cellule staminali agli stimoli adipogenici; per fare ciò, le cellule sono state seminate su una piastra a 24 pozzetti e coltivate per 3 giorni, trascorso questo tempo, le cellule sono state esposte a stimoli adipogenici solubili (insulina, desametasone e indometacina). Ai giorni 7 e 14, le cellule sono state fissate con una soluzione di formalina e colorate con Oil Red O e osservate al microscopio ottico.

Per valutare la risposta delle cellule staminali OA-IFP all'ambiente patologico, è stato allestito un sistema *in vitro* dove il medium di coltura è stato arricchito di fattori angiogenici [vascular endothelial growth factor (VEGF)], fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), fattori di crescita dell'epidermide (EGF), fattori di crescita dell'insulina-1 (IGF-1), eparina e acido ascorbico e successivamente coltivati su supporti rigidi o morbidi. Questi fattori solubili sono stati impiegati per simulare *in vitro* le condizioni a cui le cellule sono sottoposte *in vivo*, ovvero la presenza nelle vicinanze di vasi sanguigni, mentre l'impiego di una matrice è stato fondamentale

per riprodurre le strutture e le forze meccaniche che intervengono durante il differenziamento cellulare. Le cellule sono state osservate a 3 e 7 giorni dalla semina con un microscopio Leica DMR.

3 RISULTATI

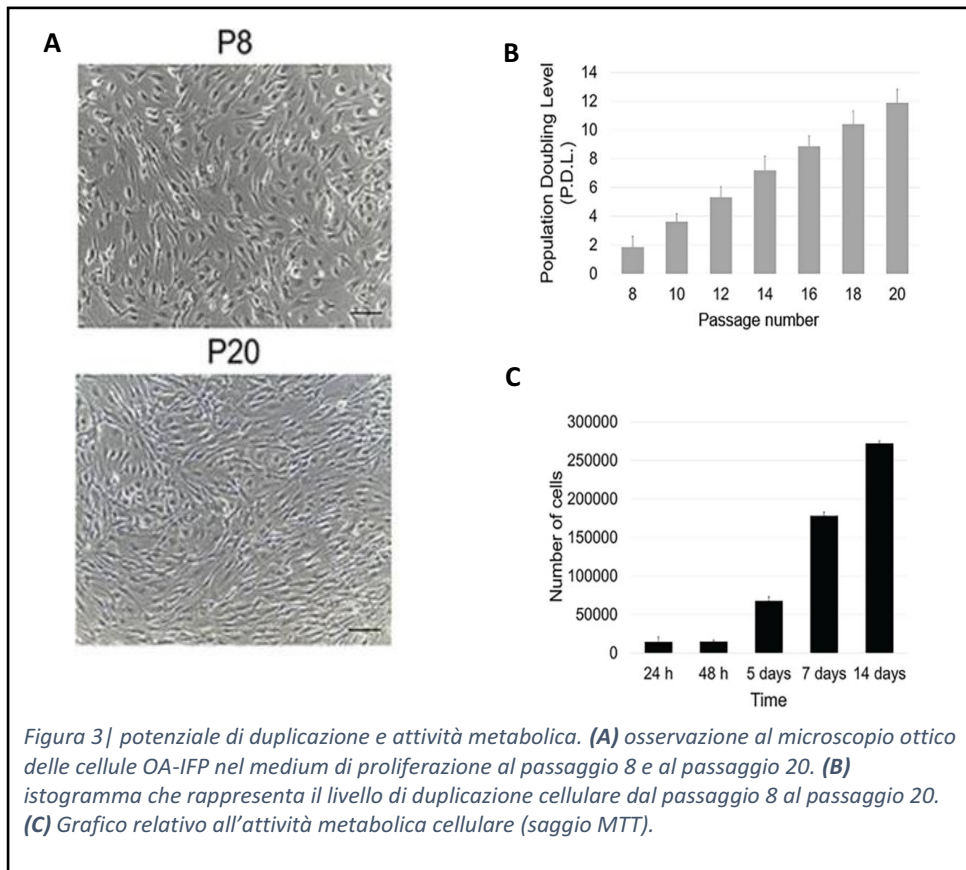
3.1 ISOLAMENTO DELLA POPOLAZIONE CELLULARE E MORFOLOGIA IN COLTURA

Le cellule staminali provenienti dal cuscinetto adiposo infrapatellare sono state isolate da pazienti affetti da OA, arruolati per l'impianto di protesi totale del ginocchio. Preliminarmente, i tessuti hanno mostrato una generale consistenza fibrosa; tuttavia, l'enzima di digestione collagenasi B si è rivelato efficace nella disgregazione del tessuto, necessaria per l'isolamento delle cellule. Dopo la processazione, l'elevata presenza di frammenti tissutali nel medium non ha consentito di procedere alla conta cellulare di partenza per poter determinare la resa del protocollo (cellule/mg tessuto). Tuttavia, il mantenimento dei frammenti della ECM si è rivelato fondamentale per favorire l'adesione cellulare e la successiva proliferazione.

3.2 PROLIFERAZIONE E ATTIVITÀ METABOLICA

In coltura, le cellule staminali di OA-IFP hanno mostrato una morfologia fusiforme, la quale è stata mantenuta durante le generazioni cellulari della coltura. Il tasso di proliferazione è stato valutato per 12 generazioni consecutive al fine di verificarne la capacità di rimanere in coltura per un lungo periodo, senza incorrere in fenomeni di senescenza. A partire dal passaggio 8 al 20, come riportato nella *Figura 3B*, le cellule hanno effettuato 11.9 ± 8.3 raddoppiamenti.

L'attività metabolica è stata valutata a diversi end-point mediante saggio MTT. A partire da 24 e 48 ore dalla semina il numero cellulare è variato moderatamente a causa della lenta espansione iniziale; si osserva infatti, come effettivamente il numero di cellule raddoppi a partire solo dal 5° giorno dopo la semina. Trascorsi 14 giorni, la densità cellulare è talmente alta che subentra l'inibizione da contatto, la quale inibisce il processo di replicazione cellulare, diminuendo la velocità di crescita stessa.

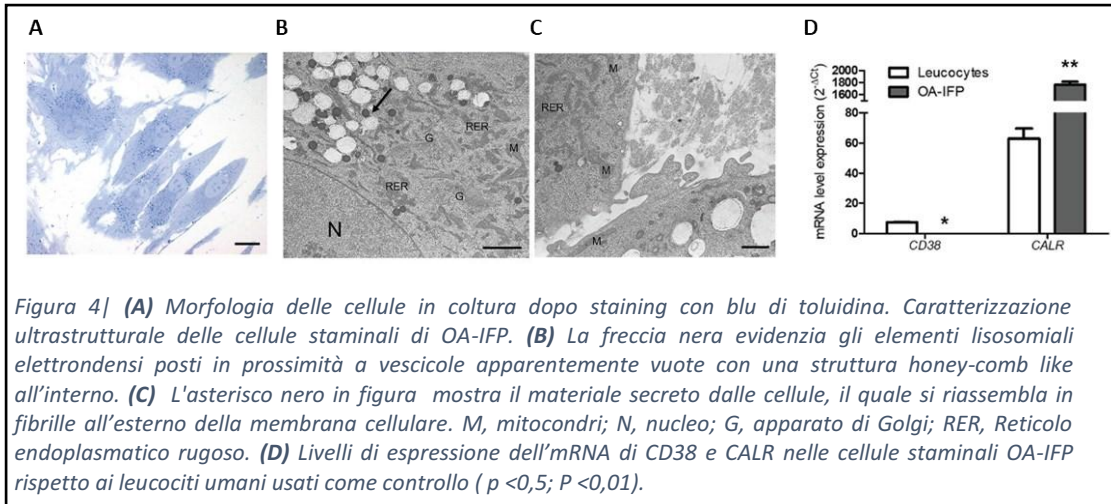


3.3 MORFOLOGIA E MARKER RELATIVI ALLO STRESS METABOLICO

Le cellule sono state osservate al microscopio ottico dopo colorazione con blu di toluidina. L'analisi mostra cellule con una forma regolare ed evidenzia la presenza di vescicole colorate in blu intenso nella zona perinucleare (*Figura 3A*).

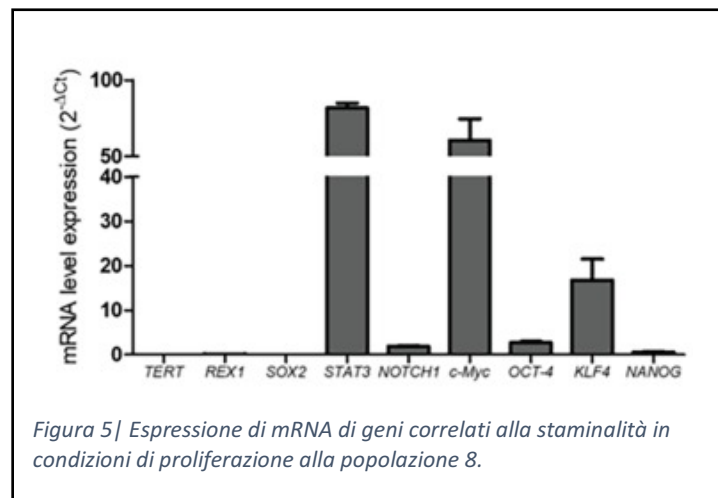
Per quanto riguarda le osservazioni al TEM, le analisi hanno mostrato in prossimità del nucleo una numerosa presenza di organelli intracellulari come il reticolo endoplasmatico rugoso, i mitocondri e l'apparato del Golgi (*Figura 3B,C*). Ciò suggerisce l'elevata attività metabolica delle cellule oggetto di questo studio. Inoltre, gli stessi elementi che dopo staining con Blu di Toluidina apparivano come delle vescicole blu, sono stati evidenziati anche tramite osservazione al TEM. Essi appaiono come elementi rotondeggianti fortemente elettrondensi in quali, in alcuni punti, mostravano una fusione parziale con vescicole apparentemente vuote al cui interno si poteva identificare una struttura *honeycomb-like* (*Figura 4B*). Elementi filamentosi di secrezione, con un orientamento disorganizzato sono stati individuati all'esterno della membrana cellulare (*Figura 4C*).

In relazione allo stress metabolico, l'analisi mediante qPCR condotta sulle cellule staminali OA-IFP rispetto ai leucociti usati come controllo ha mostrato un'espressione pressoché nulla di mRNA per CD38 e livelli significativamente più elevati ($p < 0,01$) del gene della calreticulina (*Figura 3D*).



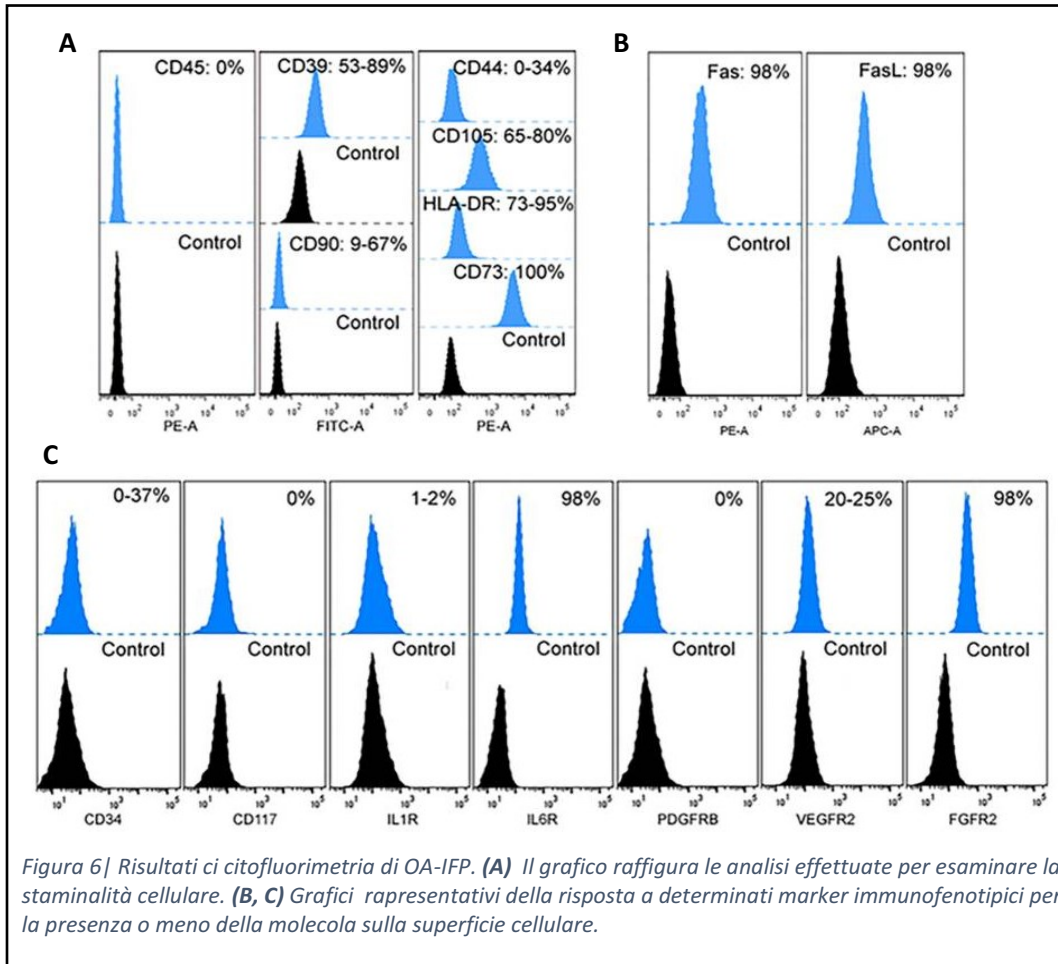
3.4 VALUTAZIONE DELLA MULTIPOTENZA

Durante l'espansione delle cellule nel breve e nel lungo periodo, l'espressione dell'mRNA codificante per i geni *NANOG*, *c-Myc*, *NOTCH1*, *KLF4* e *STAT3* ha dimostrato un certo grado di multipotenza per la popolazione cellulare oggetto dello studio (Figura 5)



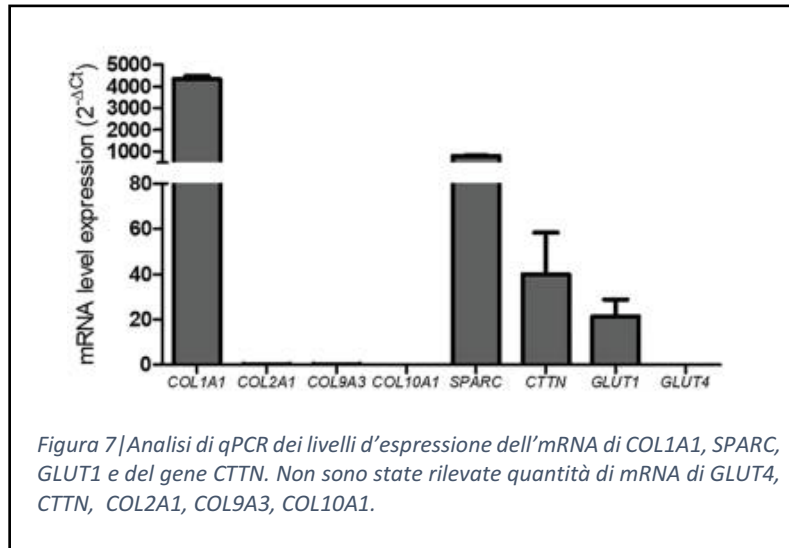
Dalle analisi mediante citofluorimetria è emerso che le cellule staminali presentavano un profilo immunofenotipico stabile, nello specifico i campioni sono risultati al 90% positivi ai marcatori per CD73, FGFR2 e IL6R, i quali suggeriscono una certa responsività sia ai fattori ambientali dell'IFP che dell'OA. I picchi ottenuti tramite FCM sono rappresentativi della distribuzione della fluorescenza del campione: in riferimento all'asse delle ascisse, quanto più la gaussiana ottenuta dalle analisi sul campione è spostata verso lo zero, tanto più il saggio è negativo per quel determinato marcatore. La percentuale calcolata dal software per ciascuna gaussiana indica la percentuale di cellule positive al marcatore in ciascuna prova. Inoltre, gli alti livelli di espressione rilevati tramite FACS di HLA-DR, Fas/FasL

($\geq 98\%$), CD39, VEGFR2 e in alcuni casi anche di CD34 suggeriscono come l'attivazione delle cellule staminali ricavate da OA-IFP dipenda dalla presenza di un microambiente infiammatorio. Si può osservare come la mancata presenza di espressione di CD45, CD117 e PDGFR β escluda l'ipotesi tale per cui queste cellule possano derivare da progenitori ematopoietici o endovascolari (*Figura 6*).

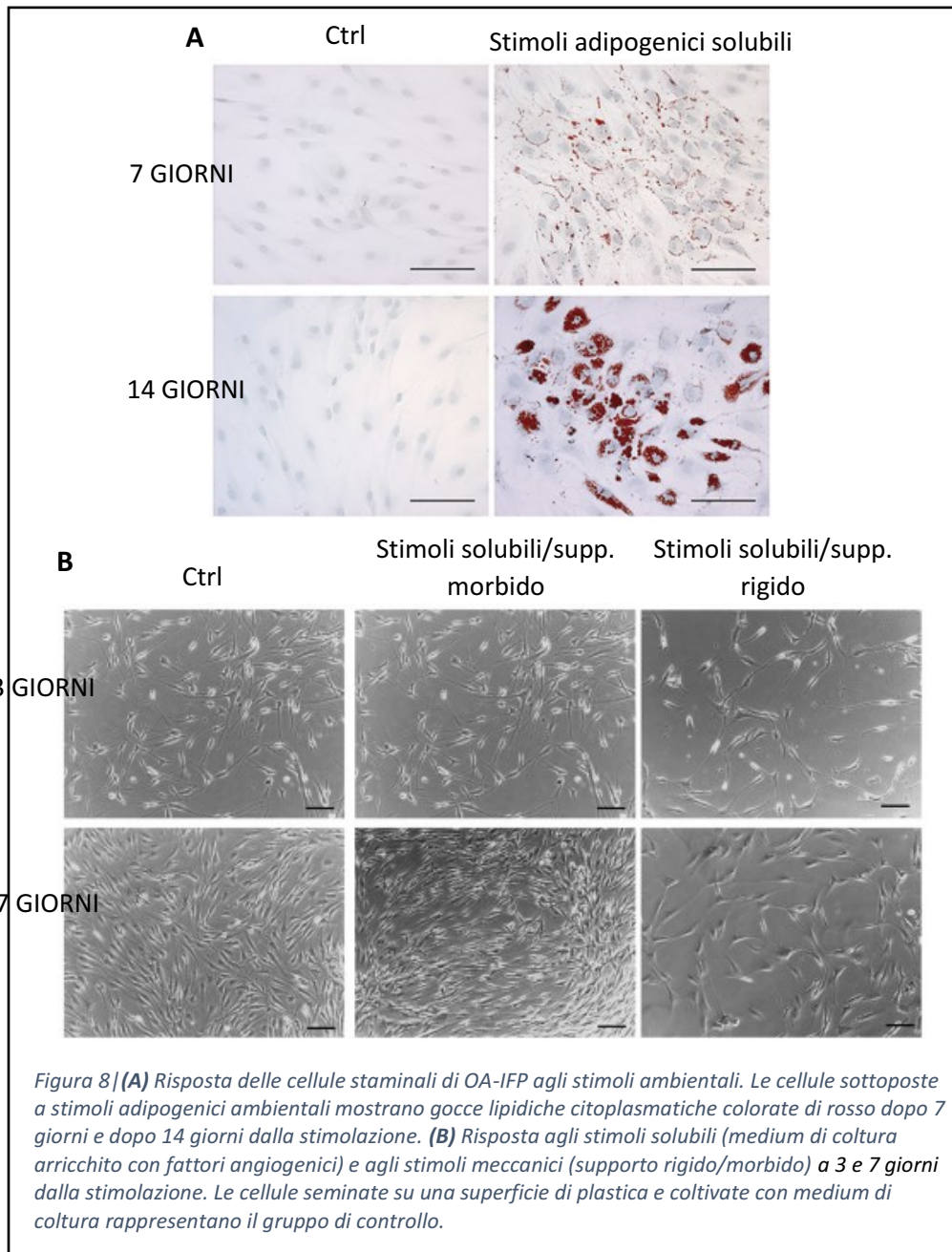


3.5 VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DIFFERENZIAATIVO E DELLA RISPOSTA AGLI STIMOLI AMBIENTALI

Le cellule staminali OA-IFP hanno dimostrato avere un potenziale differenziativo verso i lignaggi condrogenico e osteogenico, mostrando l'espressione mRNA associati a geni quali COL1A1, SPARC e GLUT1; inoltre, l'espressione significativa di cortactin/CTTN ha suggerito che il differenziamento delle cellule staminali OA-IFP potrebbe essere regolato dalla meccano-trasduzione (*Figura 7*).



Quando le cellule staminali sono state trattate con stimoli adipogenici hanno sviluppato un particolare accumulo di lipidi nel loro citoplasma (*Figura 8A*). Inoltre, volendo ricreare l'ambiente del compartimento articolare con OA (OA-like), le cellule OA-IFP hanno mostrato comportamenti diversi a seconda della presenza di stimoli solubili (medium endoteliale arricchito con fattori angiogenici) e stimoli meccanici (superficie di coltura rigidi o morbidi), (*Figura 8B*). Su vetro (cioè supporto rigido) le cellule hanno acquisito una morfologia allungata, descrivendo strutture cordonali; la densità cellulare è rimasta comparabile ad entrambi gli end-point (3 e 7 giorni). Su Matrigel (supporto morbido), dopo una prima risposta ai 3 giorni simile a quella riscontrata per le cellule coltivate in un ambiente OA-like, la densità cellulare è aumentata e l'organizzazione cellulare a rete non era più identificabile. Al contrario, nel gruppo di controllo non si osservano né orientamenti preferenziali né riduzione della proliferazione.



4 DISCUSSIONE

Da una revisione della letteratura, appare evidente come sempre più Ricercatori sostengano la possibilità di utilizzare cellule staminali da IFP di pazienti con OA per il recupero del danno articolare focale in sedi diverse dall'articolazione bersaglio. Infatti, l'IFP: 1) è un tessuto adiposo (tra le fonti di principale interesse per l'isolamento di MSCs); 2) è un tessuto di scarto per quei pazienti sottoposti a protesizzazione, pertanto facilmente accessibile; 3) le MSCs adipose da esso isolate posseggono un elevato potenziale di differenziamento verso il lineage condrogenico. Nonostante il ruolo intrigante che le MSCs da IFP potrebbero

svolgere per approcci di medicina rigenerativa, è necessario considerare come l'OA sia una patologia a carattere infiammatorio che interessa l'intera articolazione. Verosimilmente, oltre a contribuire direttamente al suo instaurarsi, anche l'IFP risente di tale ambiente: il contesto infiammatorio porta le cellule staminali ad innescare un'azione di difesa; esse incorrono in una riprogrammazione promossa dagli stimoli dell'ambiente infiammatorio, tant'è che esse sviluppano un fenotipo protettivo all'interno dell'articolazione che è stato dimostrato attraverso diverse analisi in questo studio.

La caratterizzazione al TEM ha mostrato nel citoplasma cellulare la presenza di numerosi organelli, i quali possono suggerire un'intensa attività metabolica ulteriormente comprovata da vescicole che ricordano gli autofagosomi. Questi ultimi sono generalmente attivati da situazioni di ipossia, presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e proteine mal conformate, tutti eventi che verosimilmente si possono verificare in condizioni quali quelle associate alla progressione dell'OA. Inoltre, gli autolisosomi sono in grado di fagocitare elementi indesiderati presenti all'interno della cellula affinché sia ripristinata l'omeostasi cellulare.

Lo stato di attivazione della calreticulina suggerisce l'esistenza di una condizione di stress. Tuttavia, la bassa espressione di CD38/NADasi suggerisce che le cellule staminali OA-IFP potrebbero non essere in grado di reagire a tale contesto.

In confronto alle altre cellule multipotenti, le cellule staminali derivanti da IFP hanno mostrato delle proprietà immunofenotipiche caratteristiche. Com'è emerso dalle analisi con la qPCR, infatti, la popolazione esprimeva *STAT3*, *NOTCH1*, *c-Myc*, *OCT-4*, *KLF4*, e *NANOG*, fattori di trascrizione tipici delle cellule staminali che indicano un alto potenziale di autorinnovamento cellulare; contestualmente, anche la presenza di HLA-DR e Fas/FasL è prova dello stato infiammatorio in atto. I dati nella pubblicazione confermano quindi l'ipotesi che la natura infiammatoria dell'IFP possa condizionare la nicchia delle cellule staminali. Al contrario, secondo Kouroupis et al. (2021), le cellule staminali prelevate dall'IFP sono in grado di differenziare senza essere precedentemente attivate dal microambiente in cui sono inserite,

Per quanto riguarda l'origine delle cellule staminali estratte dall'IFP, si esclude la derivazione perivascolare giacché non è stata rilevata l'espressione di PDGFR β (recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine), inoltre, l'espressione di proteine d'adesione, recettori per fattori di crescita e citochine suggeriscono alti livelli di risposta al microambiente, ritenendo queste cellule staminali capaci di mutare il loro fenotipo se sottoposte a stimoli ambientali specifici. Le cellule, infatti, rispondono agli stimoli ambientali, mostrando un comportamento diverso in presenza di stimoli solubili e meccanici volti a mimare l'ambiente OA-like. Ciò suggerirebbe come le cellule staminali OA-IFP possano essere implicate in fenomeni di protezione *in vivo*. Tale ipotesi è ulteriormente supportata anche dagli alti livelli d'espressione del gene COL1A1, essendo questo deputato alla codifica per la sintesi del collagene di tipo I alfa1, elemento strutturale della matrice extracellulare.

Alla luce delle evidenze sperimentali, le cellule staminali prelevate da OA-IFP sembrano essere incapaci di contrastare l'infiammazione tipicamente associata all'ambiente OA-like; pertanto, esse sono inadatte per approcci di carattere rigenerativo (Mak et al., 2022). Diversamente, potrebbero costituire un interessante modello di patologia *in vitro* utile per studiare l'interazione con condrociti piuttosto che la risposta a molecole ad azione terapeutica.

5 BIBLIOGRAFIA

Draghi F, Ferrozzi G, Urciuoli L, Bortolotto C, Bianchi S. Hoffa's fat pad abnormalities, knee pain and magnetic resonance imaging in daily practice. *Insights Imaging*. 2016 Jun;7(3):373-83. doi: 10.1007/s13244-016-0483-8. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27000624; PMCID: PMC4877349.

Kouroupis D, Willman MA, Best TM, Kaplan LD, Correa D. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell-based spheroids enhance their therapeutic efficacy to reverse synovitis and fat pad fibrosis. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Jan 7;12(1):44. doi: 10.1186/s13287-020-02107-6. Erratum in: *Stem Cell Res Ther*. 2021 May 11;12(1):282. PMID: 33413649; PMCID: PMC7792122.

Mak CCH, To K, Fekir K, Brooks RA, Khan WS. Infrapatellar fat pad adipose-derived stem cells co-cultured with articular chondrocytes from osteoarthritis patients exhibit increased chondrogenic gene expression. *Cell Commun Signal*. 2022 Feb 12;20(1):17. doi: 10.1186/s12964-021-00815-x. PMID: 35151341; PMCID: PMC8841120.

Zhong YC, Wang SC, Han YH, Wen Y. Recent Advance in Source, Property, Differentiation, and Applications of Infrapatellar Fat Pad Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2020 Mar 7;2020:2560174. doi: 10.1155/2020/2560174. PMID: 32215015; PMCID: PMC7081037.

Zhou S, Maleitzke T, Geissler S, Hildebrandt A, Fleckenstein FN, Niemann M, Fischer H, Perka C, Duda GN, Winkler T. Source and hub of inflammation: The infrapatellar fat pad and its interactions with articular tissues during knee osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2022 Jul;40(7):1492-1504. doi: 10.1002/jor.25347. Epub 2022 May 8. PMID: 35451170.

Appendice

Stocco E, Barbon S, Piccione M, Belluzzi E, Petrelli L, Pozzuoli A, Ramonda R, Rossato M, Favero M, Ruggieri P, Porzionato A, Di Liddo R, De Caro R, Macchi V. Infrapatellar Fat Pad Stem Cells Responsiveness to Microenvironment in Osteoarthritis: From Morphology to Function. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Dec 10;7:323. doi: 10.3389/fcell.2019.00323.



Infrapatellar Fat Pad Stem Cells Responsiveness to Microenvironment in Osteoarthritis: From Morphology to Function

Elena Stocco^{1,2,3}, Silvia Barbon^{1,2,3}, Monica Piccione⁴, Elisa Belluzzi^{5,6}, Lucia Petrelli¹, Assunta Pozzuoli^{5,6}, Roberta Ramonda⁷, Marco Rossato⁸, Marta Favero⁷, Pietro Ruggieri⁶, Andrea Porzionato^{1,2}, Rosa Di Liddo^{3,4*}, Raffaele De Caro^{1,2*†} and Veronica Macchi^{1,2†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Gianluca Carnevale,
University of Modena and Reggio
Emilia, Italy

Reviewed by:

Laura Bertoni,
University of Modena and Reggio
Emilia, Italy
Stefania Croci,
Local Health Authority of Reggio
Emilia (IRCCS), Italy
Burhan Gharaibeh,
University of Pittsburgh, United States

*Correspondence:

Rosa Di Liddo
rosa.diliddo@unipd.it
Raffaele De Caro
raffaele.decaro@unipd.it

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Stem Cell Research,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 01 August 2019

Accepted: 25 November 2019

Published: 10 December 2019

Citation:

Stocco E, Barbon S, Piccione M,
Belluzzi E, Petrelli L, Pozzuoli A,
Ramonda R, Rossato M, Favero M,
Ruggieri P, Porzionato A, Di Liddo R,
De Caro R and Macchi V (2019)
Infrapatellar Fat Pad Stem Cells
Responsiveness to Microenvironment
in Osteoarthritis: From Morphology
to Function.
Front. Cell Dev. Biol. 7:323.
doi: 10.3389/fcell.2019.00323

¹ Department of Neurosciences, Institute of Human Anatomy, University of Padova, Padua, Italy, ² LifeLab Program, Consorzio per la Ricerca Sanitaria (CORIS), Padua, Italy, ³ Foundation for Biology and Regenerative Medicine, Tissue Engineering and Signaling ONLUS, Padua, Italy, ⁴ Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Padua, Italy, ⁵ Musculoskeletal Pathology and Oncology Laboratory, Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology DiSCOG, University of Padova, Padua, Italy, ⁶ Department of Orthopaedics and Orthopaedic Oncology, University of Padova, Padua, Italy, ⁷ Rheumatology Unit, Department of Medicine – DIMED, University Hospital of Padova, Padua, Italy, ⁸ Clinica Medica 3, Department of Medicine – DIMED, University of Padova, Padua, Italy

Recently, infrapatellar fat pad (IFP) has been considered as a source of stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis (OA) due to their ability for differentiation into chondrocytes. However, stressful conditions, like that related to OA, may induce a pathogenic reprogramming. The aim of this study was to characterize the structural and functional properties of a new population of stem cells isolated from osteoarthritic infrapatellar fat pad (OA-IFP). Nine OA patients undergoing total knee arthroplasty (TKA) were enrolled in this study [median age = 74 years, interquartile range (IQR) = 78.25-67.7; median body mass index = 29.4 Kg/m², IQR = 31.7-27.4]. OA-IFP stem cells were isolated and characterized for morphology, stemness, metabolic profile and multi-differentiative potential by transmission electron microscopy, flow cytometric analysis, gene expression study and cytochemistry. OA-IFP stem cells displayed a spindle-like morphology, self-renewal potential and responsiveness (CD44, CD105, VEGFR2, FGFR2, IL1R, and IL6R) to microenvironmental stimuli. Characterized by high grade of stemness (*STAT3*, *NOTCH1*, *c-Myc*, *OCT-4*, *KLF4*, and *NANOG*), the cells showed peculiar immunophenotypic properties (CD73⁺/CD39⁺/CD90⁺/CD105⁺/CD44^{-/+}/CD45⁻). The expression of HLA-DR, CD34, Fas and FasL was indicative of a possible phenotypic reprogramming induced by inflammation. Moreover, the response to mechanical stimuli together with high expression level of *COL1A1* gene, suggested their possible protective response against *in vivo* mechanical overloading. Conversely, the low expression of *CD38/NADase* was indicative of their inability to counteract NAD⁺-mediated OA inflammation. Based on the ultrastructural, immunophenotypic and functional characterization, OA-IFP stem cells were hypothesized to be primed by the pathological environment and to exert incomplete protective activity from OA inflammation.

Keywords: infrapatellar fat pad, osteoarthritis, stem cells, inflammation, reprogramming

INTRODUCTION

In osteoarthritis (OA) the clinical signs suggesting the occurrence of an inflammatory process are generally evident. These include manifestations such as swelling, heat, stiffness and pain, which are clearly recognizable since the disease onset and continue along its course (Favero et al., 2015). To date, arthroplasty is considered the only decisive option in OA; the other therapeutic strategies for early OA (e.g., weight reduction, exercise, braces, non-steroidal anti-inflammatory drugs, symptomatic slow-acting drugs, intra-articular injections of glucocorticoid or hyaluronic acid) can only slow its progression without any significant effect on the cartilage integrity (Im, 2018). Worldwide, approximately 9.6% of men and 18% of women aged ≥ 60 years are estimated to have symptomatic OA (Michaud et al., 1996); hence, the extent of the disease, the significant impairment of patients' quality of life and the related costs require a better characterization of the pathophysiological mechanisms involved in its development. This would ensure more effective therapeutic approaches to OA, overcoming the limitations of the current ones, also suggesting alternative and/or tailored options for disease management.

Currently, it is commonly accepted that OA is not merely a cartilage disease but a whole joint disease involving different structures such as meniscus, synovial membrane, and infrapatellar fat pad (IFP) (Belluzzi et al., 2019). In the recent years, the potential role of the IFP in OA has been suggested by many researchers. For a long time, this peculiar extra-synovial adipose tissue was simplistically retained a deformable space filler endowed with shock absorber properties in the knee joint and a bystander in knee OA; conversely, it is now considered an emerging player in knee OA with a multifunctional role in knee joint homeostasis, also mediating joint pain and inflammation (Ioan-Facsinay and Kloppenburg, 2013; Belluzzi et al., 2017, 2019; Macchi et al., 2018). This occurs through an active secretion of cytokines and adipokines (Ioan-Facsinay and Kloppenburg, 2013) whose levels are gender dependent, being normally higher in women than in men even after adjusting for body mass index (BMI) (Poonpet and Honsawek, 2014). Therefore, it can be assumed that the IFP, similar to subcutaneous and visceral adipose tissue, is an active organ whose products contribute to inflammatory and degenerative processes underlying common joint diseases (Toussiro et al., 2007).

Furthermore, the IFP itself is affected by immune cells in OA; in fact, compared to healthy-IFPs, it shows an increase in inflammatory infiltration, vascularization and fibrosis with thickened interlobular septa also supported by higher levels of VEGF, MCP-1, and IL-6 proteins (Favero et al., 2017; Fontanella et al., 2018).

In addition to constitutive stromal vascular cells represented by hematopoietic cells (i.e., macrophages, T cells, mast cells, and B cells) and endothelial cells, also progenitor cells with mesenchymal stem cell-like characteristics have been recognized in the IFP (Hindle et al., 2017; Huri et al., 2018). Stem cells regenerate tissues in homeostasis but they also sense and respond to stressful conditions (Naik et al., 2018)

undergoing a possible pathogenic reprogramming under long-lasting inflammation (Michael et al., 2016). Thus, the purpose of this study was to isolate OA-IFP stem cells from patients undergoing total knee arthroplasty (TKA) and provide a broad characterization of such cell populations. A better understanding of their origin and pathophysiological role in OA may suggest a possible novel interpretive key to explain histopathological features commonly encountered in OA joints.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study was performed after receiving institutional review board approval (CESC Code: 4510/AO/18). Patients affected by OA undergoing to TKA, showing good health, without tumor and/or knee comorbidities and not suffering from infective conditions were eligible. Nine patients were enrolled in this study after signing the informed consent [median age = 74 years, interquartile range (IQR) = 78.25-67.7; median body mass index = 29.4 Kg/m², IQR = 31.7-27.4]; demographic data are reported in **Table 1**. At the moment of sample collection, the patients were naïve from therapies. Tissue specimens were collected during TKA and then rapidly processed for the isolation of stromal cells.

Cell Isolation

Osteoarthritic infrapatellar fat pad stem cells were isolated according to a modified protocol by Hindle et al. (2017). After washing tissues in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 2% penicillin/streptomycin (P/S; Sigma-Aldrich), enzymatic digestion was performed overnight at 37°C in a medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States), 1% collagenase B (Roche, Basel, Switzerland) and 1% P/S. The cell suspension was filtered through 40- μ m cell strainer (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, United States) and

TABLE 1 | Patient's demographic data.

| Patient number | Sex | Age, years | BMI, Kg/m ² | Kellgren Lawrence Scale | Comorbidities |
|----------------|-----|------------|------------------------|-------------------------|---------------|
| 1 | F | 68 | 29.4 | 3 | H |
| 2 | F | 67 | 27.7 | 3 | H |
| 3 | F | 74 | 30.1 | 3 | H, D |
| 4 | M | 64 | 27.4 | 3 | H, D2 |
| 5 | M | 73 | 36.3 | 4 | H, D2 |
| 6 | F | 79 | 24.5 | 3 | H, D, D2 |
| 7 | F | 76 | 27.3 | 3 | H, D |
| 8 | M | 79 | 32.3 | 3 | H, D |
| 9 | F | 78 | 31.6 | 3 | H, D |

BMI, body mass index; F, female; M, male; H, hypertension; D, dyslipidemia; D2, diabetes type 2.

centrifuged before seeding the pellet in proliferation medium (DMEM HG, 10% FBS, 1% P/S).

Long-Term Proliferative Potential and Metabolic Activity

The proliferation rate of OA-IFP stem cells was evaluated from 8th to 20th generation after seeding in a 6-well plate (seeding density of 5×10^3 cells/cm²). At intervals of 24 h, the cells were detached by trypsin-EDTA solution and counted with the automatic cell counter. Average cell number per well and standard deviation (SD) were considered to describe the population doubling level (PDL). At first, the population doubling (PD) was calculated according to the equation:

$$P.D. = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$$

where N_t is the number of cells counted at the time point considered; and N_0 is the number of cells seeded at $t = 0$ (Ferroni et al., 2019). Then, the PDL of every passage was determined by addition of the PD relative to that passage to the PD of previous passages (Marrelli et al., 2013).

Cell viability was also assessed at 8th, 14th, and 20th generations using the Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (Promokine, Cat No. PK-CA707-30018, Heidelberg, Germany) following the Manufacturer's instructions. The detection of stained cells was performed with a DMR microscope (Leica, Wetzlar Germany).

To assess OA-IFP cells metabolic activity, the subcultures were treated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/mL) for 4 h, at 1, 2, 5, 7, and 14 days from seeding. Formazan precipitates were dissolved in 2-propanol acid (0.04 M HCl in 2-propanol) and optical density was measured at 570 nm, using a Microplate autoreader EL 13. Results were expressed as number of cells grown on seeded surface (Grandi et al., 2018). Determining cell number was allowed by the standard curve previously developed (Gerlier and Thomasset, 1986).

Morphological Study

The OA-IFP stem cells and subcultures were observed by an optical microscope DM/IL (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a camera Nikon Digital Sight Ds-SMCC (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). For ultrastructural studies, the cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde (*Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse - Germany*) in 0.1 M phosphate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide (Agar Scientific Elektron Technology, United Kingdom) in 0.1 M phosphate buffer. After dehydration in a graded alcohol series, the samples were embedded in epoxy resin (Epoxy Embedding Medium Kit, Sigma-Aldrich, Switzerland) and processed as previously described (Stocco et al., 2018). Both 1% Toluidine blue staining and analysis by a Hitachi H-300 Transmission Electron Microscope (Hitachi, Krefeld, Germany) occurred.

Stemness and Metabolic Gene Profile

Genes related to stemness (*TERT*, *REX1*, *SOX2*, *STAT3*, *NOTCH1*, *c-Myc*, *OCT-4*, *KLF4*, and *NANOG*) and metabolic activity (*CD38*

and *CALR*) of OA-IFP stem cells were characterized by RT-qPCR. Cells from 8th passage at a sub-confluent state (i.e., 70–80%) were used to extract RNA with TRI Reagent® solution (Zymo Research, United States). After RNA quantification using the NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States), gene expression study was carried out in a single-step reaction, using 12.5 ng of RNA, oligonucleotides (Thermo Fisher Scientific, Inc) listed in **Table 2**, qPCR BIO SyGreen 1-Step Go Lo-ROX (PCR Biosystems Ltd., London, United Kingdom) and Magnetic Induction Cycler (Bio Molecular Systems, Upper Coomera, QLD, Australia). To obtain statistical significance, three independent preparations were obtained to analyze target genes and *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)* housekeeping marker listed in **Table 2**. For data analysis, the comparative Ct method ($2^{-\Delta Ct}$) was adopted. Human leukocytes isolated by a standard density gradient separation from healthy donors were used as control for the analysis of *CD38* and *CALR*.

Immunophenotyping

Sub-confluent (i.e., 70–80%) OA-IFP stem cells from 8th generation were analyzed by single staining with FACSCanto II Flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, United States) at 24 h after seeding, using anti-human antibodies (**Table 3**). FCM analysis were performed to evaluate the expression of markers related to mesenchymal stem cell immunophenotype, hematopoietic lineage commitment, enzyme/signaling molecules, cell–matrix adhesion and cytokine/growth factor receptors. For each marker, data from three experimental replicas were analyzed with FlowJo™ software (BD) and then were reported as mean percentage of positive cells. Samples treated with only secondary antibodies or isotype control antibodies (**Table 3**) were considered as controls. No exclusion of dead cells from analysis was performed.

CD45 and HLA-DR Double Staining

To confirm FCM data, a CD45 and HLA-DR double staining was performed on OA-IFPs tissue sections from samples used for stem cells isolation.

Osteoarthritic infrapatellar fat pad specimens were fixed in 10% formalin in PBS, paraffin-embedded and cut into 4 μ m-thick sections. After deparaffinization, the sections were treated with EDTA (pH = 8; for Mouse Anti-Human-CD45) and citrate buffer (pH = 6; for Mouse Anti-Human HLA-DR) in microwave oven heating. After washing in PBS, the specimens were incubated with Dual Endogenous Enzyme block (ready to use – Dako, Milan, Italy) to assure endogenous peroxidase and alkaline phosphatase inhibition, rinsed in PBS, blocked in 0.2% BSA (Bovine Serum Albumin) and incubated with Mouse Anti-Human CD45 1:100 (Biocare CM016) overnight at 4°C. After washing, the samples were incubated with the secondary antibody (HRP-conjugated Goat Anti-Mouse – Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, United Kingdom) and the reaction was detected with diaminobenzidine, Dako (brown stain). Thus, the sections were rinsed in PBS and incubated with Mouse Anti-Human HLA-DR 1:100 (Clone TAL.1B5 – Dako) overnight at 4°C. The

TABLE 2 | Oligonucleotides used for RT qPCR analysis.

| | Target gene | Sequence (5'-3') | Reference sequence | Length (pb) |
|---|----------------|---|--------------------|-------------|
| <i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i> | <i>HPRT1</i> | F: ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT R: TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG | NM_000194.2 | 79 pb |
| <i>CD38 molecule</i> | <i>CD38</i> | F: CTCAATGGATCCCAGTAAA R: CCTGGCATAAGTCTCTGGAATC | D_84276.1 | 145 pb |
| <i>Calreticulin</i> | <i>CALR</i> | F: TCTCCCGATCCCAGTATCTATG R: CATCGTTGGTGATGAGGAAGT | NM_004343.3 | 109 pb |
| <i>Telomerase reverse transcriptase</i> | <i>TERT</i> | F: ACATGGAGAACAAGCTGTTTGCGG R: TGAGGTGAGGTGTACCAACAAGA | NM_198253.2 | 66 pb |
| <i>Zinc finger protein 42</i> | <i>REX1</i> | F: TGGAGGAATTACCTGGCATTGACCT R: AGCGATTGCGCTCAGACTGTCATA | NM_174900.3 | 105 pb |
| <i>SRY (Sex-determining Region Y)-Box 2</i> | <i>SOX2</i> | F: ACAACATGATGGAGACGGAGCTGA R: TGGTAGTGCTGGGACATGTGAAGT | NM_003106.3 | 191 pb |
| <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> | <i>STAT3</i> | F: ATGGAAGAATCCAACAACGGCAGC R: AGGTCAATCTTGAGGCCTTGGTGA | NM_213662.1 | 175 pb |
| <i>Notch receptor 1</i> | <i>NOTCH1</i> | F: TCAGGGTGTGCACTGTGAGATCAA R: AGGTGCCGTTGTTAAAGCACTTGG | NM_017617.3 | 112 pb |
| <i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i> | <i>c-Myc</i> | F: CTCCACACATCAGCACAACTA R: TGTCCAACCTTGACCCTCTTG | D10493.1 | 79 pb |
| <i>POU class 5 homeobox</i> | <i>OCT4</i> | F: TATGCAAAGCAGAAACCCTCGTGC R: TTCGGGCACTGCAGGAACAAATTC | NM_002701.4 | 102 pb |
| <i>Kruppel-like factor4</i> | <i>KLF4</i> | F: TGAAGTACCAGGCACTACCGTAA R: TCTTCATGTGTAAGGCGAGGTGGT | NM_004235.4 | 106 pb |
| <i>Nanog homeobox</i> | <i>NANOG</i> | F: CCCAAAGGCAACAACCCACTTCT R: AGCTGGGTGGAAGAGAACACAGTT | NM_024865.2 | 106 pb |
| <i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i> | <i>COL1A1</i> | F: CGATGGCTGCACGAGCTACAC R: TGTCCTCATCCCTCTCATAACA | NM_000088.3 | 179 pb |
| <i>Collagen Type II Alpha 1 Chain</i> | <i>COL2A1</i> | F: CGGGCAGAGGGCAATAGCAGGTT R: CAATGATGGGGAGGCGTGAG | NM_001844.4 | 127 pb |
| <i>Collagen Type IX Alpha 3 Chain</i> | <i>COL9A3</i> | F: AATCAGGCTCTCGAAGCTCATAAAA R: CCTGCCACACCCCGCTCCTTCAT | NM_001853.3 | 99 pb |
| <i>Collagen Type X Alpha 1 Chain</i> | <i>COL10A1</i> | F: GAACTCCAGCAGCAGCAATCC R: GTGTTGGGTAGTGGGCCTTTTATG | NM_000493.3 | 144 pb |
| <i>Secreted protein acidic and cysteine rich</i> | <i>SPARC</i> | F: TACATCGGGCCTTGCAATA R: CAGGTTGGGATGGAGGGAGTTTAC | J03040.1 | 121 pb |
| <i>Cortactin</i> | <i>CTTN</i> | F: GCAGAAGGATCGGATGGATAAG R: GCTTCGACAGGTAAGTCTTC | BC008799.2 | 90 pb |
| <i>Glucose transporter 1</i> | <i>GLUT1</i> | F: GTGCTCCTGGTTCTGTTCTT R: CTCGGGTGCTTGTCACTTT | NM_006516.3 | 126 pb |
| <i>Glucose transporter 4</i> | <i>GLUT4</i> | F: GCCCTACGCTCCTTCTATT R: GGTTTCACCTCTGCTCTAAA | NM_001042.2 | 150 pb |

slides were subsequently rinsed in PBS, covered with Mouse AP Polymer and HLA-DR was visualized with GBI-Permanent Red solution (Red stain). The samples were counterstained with Harris modified hematoxylin (Sigma, Milan, Italy) before mounting.

***In vitro* Differentiative Response to Microenvironmental Stimuli**

Native Plasticity

IFP specimens from OA patients are demonstrated to contain high level of fibrosis (Favero et al., 2017) and to be characterized by cells endowed with chondrogenic and osteogenic potential

(Hindle et al., 2017). Thus, a gene expression study by qPCR was carried out using subcultures under resting conditions and at a sub-confluence state, in order to define the expression of extracellular-matrix related proteins of cartilage/bone tissue (*COL1A1*, *COL2A1*, *COL9A3*, *COL10A1*, *SPARC*), pro-fibroblastic (*CTTN*) markers and glucose transporters (*GLUT1*, *GLUT4*) as above reported, using oligo primers listed in **Table 2**.

***In vitro* Adipogenic Differentiation**

Osteoarthritic infrapatellar fat pad stem cells ability to be used for creating an *in vitro* model of adipose tissue, resembling the *in vivo* environment, was verified. Thus, OA-IFP stem

TABLE 3 | Antibodies used for flow cytometry analysis.

| | Ref. number | Manufacturing company |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------|
| Primary antibodies | | |
| PE anti-human CD34 (BI-3C5) | sc-19621 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| Mouse anti-human CD39 | sc-65262 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| PE anti-human CD44 (H-CAM F-4) | sc-9960 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| PE anti-human CD45 (2D1) | sc-1187 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| PE anti-human CD73 | 344004 | BioLegend, Inc |
| FITC anti-human CD90 (aTHy-1A1) | sc-53456 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| PE anti-human CD117 (c-Kit Ab81) | sc-13508 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| PE anti-human CD105 (Endoglin P3D1) | sc-18838 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| PE mouse anti-human HLA-DR (L243) | sc-18875 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| A350 anti-human IL1R1 | bs-2594R | Bioss |
| Rabbit anti-human IL6R | AB-83485 | Immunological Sciences |
| APC anti-human FGFR2 | FAB 684A | R&D Systems, Inc |
| PE anti-human PDGFR β | 558417 | BD Biosciences |
| FITC anti-human VEGFR2/KDR | FAB 357F | R&D Systems, Inc |
| PE anti-human CD95 (Fas) | 555674 | BD Biosciences |
| APC anti-human CD178 (FasL) | 564262 | BD Biosciences |
| Secondary antibodies | | |
| AF488 goat anti-mouse | A32723 | Invitrogen |
| AF488 goat anti-rabbit | A32731 | Invitrogen |
| Isotype controls | | |
| PE isotype control | sc-2855 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| PE isotype control | 400114 | BioLegend, Inc |
| PE isotype control | 554680 | BD Biosciences |
| FITC isotype control | sc-2855 | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| FITC isotype control | IC002F | R&D Systems, Inc |
| APC isotype control | IC002A | R&D Systems, Inc |
| APC isotype control | 555751 | BD Biosciences |
| A350 isotype control | bs-0295P | Bioss |

cells were seeded in a 24 well plate (5×10^3 cells/cm²) and cultured in proliferative medium for 3 days. To mimic the IFP environment, sub-confluent cells were then exposed to adipogenic soluble stimuli: insulin (10 μ g/mL), dexamethasone (1 μ M); indomethacin (60 μ M), 3-isobutyl-1-methylxanthine (0.5 mM) (all from Sigma-Aldrich) in basal medium (DMEM HG, 10% FBS, 1% P/S); cells under resting conditions were used as controls. At days 7 and 14, the cells were fixed with a 10% formalin solution (Sigma-Aldrich) and stained with Oil Red O (5 mg/ml in isopropanol) according to standard protocol. After mounting with glycerol, all samples were analyzed by a Leica DMR microscope endowed with a Nikon Digital Sight Ds-SMCc camera (Nikon Corporation).

Adaptive Response to Vascular Related Signal and to Mechanical Force

In order to evaluate the response of OA-IFP stem cells to pathological environment, an *in vitro* system was set up. In details, endothelial medium [EBMTM-2 medium (Lonza Group AG, Switzerland), 5% FBS, 1% P/S] enriched of angiogenic factors [vascular endothelial growth factor (VEGF)], human basic fibroblast growth factor (hFGF-b), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), heparin, ascorbic acid was used in combination with stiff (glass coverslip) or soft (BD Matrigel diluted 1:10 in EBMTM-2 medium) substrates. The soluble factors were used to simulate the vascular-related signals, while soft or stiff substrates were employed to reproduce mechanical loading forces. It is expected that cells may respond differently according to the specific stimuli they exposed to. OA-IFP stem cells seeded on plastic surface of 24 well plate (5×10^3 cells/cm²) and cultured in proliferation medium represented the control-group.

At 3 and 7 days, the cultures were observed by a Leica DMR microscope endowed with a Nikon Digital Sight Ds-SMCc camera (Nikon Corporation) and pictures at 10x were processed through ImageJ software as described by Guidolin et al., 2004 to detect the branches (i.e., number and length) and the branching points.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Sand Diego, CA, United States). Data referring to age and body mass index of the patients were expressed as median and interquartile range. All experimental data were expressed as average of three different experiments (technical replicates) \pm Standard Deviation (SD) referring to nine patients. Statistical significance was determined by unpaired *t*-test and results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Cell Isolation and Morphology in Culture

IFP tissue samples were obtained from both male ($n = 3$) and female ($n = 6$) patients undergoing TKA (Figures 1A,B). The samples showed the presence of a highly vascularized

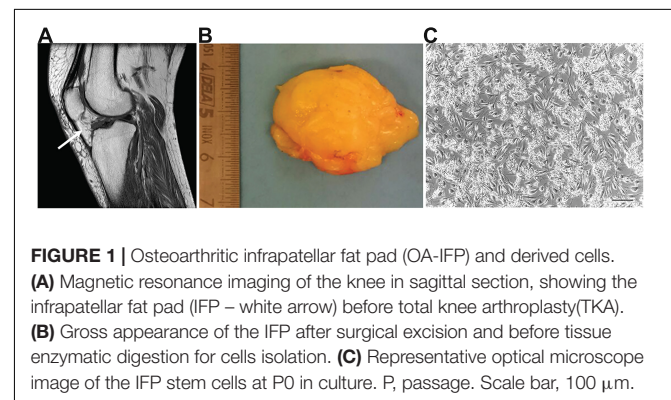


FIGURE 1 | Osteoarthritic infrapatellar fat pad (OA-IFP) and derived cells. **(A)** Magnetic resonance imaging of the knee in sagittal section, showing the infrapatellar fat pad (IFP - white arrow) before total knee arthroplasty (TKA). **(B)** Gross appearance of the IFP after surgical excision and before tissue enzymatic digestion for cells isolation. **(C)** Representative optical microscope image of the IFP stem cells at P0 in culture. P, passage. Scale bar, 100 μ m.

synovial membrane, which was removed before tissue processing in order to obtain only IFP-native stem cells. Tissues had a fibrous consistency; in particular, a certain resistance during fragmentation was encountered in the external layer. On the contrary, the inner layer was less fibrotic.

The whole isolation process was completed in 14 h, considering the over-night incubation period in the presence of the digesting enzyme collagenase B. At the end of the isolation protocol, the cells were resuspended in the proliferation medium and seeded at high density. It was not possible to accurately determine the mean total number of cells extracted from each sample due to the presence of extracellular matrix (ECM) fragments in suspension hindering the total cell count. However, high cell density as well as the maintenance of matrix residues were necessary to optimize cell adhesion and survival in monolayer culture (Figure 1C); tissue debris were then easily removed by subsequent changes of medium and passages in culture.

Long-Term Proliferation Potential and Metabolic Activity of OA-IFP Cells

In culture, OA-IFP stem cells showed a typical spindle-like morphology which was maintained along passages in culture (Figure 2A). The proliferation rate of OA-IFP cells was evaluated in 12 consecutive generations to assess their ability to sustain long-term culture without reaching senescence. As reported by Figure 2B, from passage 8th to 20th the stem cells had performed 11.9 ± 8.3 population doublings. Vitality was also confirmed by specific staining using fluorescent dyes (Figure 2C).

MTT assay was used to assess OA-IFP stem cells metabolic activity also demonstrating a progressive cell growth at different endpoints (Figure 2D). From 24 to 48 h after seeding, the cell number varied moderately due to an initial slow expansion. Since day 5th, the metabolic activity and the cell number increased and the same trend was observed at day 7.

At 14 days from seeding, the contact inhibition between cells at confluence influenced the metabolic activity resulting in a slower cell growth.

Morphology and Metabolic Stress-Related Markers

Toluidine blue staining displayed cells with a regular appearance and deeply blue-stained vesicles distributed in perinuclear areas (Figure 3A). At TEM analysis, ultrastructural cell constituents like mitochondria, rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, secretion vesicles were clearly identified in the cytoplasmic area surrounding cell nucleus which appeared voluminous and bordered by a thin and regular membrane (Figures 3B,C). Lysosomes were also recognized within the cytoplasm appearing as rounded formations of electron-dense material corresponding to those deeply stained with toluidine-blue in Figure 3A. Interestingly, TEM analysis also allowed to discriminate apparently empty round vesicles surrounding the dense ones. Such non-electron dense elements showed the presence of a thin honeycomb-like structure; in some contact areas, a partial fusion between the external membranes of the

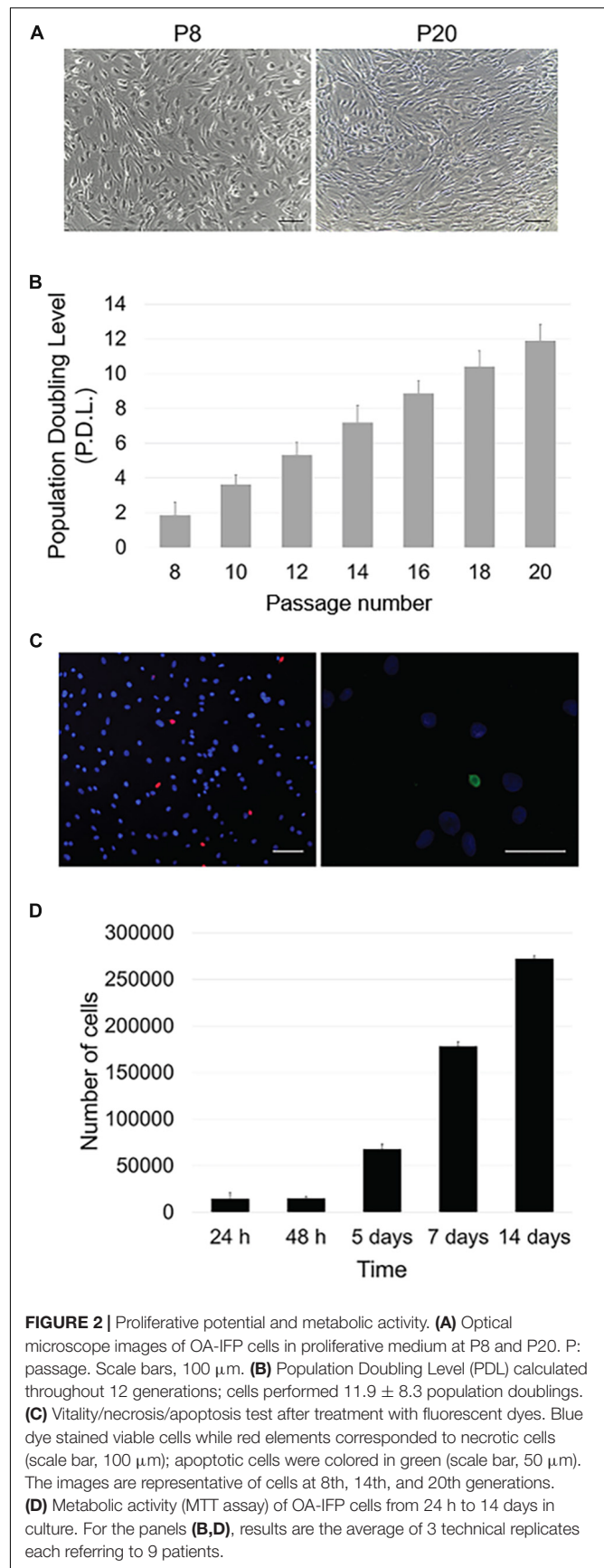


FIGURE 2 | Proliferative potential and metabolic activity. **(A)** Optical microscope images of OA-IFP cells in proliferative medium at P8 and P20. P: passage. Scale bars, 100 μ m. **(B)** Population Doubling Level (PDL) calculated throughout 12 generations; cells performed 11.9 ± 8.3 population doublings. **(C)** Vitality/necrosis/apoptosis test after treatment with fluorescent dyes. Blue dye stained viable cells while red elements corresponded to necrotic cells (scale bar, 100 μ m); apoptotic cells were colored in green (scale bar, 50 μ m). The images are representative of cells at 8th, 14th, and 20th generations. **(D)** Metabolic activity (MTT assay) of OA-IFP cells from 24 h to 14 days in culture. For the panels **(B,D)**, results are the average of 3 technical replicates each referring to 9 patients.

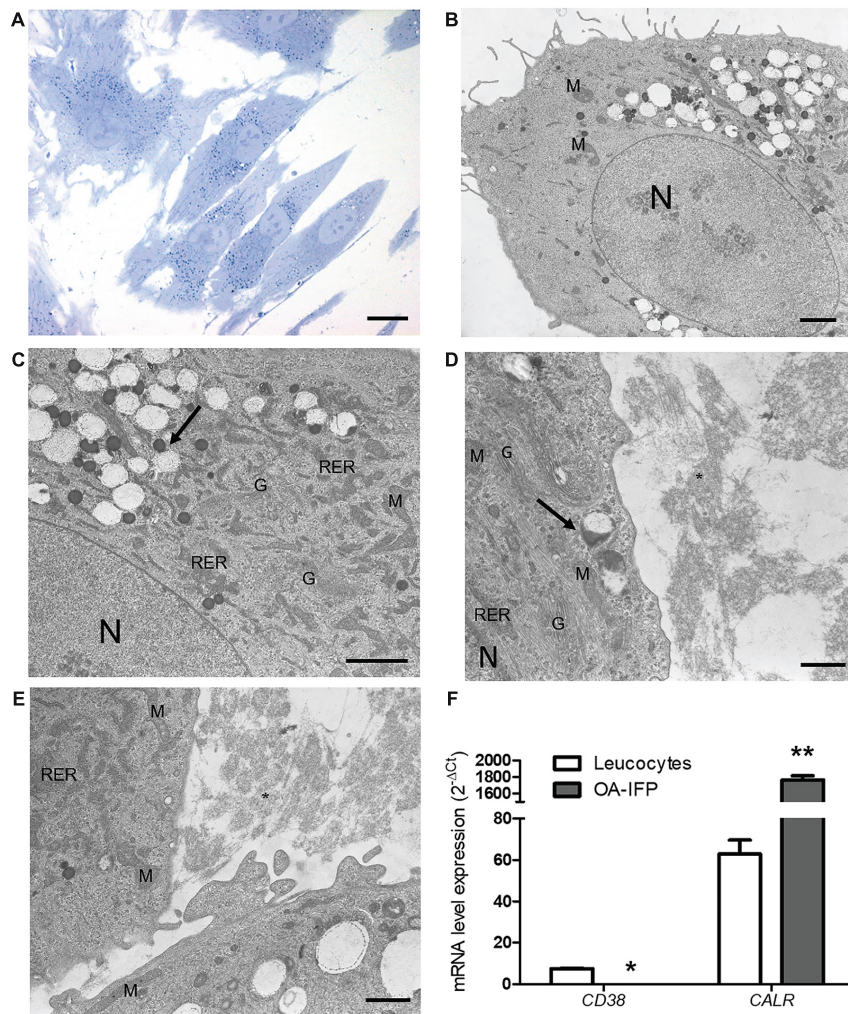


FIGURE 3 | Ultrastructural characterization of OA-IFP stem cells. Toluidine Blue staining images (A) and TEM micrographs (B–E) of OA-IFP cells at P8 in culture. Black arrows in (C) and (D) show electron dense lysosomes and empty vesicles. Black asterisk in (E) shows secretion material resembling collagen fibrils outside the cytoplasm. M, mitochondria; N, nucleus; G, golgi apparatus; RER, rough endoplasmic reticulum. Scale bars, (A) 20 μm ; (B) and (C) 2 μm ; (D) and (E) 1 μm . (F) mRNA expression levels of CD38 and CALR in OA-IFP stem cells compared to human leukocytes (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). For panel (F), results are the average of 3 technical replicates referring to 9 patients.

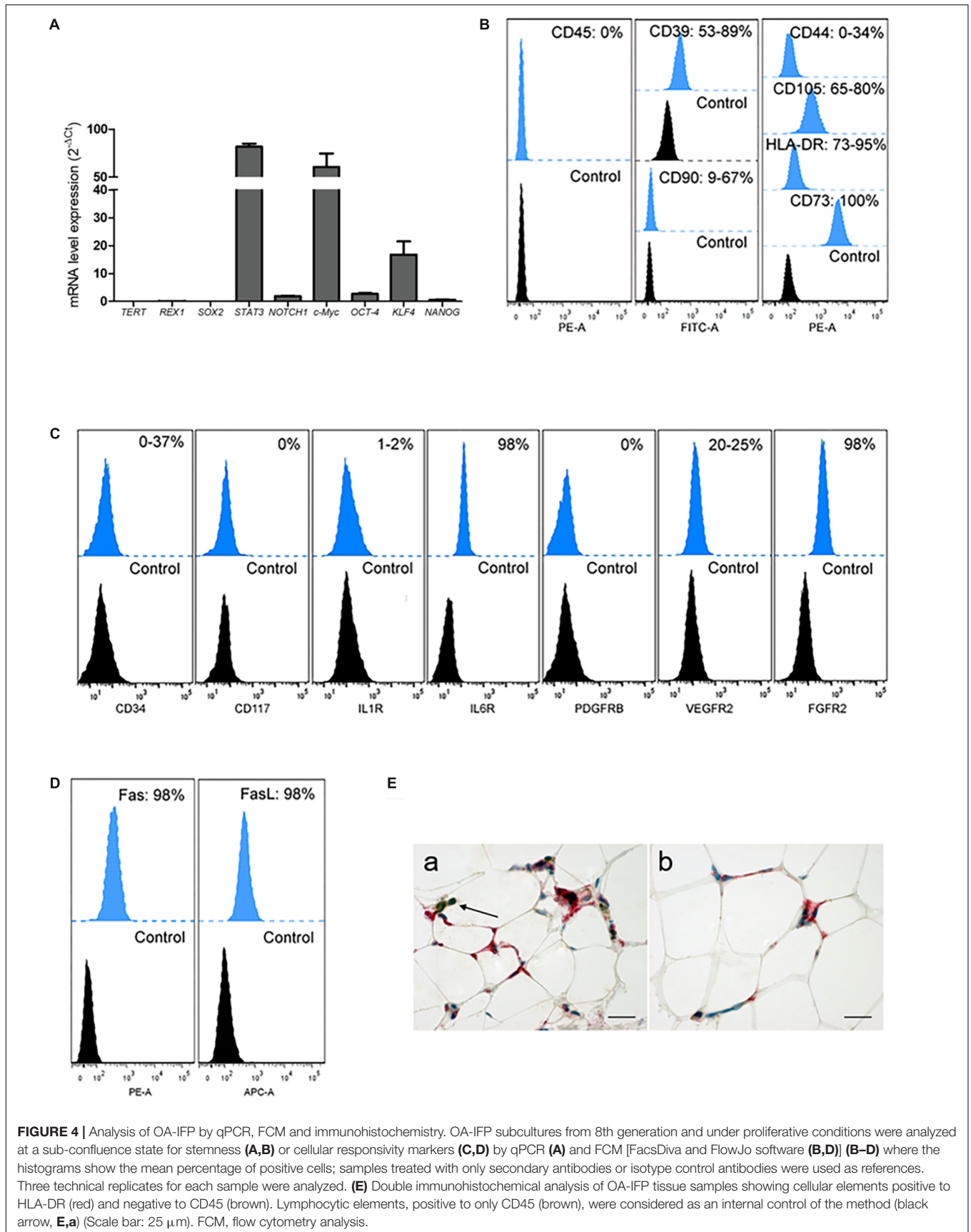
two vesicles types occurred. Filamentous and disorganized cell secretion products were localized in proximity to cell membrane (Figures 3D,E).

From the metabolic point of view, the analysis by qPCR on OA-IFP stem cells *versus* leukocytes, showed null-expression of mRNA for *CD38* and significantly ($P < 0.01$) higher levels of *calreticulin* gene (Figure 3F).

Multipotency of OA-IFP Stem Cells

During *in vitro* short and prolonged expansion, the active mRNA expression of *NANOG*, *c-Myc*, *NOTCH1*, *KLF4* and *STAT3* (Figure 4A) proved a multipotential grade of OA-IFP stem cells. By FACS analysis (Figures 4B,C) OA-IFP populations evidenced an almost homogenous immunophenotypic profile. In particular, the samples showed to be over 90% positive for the mesenchymal stem cell marker CD73, FGFR2, and

IL6R suggesting both immunomodulatory activity and cellular responsivity to IFP- and OA-microenvironmental secreted factors. The cellular multipotency was confirmed by the detection of CD105, CD90, and CD44, whose variable expression among donors was hypothesized to be related to the age or inflammation state of patients. Due to their significant expression of HLA-DR ($\geq 90\%$), Fas/FasL ($\geq 98\%$), CD39, VEGFR2, and, only in some cases, of CD34, OA-IFP stem cells could represent a cellular compartment primed by chronic inflammatory conditions (Figures 4C,D). The null expression of CD45, CD117, and PDGFR β excluded their possible derivation from hematopoietic/endothelial progenitors or perivascular stem cell niche (Figures 4B,C). Double immunohistochemistry on OA-IFP tissue samples confirmed the presence of cellular elements (Figure 4E) simultaneously positive to HLA-DR and negative to CD45 (Figure 4C). Taken together, our collected data evidenced



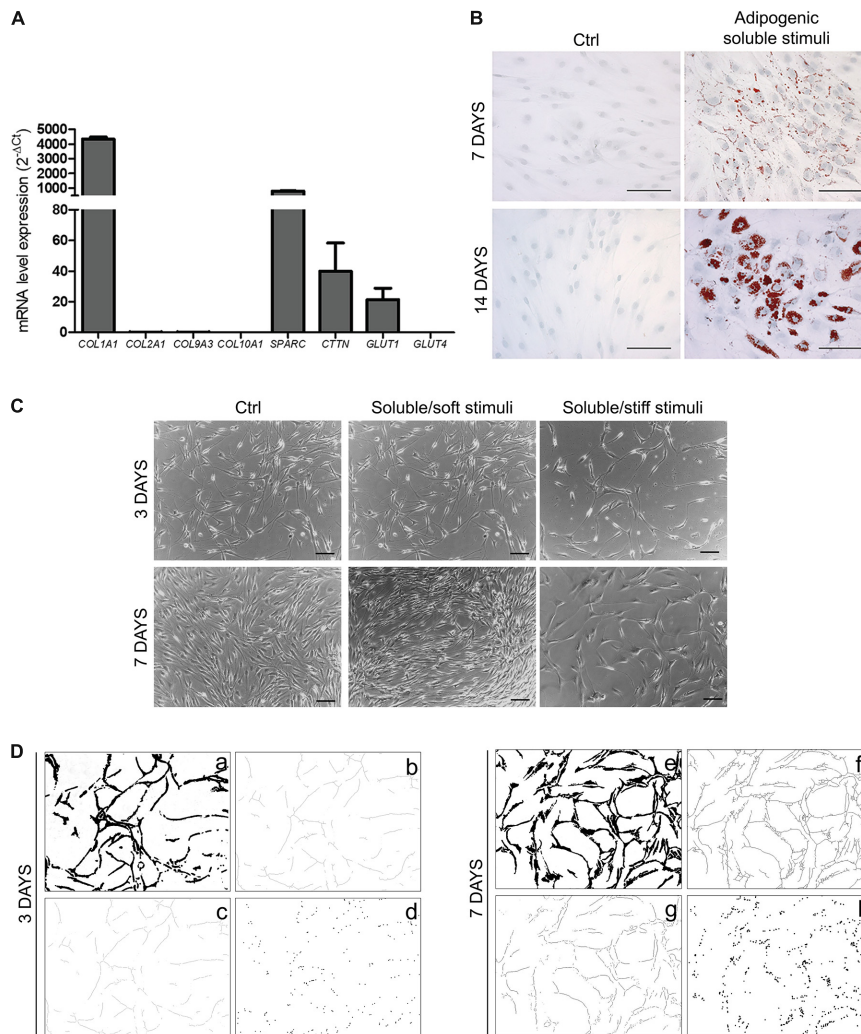


FIGURE 5 | OA-IFP stem cells responsiveness to environmental stimuli. **(A)** qPCR analysis of mRNA expression levels of *COL1A1*, *SPARC*, *GLUT1*, and *CTTN* gene on OA-IFP stem cells at a sub-confluence state; null-expression of *GLUT4*, *CTTN*, *COL2A1*, *COL9A3*, *COL10A1* mRNAs was detected. **(B)** Response of OA-IFP stem cells to adipogenic stimuli. After 7 and 14 days from stimulation, the cells showed cytoplasmic red-stained lipid droplets; scale bars, 100 μ m. **(C)** Response of OA-IFP stem cells to soluble (endothelial medium enriched of angiogenic factors) and mechanical stimuli (stiff and soft support) at 3 and 7 days from stimulation. OA-IFP stem cells seeded on plastic surface and cultured in proliferation medium represented the control-group; scale bars, 100 μ m. **(D)** Image processing steps of images referring to OA-IFP stem cells cultured on stiff support, at 3 and 7 days from stimulation. After edge detection and threshold binary tools **(a,e)** the skeletons were calculated **(b,f)**, before the analysis of branches (i.e., number and length) **(c,g)** and branching points **(d,h)**. The processed images highlight the formation of the cord-like structures. For panel **(A)**, results are the average of 3 technical replicates for each sample referring to 9 patients.

distinctive immunophenotypic properties of OA-IFP compared to other multipotent populations isolated from IFP.

Differentiation Potential and Response to Environmental Stimuli of OA-IFP Stem Cells

Under resting conditions, OA-IFP stem cells also demonstrated to have a differentiation potential into chondrogenic, and osteogenic lineages producing mRNAs of *COL1A1*, *SPARC*, and *GLUT1*; in addition, the significant expression of *cortactin/CTTN* gene suggested that the differentiation of OA-IFP stem cells might be regulated by mechano-transduction (**Figure 5A**). When

treated with adipogenic stimuli, the cells acquired distinct functionality as demonstrated by the cytoplasmic accumulation of lipid droplets (**Figure 5B**). Moreover, combining specific soluble (endothelial medium enriched with angiogenic factors) and mechanical stimuli (stiff or soft), OA-IFP cells showed different behaviors (**Figure 5C**). On glass (i.e., stiff support) cells acquired an elongated morphology, describing cord-like structures; cell density remained comparable at both end-points (3 and 7 days). On Matrigel (i.e., soft support), an initial response similar to that previously described occurred at day 3. Thereafter cell density increased and the network was no more identifiable. In contrast, the control group did not show any specific cell orientation nor reduction in proliferation.

After processing the images referring to OA-IFP stem cells cultured on stiff support (**Figure 5D**), it was observed a progressive increase in the number and length of the branches (+59.25 and +76.49%, respectively) and in the number of the branching points (+55.28%). The number of the branches increased from 132.43 ± 11.89 (day 3) to 223.50 ± 13.05 (day 7) per square unit (μm^2); the length of the branches (expressed as linear value - μm) increased from 8830.86 ± 639.29 (day 3) to 11543.92 ± 1156.96 (day 7). A variation in the number of the branching points was also observed, from 87.70 ± 11.19 to 158.63 ± 13.44 per square unit (μm^2) at day 3 and 7, respectively.

DISCUSSION

To date, IFP stem cells have been proposed as an alternative to subcutaneous adipose-derived stem cells and an attractive cell source for cartilage regeneration due to their ability for differentiation into chondrocytes, minor immunological rejection and constitutive immunomodulatory properties (Felimban et al., 2014; Ye et al., 2014, 2016; Tangchitphisut et al., 2016; Arora et al., 2017; Sun et al., 2018; Radhakrishnan et al., 2019). Inflammatory processes, microenvironmental changes, chemical factors and physical cues evoke a tissue adaptive and protective response acting in concert on immune cells and/or endogenous stem cells. In contrast to López-Ruiz et al. (2013), in this study we have demonstrated that in OA, IFP-derived stem cells might be reprogrammed by the inflammatory environment preserving multi-differentiative plasticity. Thus, they might exert a protective role in counteracting mechanical overloading through deposition of collagenous matrix.

In accordance with the peculiar clinical OA framework, the patients enrolled in the study suffered from obesity, hypertension, dyslipidemia and type 2 diabetes, that are all conditions of chronic stress (Courties et al., 2017) affecting joint structures, including IFP and its cellular compartments.

Showing adherent and spindle-like morphology, OA-IFP stem cells were proved to have a high metabolic activity and a population doubling time of 42.7 ± 3.8 h likely adipose stem cells (Peng et al., 2008).

As previously described by López-Ruiz et al. (2013), TEM analysis on OA-IFP stem cells evidenced a cytoplasm rich in transport/storage vesicles and deeply stained/electron dense structures, rough endoplasmic reticulum and mitochondria. Higher magnifications also suggested the presence of autolysosomes, a product of fusion of lysosomes (dark, electron dense vesicles) and autophagosomes (large, white vacuoles) that are deputed to autophagy (Revuelta and Matheu, 2017; Boya et al., 2018), a process that have been suggested to have a role in OA development (Deng et al., 2019). In fact, there is consensus in claiming that autophagy can be triggered by a variety of internal or external stimuli as well as hypoxia, Reactive Oxygen Species (ROS) and accumulation of unfolded proteins, which are all conditions typically encountered in OA (Hughes et al., 2017).

Acting like scavengers, autolysosomes catabolize undesirable components to provide energy and essential building materials

to maintain cellular homeostasis. Hence, according to these assumptions, OA-IFP stem cells likely switch-on this mechanism to counteract the disease-related stress condition.

Stem cells take advantage from glycolysis to gain energy and regulate the undifferentiated status (Zhang et al., 2016), while mitochondrial function is linked to stem cells activation. The significant amount of mitochondria (Bravo et al., 2011) (as shown also for OA-IFP stem cells by TEM), correlated with the high expression levels of calreticulin gene (Ní Fhlathartaigh et al., 2013). Calreticulin was assumed as an indicator of cell stress condition, activated status and a switched nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent energy metabolism. In OA, it has been reported that the unbalanced biomechanics cause a self-perpetuating cycle of low-grade damage (Scanzello et al., 2008) that, in turn, leads to the production of damage-associated molecular patterns. Cartilage ECM breakdown products, fibronectin and hyaluronic acid (Okamura et al., 2001; Termeer et al., 2002; van Lent et al., 2012) and intracellular alarmins [HMGB1 (Li et al., 2011), S100 proteins (van Lent et al., 2012)] signal on synovial macrophages, synoviocytes, or chondrocytes promoting the local production of numerous inflammatory mediators [IL-1 β (He et al., 2002), VEGF, TNF α , IL-6 (Ushiyama et al., 2003), PDGFs (Pohlert et al., 2006)]. Moreover, regulatory mechanisms involved in controlling NAD⁺ levels have been demonstrated to be affected in OA because of an increased expression of IL- β and a compromised activity of NADases (Kobayashi et al., 2017). Thus, endoplasmic reticulum stress and highly expressed vacuoles in concert with the expression of prognostic OA marker IL-1 β R1 highlight the occurrence of a strict correlation between OA-IFP biology and the inflammatory microenvironment (Daheshia and Yao, 2008). In addition, CD38/NADase, that is commonly up-regulated to reduce glycolytic and mitochondrial metabolism in OA (Chang et al., 2014), is not expressed in OA-IFP stem cells suggesting an impairment of the regulative mechanisms responsible of metabolic activity. Compared to other IFP-derived multipotent cells (Wickham et al., 2003; López-Ruiz et al., 2013; Garcia et al., 2016; Courties et al., 2017; do Amaral et al., 2017; Hindle et al., 2017), the OA-IFP stem cells investigated in this study have demonstrated not only distinct functional abilities but also characteristic immunophenotypic properties. Differences may probably be attributable to peculiarities in the patients cohort (i.e., age and disease severity) and/or in the isolation protocol (i.e., digestion times and processing phases of the digested tissue). In particular, the population showed the expression of *STAT3*, *NOTCH1*, *c-Myc*, *OCT-4*, *KLF4*, and *NANOG*, suggesting to have high self-renewal potential (Graf and Stadtfeld, 2008) while confirming their inflammation-activated state through the expression of HLA-DR, Fas and FasL (Hashimoto et al., 1998; Kim et al., 2000; Wickham et al., 2003), as already observed in patients affected by OA. These data are in line with the hypothesis that the inflammatory nature of the fat pad could condition endogenous stem cell niche upregulating HLA-DR (Wickham et al., 2003), but not promoting the expression of costimulatory molecules (Rübenhagen et al., 2012; Greene and Loeser, 2015). Due to the expression of CD34, a derivation of OA-IFP stem cells from adipose tissue (Bourin et al., 2013) or

vascular endothelial compartment (Traktuev et al., 2008) can be hypothesized. While a derivation from perivascular niche is unlikely, as the pericyte marker PDGFR β expression was lacking. Moreover, the expression of adhesion molecules (CD44, CD105), receptors for growth factors (VEGFR2, FGFR2) and cytokines (IL1R, IL6R) together with mRNA transcript of *cortactin* (*CTTN*) suggested a high level of microenvironmental responsiveness, further supporting the hypothesis that they are an endogenous subpopulation primed by the inflammatory milieu and able to switch to adaptive fibrogenic reprogramming under unbalanced mechanical stimuli or dysregulated mechano-transduction. It is known that extracellular ATP levels increase in response to tissue-disturbing events, including inflammation, hypoxia or ischemia (Di Virgilio and Adinolfi, 2017). Based on our data, despite expressing a typical anti-inflammatory signature mediated by CD39 and CD73 (Eltzschig, 2013), OA-IFP stem cells could be limited *in vivo* to control the complex immune response related to OA. OA-IFP tissue is characterized by highly vascularized adipose lobuli separated by thickened septa (Favero et al., 2017; Fontanella et al., 2017) that, in turn, could prime endogenous stem cell populations. In our study, OA-IFP stem cells responded to adipogenic stimuli by accumulating lipid cytoplasmic droplets; in parallel, when stimulated with combined endothelial and mechano-transduction factors, net-like structures were observed on stiff-surface while a disorganized cell distribution was evidenced on soft matrix. Thus, the formation of net-like structures correlated with the high expression level of *COL1A1* gene may suggest the potential involvement of OA-IFP stem cells to exert *in vivo* a protective response against mechanical overloading by thickening the fibrous septa. This adaptive-behavior is supported by significant body of evidence in the literature; the cells, including mesenchymal stem cells, can sense mechanical stress and soluble stimuli and translate such information in adaptive responses including differentiation, changes in morphology and cytoskeletal dynamics, also varying gene expression (McBeath et al., 2004; Chiquet et al., 2007, 2009). In OA, it is conceivable that stem cells expressing ectonucleotides and adenosine deaminase like OA-IFP cells could contribute *in vivo* to the generation of extracellular adenosine, that is a recognized checkpoint mediator for immune suppression (English and Mahon, 2011). Based on the evidence that OA-IFP stem cells have a low expression of *CD38/NADase*, we speculated that they could not be effective to counteract NAD⁺-mediated inflammation which is an important signature of OA.

Future pre-clinical studies based on OA-IFP stem cells will be useful to highlight their active or passive role in chronic

OA-inflammation. In particular, functional studies developed in animal models of OA with adequate control-population will allow for a more specific understanding of OA-IFP stem cells behavior and role.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

This study was performed after receiving Institutional Review Board approval (CESC Code: 4510/AO/18). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ES, AnP, RDL, RDC, and VM: conception and design of the study. ES, SB, MP, EB, LP, and AsP: data acquisition. ES, RR, MR, MF, PR, RDL, and VM: data analysis and interpretation. ES and MP: drafting the article. All authors aided in revising this manuscript for intellectual content and approved the final version to be published.

FUNDING

This work was supported by the LifeLab Program of the “Consorzio per la Ricerca Sanitaria (CORIS)” of the Veneto Region, Italy (DGR1017, 17 July 2018) and the Dotazione Ordinaria Ricerca (DOR) of Di Liddo, for the year 2018. The funding sources had no role in this research.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the “Consorzio per la Ricerca Sanitaria” (CORIS) of the Veneto Region, Italy (LifeLab Program) for financial support. The authors would also like to thank Mrs. Alessandra Dubrovic for her contribution in immunohistochemical analysis, Dr. Diego Guidolin, Dr. Enrico De Rose, Paola Tomić, and Silvia Schiavon for technical support.

REFERENCES

- Arora, A., Sriram, M., Kothari, A., and Katti, D. S. (2017). Co-culture of infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stromal cells and articular chondrocytes in plasma clot for cartilage tissue engineering. *Cytotherapy* 19, 881–894. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.04.003
- Belluzzi, E., El Hadi, H., Granzotto, M., Rossato, M., Ramonda, R., Macchi, V., et al. (2017). Systemic and local adipose tissue in knee osteoarthritis. *J. Cell Physiol.* 232, 1971–1978. doi: 10.1002/jcp.25716
- Belluzzi, E., Stocco, E., Pozzuoli, A., Granzotto, M., Porzionato, A., Vettor, R., et al. (2019). Contribution of infrapatellar fat pad and synovial membrane to knee osteoarthritis pain. *Biomed. Res. Int.* 2019:6390182. doi: 10.1155/2019/6390182
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., et al. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the international federation for adipose therapeutics and science (IFATS) and the international society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15, 641–648. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006

- Boya, P., Codogno, P., and Rodriguez-Muela, N. (2018). Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming. *Development* 145:dev146506. doi: 10.1242/dev.146506
- Bravo, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J. P., Bui, M., et al. (2011). Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J. Cell Sci.* 124, 2143–2152. doi: 10.1242/jcs.080762
- Chang, X., Yue, L., Liu, W., Wang, Y., Wang, L., Xu, B., et al. (2014). CD38 and E2F transcription factor 2 have uniquely increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *Clin. Exp. Immunol.* 176, 222–231. doi: 10.1111/cei.12268
- Chiquet, M., Gelman, L., Lutz, R., and Maier, S. (2009). From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 911–920. doi: 10.1016/j.bbamer.2009.01.012
- Chiquet, M., Tunç-Civelek, V., and Sarasa-Renedo, A. (2007). Gene regulation by mechanotransduction in fibroblasts. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32, 967–973.
- Courties, A., Sellam, J., and Berenbaum, F. (2017). Metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 29, 214–222. doi: 10.1097/BOR.0000000000000373
- Daheshia, M., and Yao, J. Q. (2008). The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 35, 2306–2312.
- Deng, Z., Li, Y., Liu, H., Xiao, S., Li, L., Tian, J., et al. (2019). The role of sirtuin 1 and its activator, resveratrol in osteoarthritis. *Biosci. Rep.* 39:BSR20190189. doi: 10.1042/BSR20190189
- Di Virgilio, F., and Adinolfi, E. (2017). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 36, 293–303. doi: 10.1038/onc.2016.206
- do Amaral, R. J. F. C., Almeida, H. V., Kelly, D. J., O'Brien, F. J., and Kearney, C. J. (2017). Infrapatellar fat pad stem cells: from developmental biology to cell therapy. *Stem Cells Int.* 2017:6843727. doi: 10.1155/2017/6843727
- Eltzschig, H. K. (2013). Extracellular adenosine signaling in molecular medicine. *J. Mol. Med.* 91, 141–146.
- English, K., and Mahon, B. P. (2011). Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation. *J. Cell. Biochem.* 112, 1963–1968. doi: 10.1002/jcb.23119
- Favero, M., El-Hadi, H., Belluzzi, E., Granzotto, M., Porzionato, A., Sarasin, G., et al. (2017). Infrapatellar fat pad features in osteoarthritis: a histopathological and molecular study. *Rheumatology* 56, 1784–1793. doi: 10.1093/rheumatology/kex287
- Favero, M., Ramonda, R., Goldring, M. B., Goldring, S. R., and Punzi, L. (2015). Early knee osteoarthritis. *RMD Open* 1:e000062. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000062
- Felimban, R., Ye, K., Traianedes, K., Di Bella, C., Crook, J., Wallace, G. G., et al. (2014). Differentiation of stem cells from human infrapatellar fat pad: characterization of cells undergoing chondrogenesis. *Tissue Eng. Part A* 20, 2213–2223. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0657
- Ferroni, L., Gardin, C., Dalla Paola, L., Campo, G., Cimaglia, P., Bellin, G., et al. (2019). Characterization of dermal stem cells of diabetic patients. *Cells* 8:E729. doi: 10.3390/cells8070729
- Fontanella, C. G., Carniel, E. L., Frigo, A., Macchi, V., Porzionato, A., Sarasin, G., et al. (2017). Investigation of biomechanical response of hoffa's fat pad and comparative characterization. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 67, 1–9. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.11.024
- Fontanella, C. G., Macchi, V., Carniel, E. L., Frigo, A., Porzionato, A., Picardi, E. E. E., et al. (2018). Biomechanical behavior of hoffa's fat pad in healthy and osteoarthritic conditions: histological and mechanical investigations. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* 41, 657–667. doi: 10.1007/s13246-018-0661-8
- Garcia, J., Wright, K., Roberts, S., Kuiper, J. H., Mangham, C., Richardson, J., et al. (2016). Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: the influence of tissue source and inflammatory stimulus. *Sci. Rep.* 6:24295. doi: 10.1038/srep24295
- Gerlier, D., and Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* 94, 57–63.
- Graf, T., and Stadtfeld, M. (2008). Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 480–483. doi: 10.1016/j.stem.2008.10.007
- Grandi, F., Stocco, E., Barbon, S., Rambaldo, A., Contran, M., Fascetti Leon, F., et al. (2018). Composite scaffolds based on intestinal extracellular matrices and oxidized polyvinyl alcohol: a preliminary study for a new regenerative approach in short bowel syndrome. *Biomed. Res. Int.* 2018:7824757. doi: 10.1155/2018/7824757
- Greene, M. A., and Loeser, R. F. (2015). Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1966–1971. doi: 10.1016/j.joca.2015.01.008
- Guidolin, D., Vacca, A., Nussdorfer, G. G., and Ribatti, D. (2004). A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the matrigel assay in vitro. *Microvasc. Res.* 67, 117–124.
- Hashimoto, H., Tanaka, M., Suda, T., Tomita, T., Hayashida, K., Takeuchi, E., et al. (1998). Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 657–662.
- He, W., Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J., Laufer, S., and Di Battista, J. A. (2002). Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J. Rheumatol.* 29, 546–553.
- Hindle, P., Khan, N., Biant, L., and Péault, B. (2017). The infrapatellar fat pad as a source of perivascular stem cells with increased chondrogenic potential for regenerative medicine. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 77–87. doi: 10.5966/sctm.2016-0040
- Hughes, A., Oxford, A. E., Tawara, K., Jorczyk, C. L., and Oxford, J. T. (2017). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cartilage pathophysiology; contributing factors to apoptosis and osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 20:18.
- Huri, P. Y., Hamsici, S., Ergene, E., Huri, G., and Doral, M. N. (2018). Infrapatellar fat pad-derived stem cell-based regenerative strategies in orthopedic surgery. *Knee Surg. Relat. Res.* 30, 179–186. doi: 10.5792/ksrr.17.061
- Im, G. I. (2018). Tissue engineering in osteoarthritis: current status and prospect of mesenchymal stem cell therapy. *BioDrugs* 32, 183–192. doi: 10.1007/s40259-018-0276-3
- Ioan-Facsinay, A., and Kloppenburg, M. (2013). An emerging player in knee osteoarthritis: the infrapatellar fat pad. *Arthritis Res. Ther.* 15:225.
- Kim, H. A., Lee, Y. J., Seong, S. C., Choe, K. W., and Song, Y. W. (2000). Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 27, 455–462.
- Kobayashi, H., Terauchi, K., Yui, N., Yatabe, K., Kamada, T., Fujiyama, H., et al. (2017). The nicotinamide adenine dinucleotide (n.d.)-dependent deacetylasesirtuin-1 regulates chondrocyte energy metabolism through the modulation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in osteoarthritis (OA). *J. Arthritis* 6:2.
- Li, Z., Cheng, G., Hu, K., Li, M., Zang, W., Dong, Y., et al. (2011). Correlation of synovial fluid HMGB-1 levels with radiographic severity of knee osteoarthritis. *Clin. Invest. Med.* 34:E298.
- López-Ruiz, E., Perán, M., Cobo-Molinos, J., Jiménez, G., Picón, M., Bustamante, M., et al. (2013). Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 246–258. doi: 10.1016/j.joca.2012.10.007
- Macchi, V., Stocco, E., Stecco, C., Belluzzi, E., Favero, M., Porzionato, A., et al. (2018). The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomofunctional unit. *J. Anat.* 233, 146–154. doi: 10.1111/joa.12820
- Marrelli, M., Paduano, F., and Tatullo, M. (2013). Cells isolated from human peripapillary cysts express mesenchymal stem cell-like properties. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1070–1078. doi: 10.7150/ijbs.6662
- McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., and Chen, C. S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483–495.
- Michael, S., Achilleos, C., Panayiotou, T., and Strati, K. (2016). Inflammation shapes stem cells and stemness during infection and beyond. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:118. doi: 10.3389/fcell.2016.00118
- Michaud, C. M., McKenna, M. T., Begg, S., Tomijima, N., Majmudar, M., Bulzacchelli, M. T., et al. (1996). The burden of disease and injury in the United States. *Popul. Health Metr.* 4:11.
- Naik, S., Larsen, S. B., Cowley, C. J., and Fuchs, E. (2018). Two to tango: dialog between immunity and stem cells in health and disease. *Cell* 175, 908–920. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.071
- Ní Fhlathartaigh, M., McMahon, J., Reynolds, R., Connolly, D., Higgins, E., Counihan, T., et al. (2013). Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol. Commun.* 1:37. doi: 10.1186/2051-5960-1-37

- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., et al. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229–10233.
- Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., et al. (2008). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 17, 761–773. doi: 10.1089/scd.2007.0217
- Pohlars, D., Huber, R., Ukena, B., and Kinne, R. W. (2006). Expression of platelet-derived growth factors C and D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 788–794.
- Poonpet, T., and Honsawek, S. (2014). Adipokines: biomarkers for osteoarthritis? *World J Orthop* 5, 319–327. doi: 10.5312/wjo.v5.i3.319
- Radhakrishnan, S., Trentz, O. A., Martin, C. A., Reddy, M. S., Rela, M., Chinnarasu, M., et al. (2019). Effect of passaging on the stemness of infrapatellar fat pad-derived stem cells and potential role of nucleostemin as a prognostic marker of impaired stemness. *Mol. Med. Rep.* 20, 813–829. doi: 10.3892/mmr.2019.10268
- Revuelta, M., and Matheu, A. (2017). Autophagy in stem cell aging. *Aging Cell* 16, 912–915. doi: 10.1111/acer.12655
- Rübenhagen, R., Schüttrumpf, J. P., Stürmer, K. M., and Frosch, K. H. (2012). Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis. *Acta Orthop.* 83, 59–64. doi: 10.3109/17453674.2011.645195
- Scanzello, C. R., Plaas, A., and Crow, M. K. (2008). Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? *Curr. Opin. Rheumatol.* 20, 565–572. doi: 10.1097/BOR.0b013e32830aba34
- Stocco, E., Barbon, S., Lora, L., Grandi, F., Sartore, L., Tiengo, C., et al. (2018). Partially oxidized polyvinyl alcohol conduit for peripheral nerve regeneration. *Sci. Rep.* 8:604. doi: 10.1038/s41598-017-19058-3
- Sun, Y., Chen, S., and Pei, M. (2018). Comparative advantages of infrapatellar fat pad: an emerging stem cell source for regenerative medicine. *Rheumatology* 57, 2072–2086. doi: 10.1093/rheumatology/kex487
- Tangchitphisut, P., Srikaew, N., Numhom, S., Tangprasittipap, A., Woratanarat, P., Wongsak, S., et al. (2016). Infrapatellar fat pad: an alternative source of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis* 2016:4019873. doi: 10.1155/2016/4019873
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., et al. (2002). Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 195, 99–111.
- Toussiro, E., Streit, G., and Wendling, D. (2007). The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1095–1100.
- Traktuev, D. O., Merfeld-Clauss, S., Li, J., Kolonin, M., Arap, W., Pasqualini, R., et al. (2008). A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* 102, 77–85.
- Ushiyama, T., Chano, T., Inoue, K., and Matsusue, Y. (2003). Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 108–112.
- van Lent, P. L., Blom, A. B., Schelbergen, R. F., Sløetjes, A., Lafèber, F. P., Lems, W. F., et al. (2012). Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 1466–1476. doi: 10.1002/art.34315
- Wickham, M. Q., Erickson, G. R., Gimble, J. M., Vail, T. P., and Guilak, F. (2003). Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 412, 196–212.
- Ye, K., Felimban, R., Traianedes, K., Moulton, S. E., Wallace, G. G., Chung, J., et al. (2014). Chondrogenesis of infrapatellar fat pad derived adipose stem cells in 3D printed chitosan scaffold. *PLoS One* 9:e99410. doi: 10.1371/journal.pone.0099410
- Ye, K., Traianedes, K., Choong, P. F., and Myers, D. E. (2016). Chondrogenesis of human infrapatellar fat pad stem cells on acellular dermal matrix. *Front. Surg.* 3:3. doi: 10.3389/fsurg.2016.00003
- Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., et al. (2016). NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science* 352, 1436–1443. doi: 10.1126/science.aaf2693

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Stocco, Barbon, Piccione, Belluzzi, Petrelli, Pozzuoli, Ramonda, Rossato, Favero, Ruggieri, Porzionato, Di Liddo, De Caro and Macchi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.