



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

L'ingegneria tissutale nella rigenerazione della cartilagine

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureando: Lorenzo Merlin

**Data:
A.A. 2022/2023**

**Firma laureando
Lorenzo Merlin**

**Firma relatore
Andrea Bagno**

SOMMARIO

Negli ultimi decenni le malattie degenerative che colpiscono la cartilagine articolare, come l'osteoartrite, sono diventate sempre più frequenti diminuendo la qualità di vita dei pazienti. Si sono studiate molte tecniche per limitare il dolore all'articolazione e per cercare di riparare il tessuto danneggiato, ma nessuna di queste ha riportato risultati convincenti a lungo termine.

Una svolta si è ottenuta con l'avvento dell'ingegneria tissutale che ha proposto nuove possibili terapie attraverso l'utilizzo di cellule autologhe, come condrociti e cellule staminali.

Molte ricerche sono state effettuate per cercare di migliorare la coltivazione in vitro, con molti passi in avanti nello sviluppo di scaffold, bioreattori e di fattori che migliorano la differenziazione delle cellule staminali, come fattori di crescita e stimoli meccanici.

Recenti studi si sono soffermati sull'efficacia delle cellule staminali mesenchimali (MSC) derivate dal tessuto adiposo o dal midollo osseo, come terapia per la rigenerazione della cartilagine, riportando che la natura del tessuto riparato è ialino-simile con conseguente miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

Nonostante ciò, gli studi clinici effettuati sono ancora pochi e con un follow-up a medio termine; pertanto, sono necessari ulteriori studi per verificare la loro efficacia e sicurezza a lungo termine.

Introduzione	3
Capitolo 1. Anatomia del ginocchio.....	5
<i>1.1 Struttura del ginocchio</i>	<i>5</i>
1.1.1 Strutture ossee del ginocchio	5
1.1.2 Strutture legamentose del ginocchio	7
1.1.3 Componenti muscolari	9
<i>1.2 Struttura della cartilagine articolare</i>	<i>10</i>
1.2.1 Cellule cartilaginee	11
1.2.2 Matrice extracellulare:.....	12
Capitolo 2. Degenerazione della Cartilagine	13
2.1 <i>Considerazioni preliminari</i>	13
2.2 <i>Osteoartrite</i>	14
2.2.1 <i>Eziologia</i>	15
2.2.2 <i>Classificazione</i>	17
2.3 <i>Artrite Reumatoide</i>	19
2.3.1 <i>Fattori di rischio</i>	21
2.3.2 <i>Diagnosi</i>	21
Capitolo 3. Tecniche chirurgiche per la riparazione della cartilagine	23
3.1 <i>Arthroscopic debridement</i>	23
3.2 <i>Tecniche di stimolazione del midollo osseo</i>	24
3.3 <i>Mosaicoplastica</i>	25
3.4 <i>Allotrapianto osteocondrale</i>	27
3.5 <i>Impianto autologo di condrociti</i>	28
3.6 <i>L'artroplastica del ginocchio</i>	30
3.6.1 <i>Artroplastica unicompartimentale</i>	30
3.6.2 <i>Artroplastica totale del ginocchio</i>	31
3.6.3 <i>Revisione dell'artroplastica totale del ginocchio</i>	32
Capitolo 4. L'ingegneria tissutale nella rigenerazione della cartilagine.....	34
4.1 <i>Introduzione</i>	34
4.2 <i>Selezione del tipo cellulare.....</i>	35
4.2.1 <i>Condrociti.....</i>	35
4.2.2 <i>Cellule staminali</i>	36
4.3 <i>Bioreattori</i>	37
4.3.1 <i>Bioreattori Spinner Flasks (SFs)</i>	37
4.3.2 <i>Bioreattori a parente rotante (RWVs)</i>	38
4.3.3 <i>Bioreattori a perfusione</i>	39
4.3.4 <i>Bioreattore a compressione.....</i>	39
4.3.5 <i>Bioreattori magnetici.....</i>	40
4.3.6 <i>Stimoli meccanici</i>	40

<i>4.4 Differenziazione condrogenica</i>	41
4.4.1 Fattori di crescita	42
4.4.2 Scaffold	45
Capitolo 5. Studi clinici sulla rigenerazione della cartilagine	48
Conclusioni	60
Ringraziamenti	61
Bibliografia	62

Introduzione

Le patologie legate alla cartilagine sono un problema ampiamente diffuso: circa 50 milioni di adulti negli Stati Uniti sono colpiti da artrite, con un incremento previsto del 60% nei prossimi due decenni a fronte del progressivo invecchiamento della popolazione e il crescente problema dell'obesità. Attualmente, ogni anno negli Stati Uniti vengono applicate più di 250.000 protesi del ginocchio e dell'anca per insufficienza articolare.

I trattamenti più diffusi per la riparazione della cartilagine articolare includono: microfrattura, mosaicoplastica, innesto di condrociti autologhi (Autologous Chondrocyte Implantation, ACI) e allotrapianto osteocondrale. Sebbene queste tecniche siano riuscite ad alleviare il dolore e a migliorare la funzione articolare, ciascuna di esse presenta degli svantaggi che possono scoraggiarne l'applicazione clinica a lungo termine. Ad esempio, la cartilagine prodotta con queste tecniche è spesso composta da collagene di tipo I (caratteristico della fibrocartilagine), che è biomeccanicamente inferiore alla cartilagine ialina. Altri svantaggi dei trattamenti attuali sono la morbilità del sito di donazione, le procedure chirurgiche complicate e i rischi di infezione e rigetto dell'innesto. In casi di patologie degenerative allo stadio finale, il principale trattamento medico è la sostituzione, totale o parziale, dell'articolazione del ginocchio, procedura che non sempre porta a un miglioramento della qualità della vita del paziente.

L'ingegneria tissutale è un campo in evoluzione che ha il potenziale di fornire soluzioni permanenti ai danni e alle perdite di tessuto a milioni di persone ogni anno [1].

Negli ultimi anni sono stati proposti diversi metodi di formazione di un nuovo tessuto attraverso l'uso di cellule proprie della cartilagine, i condrociti, oppure attraverso l'uso di cellule staminali. Infatti, l'ingegneria tissutale si occupa dell'applicazione combinata dei principi delle scienze della vita e dell'ingegneria per comprendere le relazioni strutturali e funzionali nei tessuti fisiologici e patologici, utilizzando biomateriali come supporti. Questo settore multidisciplinare della scienza utilizza le proprietà di un materiale poroso biocompatibile e biodegradabile, sotto forma di impalcatura o modello tridimensionale (scaffold), su cui vengono seminate le cellule per promuovere la crescita del tessuto.

Stadio fondamentale nell'applicazione dell'ingegneria tissutale è la messa a punto di sistemi per la coltura in vitro di cellule, attraverso la progettazione di bioreattori che si occupano del nutrimento e della stimolazione dinamica delle stesse.

Recenti studi hanno confermato la possibilità di ottenere una cartilagine rigenerata con una qualità ialino-simile, attraverso terapie basate sull'iniezioni di cellule staminali mesenchimali (MSC) derivate da midollo osseo o dal tessuto adiposo.

Capitolo 1. Anatomia del ginocchio

L'articolazione del ginocchio è la più estesa del nostro corpo, unisce la coscia con la gamba e insieme al piede forma l'arto inferiore. È caratterizzato dalla presenza di un complesso giunto articolare che si ha fra l'estremità distale del femore, l'estremità prossimale della tibia e la patella (o rotula) [2]. Insieme alle articolazioni dell'anca e della caviglia sostiene il peso del corpo quando è in stazione eretta. Tuttavia, l'articolazione del ginocchio deve provvedere a questo sostegno nonostante:

1. sia priva della grande massa muscolare che sostiene e rafforza l'articolazione dell'anca;
2. sia priva dei robusti legamenti che sostiene e rafforza l'articolazione della caviglia;
3. presenti la maggior ampiezza di movimento rispetto alle articolazioni dell'arto inferiore.

1.1 Struttura del ginocchio

Il movimento dell'articolazione è permesso in tutti e tre i piani anatomici (frontale, sagittale e trasversale), questo grazie all'unione di diversi compartimenti articolari [3]:

1. il compartimento femoro-tibiale mediale e quello femoro-tibiale laterale;
2. il compartimento femoro-rotuleo in cui scorre la rotula.

L'articolazione femoro-tibiale nasce dall'incastro tra i condili femorali con i condili tibiali. Distinti in mediale e laterale, i condili femorali sono le due prominente notabili sull'estremità distale del femore; essi presentano un aspetto arrotondato, che produce sostanzialmente due superfici convesse; tale particolarità consente loro un incastro e un'interazione ottimale con la tibia.

L'articolazione femoro-rotulea scaturisce dall'interazione tra la superficie patellare del femore e la superficie posteriore della rotula. La patella fa parte del meccanismo estensorio del ginocchio, trovandosi fra il tendine del muscolo quadricipite femorale e il tendine rotuleo che l'ancora alla tibia.

I tre compartimenti articolari (mediali, laterale e femoro-rotuleo) sono racchiusi in una capsula rinforzata da numerosi legamenti e da espansioni tendinee.

1.1.1 Strutture ossee del ginocchio

Femore

Il femore è l'osso più lungo e grande del corpo umano. Facendo parte delle ossa lunghe, è composto da un corpo centrale (diafisi) e due estremità (epifisi). L'epifisi prossimale, rotondeggiante, si articola con l'anca a livello dell'acetabolo; quella distale, invece, con la tibia

e la rotula. Distalmente, il femore è costituito da due epicondili, mediale e laterale, e sono i punti di inserzione dei legamenti collaterali [2]. Proseguendo, si trovano due superfici ricoperte di cartilagine, i condili, che si suddividono in mediale e prossimale. Lo spazio presente tra i due viene chiamato fossa intercondiloidea.

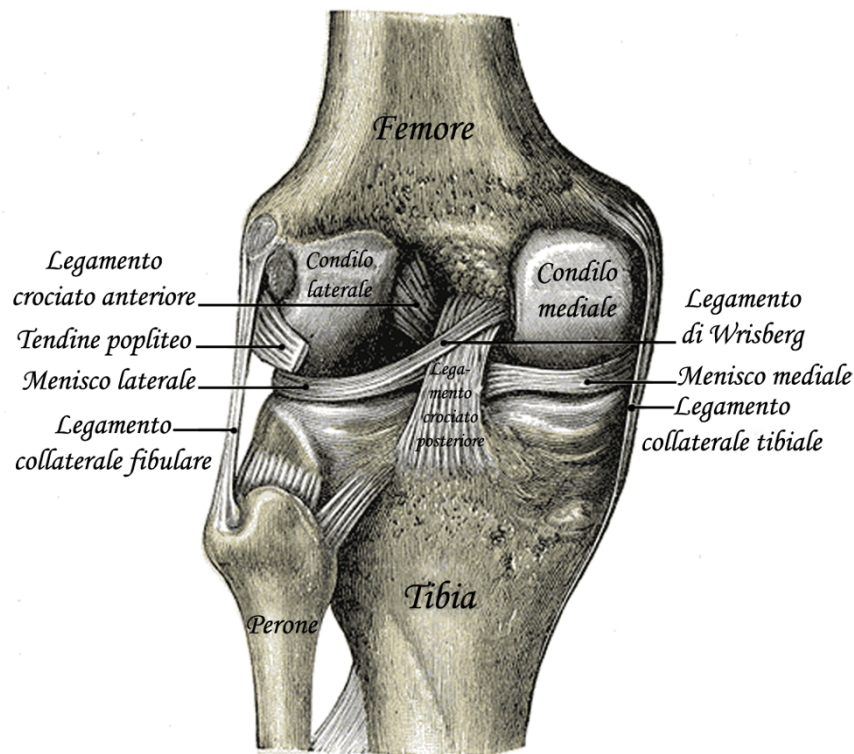


Figura 1.1: Vista posteriore del ginocchio sinistro.

Tibia

Come il femore, fa parte delle ossa lunghe. I condili mediale e laterale dell'epifisi prossimale della tibia si articolano con quelli del femore. Una cresta, l'eminanza intercondiloidea, separa i condili della tibia e su di essa si trovano due tubercoli (mediale e laterale) [2].

Patella

La patella, o rotula, è un voluminoso osso sesamoide situato all'interno della capsula articolare. Nella parte anteriore, fornisce l'attacco al legamento rotuleo e al tendine del muscolo quadricipite femorale, muscolo estensore del ginocchio; quella posteriore, si interfaccia con il femore (articolazione femoro-patellare) [3]. La rotula rinforza i tendini del quadricipite, aumentandone la contrazione, e protegge la superficie anteriore dell'articolazione del ginocchio. Il suo ruolo più importante è durante l'estensione del ginocchio, quando permette di

aumentare il braccio di leva del quadricipite femorale e quindi migliorarne l'effettiva capacità di estensore.

Importante è il tendine rotuleo, una resistente banda di tessuto connettivo fibroso che congiunge la porzione inferiore della rotula a una prominenza caratteristica della tibia, situata appena sotto i condili, il cui nome è tuberosi tibiale [4]. Il suo ruolo è quello di stabilizzare la rotula e supportare il quadricipite femorale nella sua azione di estensore del ginocchio.

1.1.2 Strutture legamentose del ginocchio

Per la stabilità e la mobilità dell'articolazione giocano un ruolo importante i legamenti collaterali, mediale e laterale, e i legamenti crociati, anteriore e posteriore. Il movimento di flessione-estensione del ginocchio è controllato dal quadricipite femorale, che agisce attraverso la rotula e il tendine rotuleo sulla tibia con un'azione estensoria, e gli ischiocrurali che agiscono posteriormente al ginocchio producendo un'azione flessoria [4].

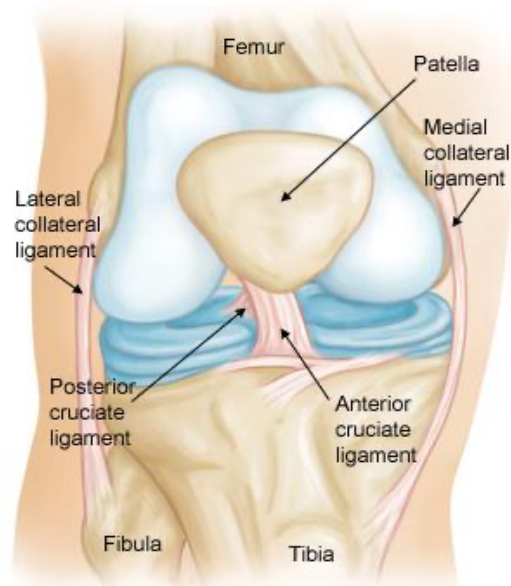


Figura 1.2: Anatomia del ginocchio.

Legamenti crociati

I legamenti crociati impediscono i movimenti in avanti o all'indietro della tibia al di sotto dei condili femorali. Questi legamenti hanno anche un ruolo primario nel fornire stabilità rotatoria all'articolazione del ginocchio; sono piuttosto tesi in tutte le posizioni di flessione, ma raggiungono la massima rigidità a estensione e flessione complete. Essi giacciono all'interno della capsula articolare del ginocchio, nel piano verticale tra i condili, ma rimangono esclusi dalla cavità sinoviale per mezzo di rivestimenti della membrana sinoviale [4]. Entrambi i

legamenti si allargano linearmente in corrispondenza delle loro inserzioni ossee, in particolare a livello dei condili femorali. Il legamento crociato anteriore (LCA) parte dall'area rugosa, non articolare, davanti all'eminanza intercondiloidea della tibia e si estende verso l'alto e all'indietro in direzione della porzione posteriore della faccia mediale del condilo femorale laterale. Il LCA può essere suddiviso in due fasci: il fascio antero-mediale e il fascio postero-laterale. Il legamento crociato posteriore (LCP), più spesso e resistente, decorre superiormente e anteriormente sulla faccia mediale del legamento anteriore [4]. Si estende dall'inserzione extra-articolare, sulla faccia posteriore del piatto tibiale alla faccia laterale del condilo mediale del femore. Anche il LCP è formato da un fascio antero-laterale e da uno postero-mediale. Il primo si tende in flessione, mentre il secondo in estensione.

Legamenti collaterali

I legamenti collaterali impediscono l'ipertensione dell'articolazione e sono fondamentali nello opporre resistenza alle forze in varo e in valgo esercitate sul ginocchio. Entrambi i legamenti collaterali sono più rigidi in fase di estensione e si fanno progressivamente più rilassati quando il ginocchio viene riportato in flessione. Il legamento collaterale mediale (LCM), o tibiale, è un nastro piatto e resistente che si estende dai condili mediali del femore, al menisco mediale, al condilo mediale e alla adiacente diafisi della tibia [4]. Può essere diviso in strati profondi e superficiali, separati da una sottile borsa che facilita il leggero movimento tra questi strati. Il legamento collaterale laterale (LCL), o peroneo, è un robusto cordone fissato in alto sull'epicondilo laterale del femore sopra al solco per il popliteo e, in basso, sulla testa della fibula davanti al suo apice; per un ampio tratto è coperto dal tendine del bicipite femorale che lo avvolge ed è in parte a esso unito [4].

Menischi

I menischi sono lamine fibrocartilaginee a forma di mezzaluna che sormontano le porzioni periferiche delle superfici articolari della tibia. Più spessi in corrispondenza dei loro margini esterni, si affusolano diventando più sottili a livello dei margini non fissati, situati nella parte interna dell'articolazione e rendono più profonde le fosse articolari che accolgono i condili femorali. Si inseriscono sui bordi esterni dei condili della tibia e alle loro estremità, anteriore e posteriore, sull'eminanza intercondiloidea [4]. Il menisco mediale è pressoché semicircolare e si fissa con il suo corno anteriore sull'area intercondiloidea anteriore della tibia, davanti al legamento crociato anteriore. Il corno posteriore si fissa sull'area intercondiloidea posteriore della tibia, tra le inserzioni del menisco laterale e del legamento crociato posteriore. La forma

del menisco laterale ricorda quella di una 'C' quasi chiusa, e copre un'area più estesa rispetto al mediale. La sua larghezza è uniforme, tranne nel breve tratto dove si restringe a formare i corni. Il suo corno anteriore si fissa davanti all'eminanza intercondiloidea della tibia, dietro e lateralmente al legamento crociato anteriore cui è parzialmente fuso [4]. Il corno posteriore si inserisce dietro l'eminanza intercondiloidea, davanti al corno posteriore del menisco mediale. Le aderenze dei due corni possono formare dei legamenti menisco-femorali, rispettivamente anteriore e posteriore.

1.1.3 Componenti muscolari

Muscolo quadricipite femorale

Il quadricipite femorale è posto anteriormente alla coscia ed è il muscolo più voluminoso del corpo umano. È formato da quattro capi, di cui tre sono muscoli vasti: vasto laterale, vasto mediale e vasto intermedio; i quali originano lungo il corpo del femore e avvolgono il muscolo retto del femore. Questi quattro capi si riuniscono in un unico tendine, determinando l'estensione del ginocchio [5]. Ognuno dei quattro muscoli sembra avere un ruolo nell'estensione del ginocchio; infatti, quando il quadricipite femorale è rilassato la patella è mobile, ma a muscolo contratto essa risale leggermente e viene fissata.

Muscoli ischiocrurali

I muscoli ischiocrurali sono un gruppo di muscoli situati nella parte posteriore della coscia. Questo gruppo comprende il muscolo bicipite femorale, il semitendinoso e il semimembranoso. La funzione comune di tali muscoli è quella di far avvenire la flessione della gamba sulla coscia e di estendere la coscia sull'anca [5].

Il bicipite femorale ha due inserzioni prossimali: il capo lungo origina sull'ischio, mentre il capo breve sul femore. Inoltre, entrambi si articolano lungo un tendine comune che si attacca sul condilo laterale della tibia. Il primo ha la funzione di flessore del ginocchio ed estensore dell'anca, mentre il secondo agisce solo come flessore del ginocchio. Il muscolo semimembranoso, così chiamato per la forma membranosa appiattita della sua inserzione prossimale, è posto postero-medialmente nella coscia. Esso origina da un tendine lungo e piatto, che si inserisce sull'ischio. Il semitendinoso, caratterizzato dalla lunghezza del suo tendine, è posto nella coscia postero-medialmente. Esso nasce dall'impronta infero-mediale della porzione superiore dell'ischio, mediante un tendine che ha in comune con il capo lungo del bicipite femorale [5]. È responsabile, insieme al muscolo semimembranoso, sia della flessione sia della rotazione interna della gamba (a ginocchio flesso).

1.2 Struttura della cartilagine articolare

La cartilagine articolare (AC) è un tessuto connettivo specializzato nel fornire supporto strutturale, ammortizzare gli urti e offrire il minor attrito possibile. È un tessuto avascolare, alinfatico e aneurale con i condrociti come unico tipo di cellula. Oltre ai condrociti, la cartilagine è formata dalla matrice extracellulare (ECM), che è composta da acqua (più del 70%) e da componenti organici come il collagene di tipo II, l'aggrecano, proteoglicani e glicoproteine. Tutti i componenti della cartilagine sono sintetizzati dai condrociti, che svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'ambiente cartilagineo, bilanciando la produzione dei componenti della ECM e dei suoi enzimi, garantendo un ricambio minimo ed equilibrato tra processi anabolici e catabolici [6]. Il metabolismo della cartilagine è stimolato dal carico meccanico, rilevato dai meccanorecettori sulla superficie cellulare. Attraverso il processo di meccano-trasduzione, i segnali meccanici modulano l'attività biochimica dei condrociti, inducendo la sintesi di molecole che preservano l'integrità del tessuto. I meccanorecettori di superficie comprendono canali ionici meccanosensibili e integrine, quest'ultime sono proteine transmembrana che attivano la segnalazione interna delle cellule legando molecole, come citochine e fattori di crescita. Inoltre, lo stimolo biomeccanico generato dalla compressione dinamica durante l'esercizio moderato può ridurre la sintesi di enzimi proteolitici, regolare l'equilibrio metabolico e prevenire la progressione del danno cartilagineo [6]. L'importanza di un corretto carico meccanico è dimostrata dal fatto che stimoli biomeccanici insufficienti, come ad esempio a seguito d'immobilizzazione, possono portare a una riduzione dello spessore (>10%) e a un rammollimento della cartilagine nell'articolazione del ginocchio.

La reversibilità delle deformazioni della cartilagine articolare sottoposta a compressione, sembra, infatti dipendere dalla capacità dei proteoglicani di legarsi all'acqua e dal fatto che queste macromolecole, molto espanse e idratate, sarebbero limitate negli spostamenti dai rapporti con la rete di collagene. Poiché con l'età si riducono percentualmente sia i proteoglicani sia l'acqua, alcune deformazioni dovute a compressione divengono permanenti [7].

La AC gioca un ruolo chiave nella distribuzione delle forze grazie alla capacità di assorbire e rilasciare il liquido sinoviale durante i cicli di compressione ai quali è sottoposta.

Protegge quindi l'osso subcondrale da grandi stress, incrementa la congruenza articolare riducendo la pressione di contatto e permette movimenti a bassa frizione [8].

La risposta della cartilagine a un danno non segue il processo di guarigione tipico dei tessuti, per la sua natura avascolare, possiede infatti un limitato potenziale rigenerativo.

La cartilagine articolare si può suddividere in:

- cartilagine ialina: ha uno spessore che varia da 1 a 4 mm in base alla posizione e all'età del soggetto;
- zona calcificata: presenta uno spessore molto più sottile rispetto alla cartilagine ialina, ha la funzione meccanica di ancorare la cartilagine all'osso subcondrale, e di facilitare il trasferimento di carico tra cartilagine e l'osso.

Nella cartilagine ialina, dalla zona superficiale alla zona profonda, si possono distinguere tre strati:

- strato superficiale: i condrociti sono appiattiti e le fibre di piccolo diametro corrono parallele alla superficie articolare;
- strato intermedio: le fibre sono disposte in modo casuale e hanno diametro maggiore, i condrociti sono più attivi e morfologicamente più grandi e tondeggianti;
- strato profondo: le fibre di collagene sono disposte in modo perpendicolare rispetto alla superficie articolare [7].

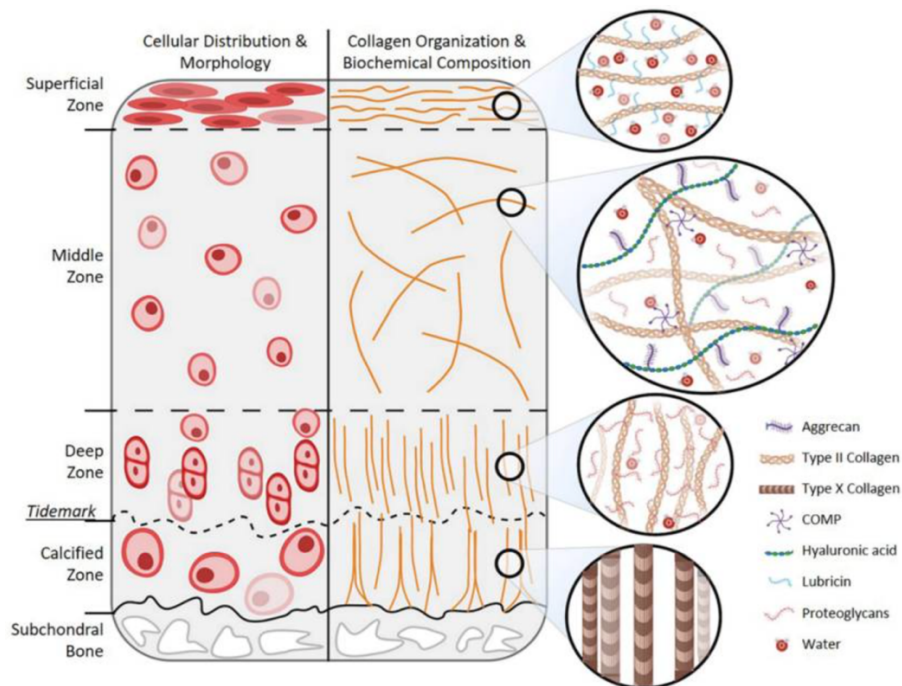


Figura 1.3: Struttura della cartilagine articolare.

1.2.1 Cellule cartilaginee

I condrociti hanno forma e disposizioni particolari, evidentemente condizionate dalle sollecitazioni meccaniche. Sono cellule molto idratate, possono essere binucleate, e contengono goccioline lipidiche e glicogeno. Essi risultano inglobati nell'abbondante matrice, che forma,

attorno a ogni singolo elemento, una capsula; hanno morfologia e distribuzioni diverse a seconda che si osservi la sezione nella parte profonda del tessuto o in quella subpericondrale: nel primo caso le cellule sono pressoché sferiche e tendenzialmente raggruppate in numero di 3-5 a costituire i cosiddetti nidi o gruppi isogeni [6]. Procedendo dalle parti profonde verso quelle superficiali, i condrociti, di forma ovoidale, solo occasionalmente sono raggruppati in piccoli nidi e risultano progressivamente più appiattiti.

1.2.2 Matrice extracellulare:

Nella cartilagine, la matrice extracellulare è costituita da fibre di collagene e da una componente amorfa in cui prevalgono proteoglicani, glicoproteine, e in quantità molto minori, lipoproteine e lipidi. Il grado d'idratazione, sempre elevato, varia con l'età.

Rispetto ad altri tessuti con funzioni di sostegno meccanico, il collagene risulta essere relativamente scarso nella cartilagine. Al microscopio ottico le fibre di collagene non sono visibili con le comuni colorazioni in quanto risultano mascherate dall'abbondante componente amorfa. Il collagene della cartilagine differisce anche a livello molecolare: infatti, mentre quello presente nella maggior parte dei connettivi è costituito da tropocollagene, che è formato da due catene α_1 e da una catena α_2 , nella cartilagine le molecole di tropocollagene sono formate da tre catene identiche α_1 (II), che differiscono dalle catene α_1 presenti in altri tessuti connettivi [6]. L'abbondante frazione amorfa è in prevalenza costituita da proteoglicani e, in quantità molto minori, da lipidi e da lipoproteine.

I glicosaminoglicani presenti nella cartilagine sono il condroitin-4-solfato, il condroitin-6-solfato, il cheratansolfato e, in minor percentuale, l'acido ialuronico formando aggregati di grandi dimensioni.

A tali macromolecole, molto voluminose e complesse, si attribuiscono varie funzioni: essendo notevolmente idrofiliche regolano il grado di idratazione del tessuto e, avendo forma espansa, delimitano nella sostanza fondamentale un reticolo tridimensionale che, da un lato, funge da "spugna molecolare" a scambio ionico, dall'altro contribuisce a conferire resistenza alle sollecitazioni meccaniche e un certo grado di elasticità [9].

Le glicoproteine strutturali della cartilagine contribuiscono a condizionare gli scambi metabolici e, secondo alcuni studi, potrebbero rappresentare anche un filtro protettivo tissutale.

Capitolo 2. Degenerazione della Cartilagine

2.1 Considerazioni preliminari

Le patologie legate alla cartilagine sono un problema ampiamente diffuso: circa 50 milioni di adulti negli Stati Uniti sono colpiti da artrite, inoltre si stima che ci sarà un aumento del 60% nei prossimi due decenni.

L'osteoartrite (OA), il tipo più comune di artrite, è associata a dolore e perdita di funzionalità articolare. La malattia è caratterizzata dalla degenerazione della cartilagine nelle articolazioni a seguito di "usura" o lesioni, compresi gli infortuni legati allo sport. Anche lacerazioni del menisco e del legamento crociato anteriore (LCA) possono contribuire allo sviluppo dell'OA, poiché il danno a queste strutture altera il carico sull'articolazione.

L'artrite reumatoide (AR), il secondo tipo di artrite più comune, è una malattia cronica autoimmune caratterizzata da infiammazione e deterioramento dell'articolazione con conseguente perdita di funzionalità. Essendo patologie che presentano come sintomo principale il dolore, inducono nei pazienti un circolo vizioso: a causa del dolore tendono a praticare sempre minor attività fisica e questo va a intaccare il metabolismo della cartilagine, che è regolato dai meccanorecettori [9]. Inoltre, il dolore unito all'inattività porta a un peggioramento delle condizioni di vita, come: perdita d'indipendenza, perenne stanchezza, depressione e peggioramento del sonno.

L'osteoartrite e l'artrite reumatoide comportano costi sia al sistema sanitario sia al paziente e mortalità notevoli. Il 43% dei 54 milioni di persone degli Stati Uniti che convivono con l'artrite, di cui la maggior parte OA, sperimentano limitazioni nelle attività quotidiane, che possono causare anche perdita di lavoro; a questo, si aggiungono anche le spese mediche dovute a farmaci specifici e antidolorifici. Anche per il sistema sanitario è una grossa spesa, perché la maggior parte dei trattamenti sono palliativi e non prevengono un'ulteriore degenerazione articolare; allo stesso modo i trattamenti per l'AR spesso riducono l'infiammazione articolare senza trattare i danni alla cartilagine [10]. Quindi, molti pazienti, come ultima spiaggia, richiedono un'artroplastica totale al ginocchio, un trattamento molto invasivo che utilizza impianti che si consumano nel tempo.

2.2 Osteoartrite

L'osteoartrite (OA), nota anche come malattia degenerativa delle articolazioni, è una delle principali cause di disabilità negli Stati Uniti e nel mondo [11]. Il numero di persone affette da OA è destinato ad aumentare a causa dell'invecchiamento della popolazione e dell'epidemia di obesità. Il ginocchio è l'articolazione più colpita (Figura 2.1), caratterizzata dalla degenerazione irreversibile della cartilagine articolare all'estremità delle ossa, come le cartilagini femorali, tibiali e rotulee [12]. L'osteoartrite colpisce l'intera articolazione, in tutti e tre i suoi compartimenti articolari (mediale, laterale e femorale) e solitamente si sviluppa lentamente, nell'arco di 10-15 anni, interferendo con le attività della vita quotidiana.



Figura 2.1: Radiografia AP di un ginocchio sinistro con grave OA, che mostra grandi osteofiti (freccia verso il basso a destra) e marcato restringimento dello spazio articolare (freccia verso l'alto a sinistra).

A lungo identificata come una patologia “da usura”, l’OA è oggi intesa come una complessa fisiopatologia che interessa più articolazioni e strutture articolari, come si può dedurre dalla definizione data dall’Osteoarthritis Research Society International: “La malattia si manifesta dapprima come un’alterazione molecolare (metabolismo anormale del tessuto articolare) seguita da alterazioni anatomiche e/o fisiologiche (caratterizzate da degradazione di cartilagine,

rimodernamento osseo, formazioni di osteofiti, infiammazione articolare e perdita della normale funzione articolare), che possono culminare nella malattia” [10].

Sebbene la fisiopatologia dell’OA sia ancora poco conosciuta e in fase di studio, è accertato che l’OA del ginocchio abbia un’origine multifattoriale. Mentre i processi infiammatori e biomeccanici dell’intero organo giocano un ruolo importante, l’OA del ginocchio è influenzata da una combinazione di fattori, tra cui l’anamnesi familiare, l’età, la condizione fisica, il diabete, la sinovite, l’allineamento dell’arto inferiore (genu valgum o genu varum), i traumi e l’infiammazione da sindromi metaboliche [13].

L’incidenza e la prevalenza dell’OA aumentano drasticamente tra i 40 e i 50 anni, in particolare tra le donne. La progressione della gravità della malattia, sebbene non avvenga “da un giorno all’altro”, non richiede molto tempo per manifestarsi. Uno studio pubblicato nel 2004 ha seguito un gruppo di 32 pazienti con OA sintomatica del ginocchio per valutare la progressione della malattia mediante procedure di risonanza magnetica [12]. Questi pazienti sono stati seguiti per un periodo di 2 anni e nel complesso hanno registrato una perdita significativa del volume cartilagineo globale del 6,1% alla fine dello studio. Di particolare interesse è stato il fatto che il movimento verso questo dato è stato dimostrato statisticamente già a 6 mesi dall’inizio dello studio, aumentando a 18 e 24 mesi, riflettendo una progressione nella perdita di volume della cartilagine nel tempo.

Oltre alla perdita della cartilagine articolare, si verifica la formazione di osteofiti ai margini dell’articolazione, il rimodernamento osseo subcondrale con cisti e sclerosi, le contratture e il rilassamento dei legamenti, l’atrofia e lo spasmo muscolare. La riparazione della cartilagine è inadeguata perché si sviluppa uno squilibrio tra i normali processi anabolici e catabolici all’interno della cartilagine. Ciò che sembra guidare questo squilibrio distruttivo sono le citochine; quelle presenti a livelli relativamente elevati nel liquido sinoviale sono: IL-6, MCP-1, VEGF, IP-10 e MIG24 [10]. I fattori pro-infiammatori sono responsabili della progressiva distruzione e del rimodellamento dell’articolazione attraverso la stimolazione degli enzimi che degradano la matrice, tra cui le metalloproteinasi della matrice. I fattori di crescita che normalmente stimolerebbero la produzione di matrice e la riparazione dei tessuti articolari sono sopraffatti dai mediatori pro-infiammatori [10].

2.2.1 Eziologia

L’osteoartrite ha un’eziologia multifattoriale, dovuta all’interazione tra fattori sistemici e locali. La partecipazione ad attività sportiva, le lesioni all’articolazione, l’obesità e la predisposizione genetica predispongono gli atleti allo sviluppo di un’osteoartrite. Un precedente trauma al

ginocchio aumenta il rischio di OA di 3,86 volte [14]. La determinazione dei fattori di rischio, in particolare nelle articolazioni portanti, e la loro modifica possono ridurre il rischio di OA e prevenire il dolore e le disabilità successive. L'età avanzata, il sesso femminile, il sovrappeso e l'obesità, le lesioni al ginocchio, l'uso ripetitivo delle articolazioni, la densità ossea, la debolezza muscolare e la lassità articolare giocano tutti un ruolo nello sviluppo dell'OA articolare.

La prevalenza e l'incidenza dell'OA sintomatica aumentano notevolmente con l'età. La relazione tra l'età e il rischio di OA è multifattoriale, come conseguenza di numerosi fattori individuali; questi includono il danno ossidativo, l'assottigliamento della cartilagine, l'indebolimento della cartilagine, l'indebolimento muscolare e la riduzione della propriocezione. Inoltre, i meccanismi cellulari di base che mantengono l'omeostasi tissutale diminuiscono con l'invecchiamento, portando a una risposta inadeguata allo stress o alle lesioni articolari e alla conseguente distruzione e perdita di tessuto articolare [15].

La sarcopenia, ovvero la perdita della massa muscolare a causa dell'invecchiamento, può essere un importante fattore di rischio per l'OA del ginocchio. Uomini e donne con evidenza radiografica preesistente di OA del ginocchio sono stati identificati come aventi quadricipiti più deboli rispetto a quelli senza OA, in particolare quando le articolazioni sono sintomatiche [15]. È probabile che l'OA del ginocchio porti di per sé alle debolezze dei quadricipiti a causa dell'atrofia da disuso, tuttavia è stato dimostrato che la debolezza può essere riscontrata anche intorno alle ginocchia in assenza di dolore, ciò può essere dovuto all'inibizione artrogena della contrazione muscolare [16]. Una maggiore forza muscolare non è sempre protettiva, poiché corrisponde a forze più elevate e quindi a un maggior carico articolare durante l'attività.

L'obesità e la scarsa forza muscolare sono associati alla malattia sintomatica e alla conseguente disabilità. Le forze meccaniche esercitate sulle articolazioni sono una causa significativa di OA e uno dei fattori di rischio più comune negli Stati Uniti è il sovrappeso. Infatti, ogni libbra (0.45 kg) di peso in più, aggiunge da 2 a 4 libbre (0.9-1.8 kg) di pressione supplementare sulle ginocchia [13]. L'obesità contribuisce allo sviluppo dell'OA attraverso molteplici meccanismi: aumento del carico articolare, cambiamenti nella composizione corporea, con effetti negativi legati all'infiammazione; e fattori comportamentali, come la diminuzione dell'attività fisica e la conseguente perdita di forza muscolare e protettiva.

L'ambiente biomeccanico influenza il processo patologico. L'allineamento meccanico del ginocchio influenza la distribuzione del carico sulle superfici articolari. In un ginocchio normalmente allineato, il 60-70% del carico portante viene trasmesso attraverso il compartimento mediale. L'allineamento in varismo degli arti inferiori ("gambe arcuate") sposta

il carico medialmente, aumentando il rischio di OA del ginocchio nel compartimento mediale, mentre l'allineamento in valgo ("ginocchia a terra") sposta il carico lateralmente aumentando il rischio di OA nel compartimento laterale [10]. Si ritiene che un aumento anomalo del carico compartimentale aumenti lo stress sulla cartilagine articolare e su altre strutture articolari, portando successivamente a un cambiamento degenerativo. Si ritiene che il malallineamento del ginocchio sia un fattore di rischio indipendente per la progressione dell'OA.

Un carico eccessivo sull'osso può provocare lesioni del midollo osseo, visibili con risonanza magnetica. Dal punto di vista istologico, le lesioni del midollo osseo contengono microfratture con frammenti ossei, necrosi, fibrosi e adipociti anormali [10].

Una lesione traumatica del ginocchio è uno dei fattori di rischio più forti per lo sviluppo dell'OA del ginocchio. Le lesioni acute, tra cui le lacerazioni meniscali e del crociato, le fratture e le lussazioni, possono determinare un aumento del rischio di sviluppo dell'OA e dei sintomi muscoloscheletrici. Oltre al danno diretto ai tessuti locali causato dal trauma, anche l'alterazione della normale biomeccanica e l'alterata distribuzione del carico all'interno dell'articolazione contribuiscono al conseguente aumento del rischio di OA.

2.2.2 Classificazione

Le attuali scale di classificazione radiografica per l'OA si basano principalmente sulla classificazione di Kellgren-Lawrence, che esamina i cambiamenti evidenziati dalle immagini radiografiche semplici. È stato proposto uno schema di classificazione a cinque gradi che ha esaminato le radiografie semplici di otto articolazioni, tra cui il ginocchio. A ogni radiografia è stato assegnato un grado da 0 a IV, che è stato correlato alla crescente gravità dell'OA, in dettaglio si hanno (Figura 2.2):

- Grado 0: nessuna caratteristica radiografica dell'OA;
- Grado I: iniziale formazione di osteofiti e possibile restringimento dello spazio articolare;
- Grado II: osteofiti ben definiti;
- Grado III: definito restringimento dello spazio articolare, sclerosi, possibile deformità ossea e osteofiti multipli;
- Grado IV: grossi osteofiti, marcato restringimento dello spazio articolare, pronunciata deformità ossea e sclerosi severa.

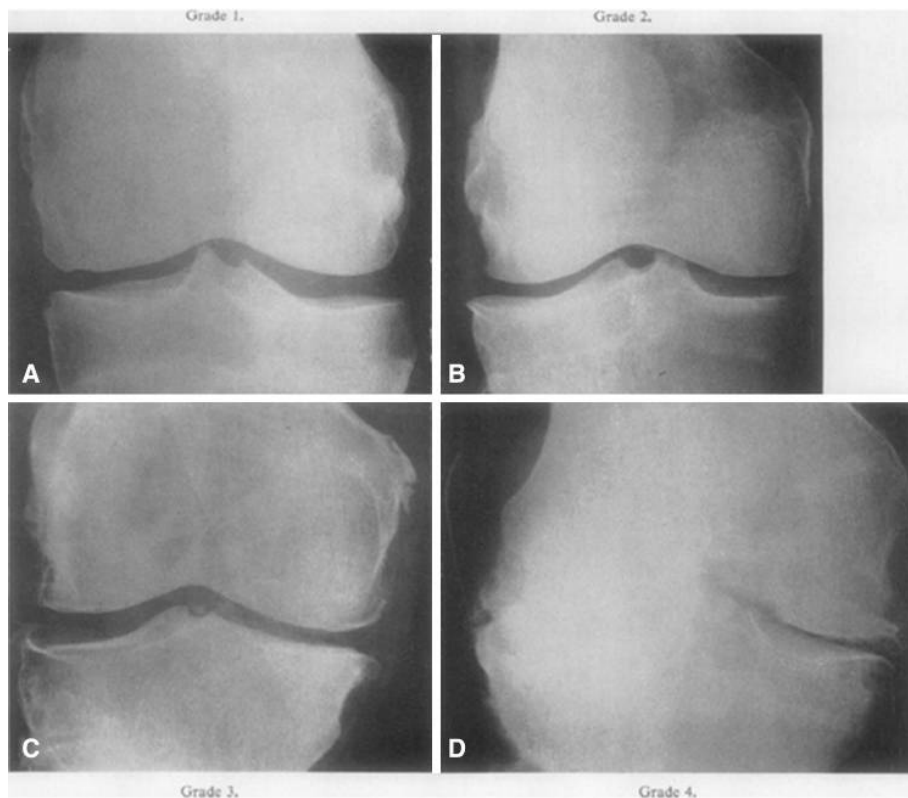


Figura 2.2: Radiografie AP del ginocchio. (A) Grado 1: dubbio restringimento dello spazio articolare. (B) Grado 2: formazione di osteofiti. (C) Grado 3: definito restringimento dello spazio articolare, moderata formazione di osteofiti e una possibile deformità delle estremità ossee. (D) Grado 4: ampia formazione di osteofiti, grave restringimento dello spazio articolare e una sicura deformità dello spazio articolare.

Un altro sistema di valutazione redatto dall'OARSI (OsteoArthritis Research Society International) riguarda lo studio dell'istologia della cartilagine articolare. Il sistema è formato da una componente di “grading” e una di “staging”; un grado più alto indica una progressione biologica più aggressiva e uno stadio più alto indica un'estensione più ampia della malattia.

Il grading è stato classificato in 6 stadi (Figura 2.3):

- grado 0, la cartilagine articolare non è affetta da OA. La superficie risulta liscia e intatta;
- grado 1, è la soglia per diagnosticare l'OA, caratterizzato da un piccolo assottigliamento della superficie articolare. Si può notare anche delle lievi zone di abrasione, definite “fibrillazioni articolari”;
- grado 2, caratterizzato da discontinuità della superficie, con il possibile distacco di piccole parti di matrice, fenomeno noto come esfoliazione, che formano fibrille ritrovabili nel fluido sinoviale;
- grado 3, le scissure tendono ad andare in profondità, mentre la struttura della matrice diventa sempre più eterogenea;

- grado 4, caratterizzata dalla progressiva erosione cartilaginea, distinta in delaminazione ed escavazione. La delaminazione è data dalla perdita degli strati superficiali a causa delle forze a cui è sottoposta l'articolazione. L'escavazione consiste nella perdita continua di matrice e formazione di cavità in profondità, dovute sia alle forze meccaniche sia alla proliferazione di condrociti;
- grado 5, si ha la completa erosione della cartilagine ialina fino a livello della cartilagine calcificata e talvolta dell'osso calcificato.

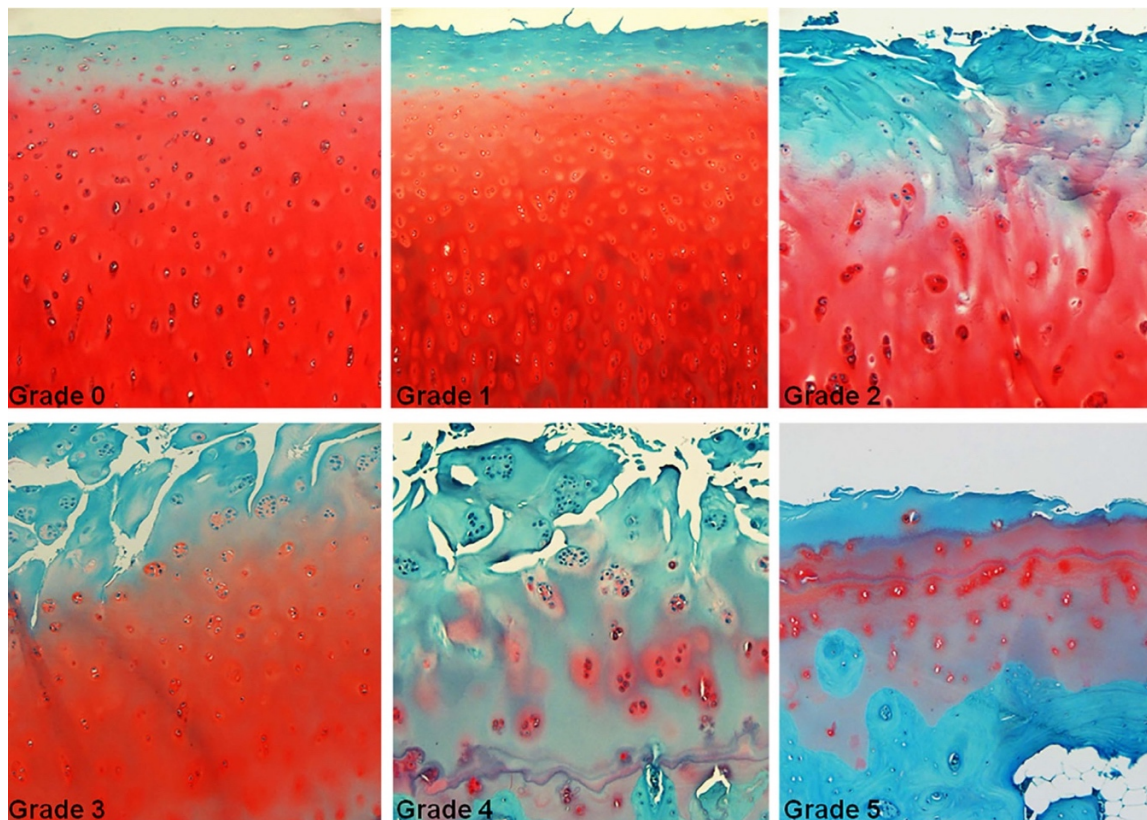


Figura 2.3 Immagini della cartilagine durante l'avanzamento dell'OA.

2.3 Artrite Reumatoide

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia autoimmune cronica che colpisce le articolazioni. È caratterizzata da una progressiva infiammazione simmetrica delle articolazioni colpite, con conseguente distruzione della cartilagine, erosione ossea e disabilità. Se inizialmente sono colpite solo alcune articolazioni, negli stadi successivi sono interessate molte articolazioni e i danni extra-articolari sono molto frequenti.

Con una prevalenza che varia dallo 0,4% al 1,3% della popolazione a seconda del sesso, dell'età e del collettivo di pazienti studiato (la frequenza di AR aumenta da sud a nord ed è maggiore

nelle aree urbane rispetto a quelle rurali), l'AR è una delle patologie legate all'infiammazione più diffuse.

I sintomi differiscono significativamente tra lo stadio iniziale e l'AR trattata in modo insufficiente negli stadi successivi della malattia. La fase iniziale è caratterizzata da sintomi generalizzati, come affaticamento, articolazioni gonfie e rigidità mattutina. La seconda presenta un quadro clinico complesso con la comparsa di gravi manifestazioni sistemiche come versamenti pleurici, vasculite nelle arterie di piccole dimensioni, disallineamento delle articolazioni, perdita dell'ampiezza di movimento ed erosione ossea. L'insieme di queste manifestazioni sistemiche causate dallo stato infiammatorio cronico nei pazienti con AR comporta un aumento della mortalità.

Sebbene la causa dell'AR sia sconosciuta, è stato dimostrato che sia i fattori genetici che quelli ambientali contribuiscono allo sviluppo dell'AR. Come si ipotizza per altre malattie autoimmuni, è probabile che l'instaurazione iniziale dell'AR richieda due eventi separati:

1. la predisposizione genetica del paziente, che porta alla generazione di cellule autoreattive;
2. un evento scatenante, come infezioni virali e batteriche o lesioni tissutali.

Pertanto, l'AR si sviluppa probabilmente in individui geneticamente predisposti a causa di una combinazione di variazioni genetiche, modifiche epigenetiche e fattori ambientali avviati da un evento stocastico (ad esempio lesioni o infezioni). Tra i fattori di rischio per lo sviluppo della patologia sono segnalati il fumo, l'obesità, l'esposizione ai raggi UV, i farmaci, la malattia paradontale (paradontite) e le infezioni.

La distruzione autoimmune del tessuto si presenta come sinovite, un'infiammazione della capsula articolare costituita dalla membrana sinoviale, dal liquido sinoviale e dalle rispettive ossa. Questa infiammazione articolare è iniziata e mantenuta da una complessa interazione tra diversi sottotipi di cellule dendritiche, cellule T, macrofagi, neutrofili, fibroblasti e osteoclasti. Poiché gli autoantigeni specifici dell'AR non possono essere completamente eliminati, questa continua attivazione delle cellule immunitarie si traduce in uno stato infiammatorio cronico e in un rigonfiamento della membrana sinoviale che viene riconosciuto dai pazienti colpiti come dolore e gonfiore articolare.

Questo stato infiammatorio cronico nell'articolazione artritica porta a sua volta a un'espansione della membrana sinoviale, definita "pannus", che invade l'osso in corrispondenza della giunzione cartilagine-osso, con conseguente erosione ossea e degradazione della cartilagine.

2.3.1 Fattori di rischio

I fattori di rischio dell'artrite reumatoide si dividono in ambientali e genetici.

Diversi fattori hanno suggerito con forza che la genetica ha un'influenza importante sullo sviluppo dell'AR. Questi fattori includono l'aumento generale della prevalenza dell'AR all'interno delle famiglie, che porta a stime del contributo del rischio familiare pari a circa il 40-50%, con i rischi più forti osservati nei parenti di primo grado. Nonostante gli ultimi studi che hanno portato a una maggiore comprensione dei fattori genetici associati alla patologia, non è ancora chiaro quale sia il ruolo funzionale della maggior parte dei fattori genetici nello sviluppo e nella comprensione dell'AR [17].

I fattori di rischio ambientali, che contribuiscono in modo significativo alla salute della popolazione, svolgono un ruolo importante nella gestione della patologia. Come per altre malattie, il fumo è legato allo sviluppo e all'esacerbazione dell'AR. La prima evidenza dell'associazione tra fumatori e aumento del rischio di contrarre la patologia è stata osservata per caso in uno studio con uno scopo diverso. Da allora, è diventato il fattore di rischio meglio descritto [18]. Le sostanze chimiche nocive contenute nei prodotti del tabacco sono state valutate in modo esaustivo e i risultati suggeriscono che siano associate a un aumento delle malattie parodontali e polmonari, che a loro volta sono una causa dell'AR [17].

Anche diversi fattori legati all'alimentazione o di altro tipo, come integratori o farmaci, sono stati variamente collegati al rischio di AR. Una minore assunzione di vitamina D e di antiossidanti e una maggiore assunzione di zucchero, sodio, carni rosse, proteine e ferro, possono aumentare le probabilità di contrarre l'AR. Un risultato coerente in molti studi afferma che una maggiore assunzione di pesce e di acidi grassi omega-3 è stata costantemente associata a una riduzione del rischio di AR.

Generalmente, uno stile di vita sano, tra cui un indice di massa corporea basso, una bassa assunzione di zucchero e grassi animali e un'alta consumazione di frutta, cereali e verdure sono stati associati a una riduzione di contrarre questa patologia [17].

2.3.2 Diagnosi

Come ogni malattia complessa, l'artrite reumatoide rappresenta un insieme di sintomi e la diagnosi è basata sul consenso. Ciò può generare una certa incertezza nelle fasi iniziali della malattia e può causare una classificazione di sintomi tra diverse malattie reumatiche.

Dal punto di vista clinico, i pazienti affetti da AR presentano tipicamente una recente insorgenza di articolazioni tenere e gonfie, rigidità articolare mattutina, sintomi generalizzati di malessere, nonché esami di laboratorio anormali. Una diagnosi tempestiva e precisa è di grande

importanza nel trattamento dell'AR poiché la diagnosi precoce può arrestare la malattia in molti pazienti, prevenendo o rallentando sostanzialmente la progressione della malattia, il danno articolare irreparabile e la disabilità fino al 90% dei pazienti.

In genere, la diagnosi si basa sulla combinazione dei sintomi del paziente, dei risultati della visita medica, della valutazione dei fattori di rischio, dell'anamnesi familiare e della valutazione di eventuali esami.

Sia l'ecografia che la risonanza magnetica sono state raccomandate per la diagnosi e il monitoraggio dell'attività della patologia nei pazienti. L'analisi ecografica (ad esempio, ecografia muscolo-scheletrica ad alta risoluzione) delle articolazioni infiammate consente di visualizzare la proliferazione sinoviale in scala di grigi e l'infiammazione attiva. Inoltre, gli ultrasuoni sono in grado di identificare le erosioni ossee e la sinovite subclinica che può provocare una progressione radiografica della malattia. Grazie a queste capacità, gli ultrasuoni sono ampiamente utilizzati nella pratica clinica e negli studi clinici per la diagnosi di artrite reumatoide. I vantaggi degli ultrasuoni sono il costo relativamente basso, l'ampia disponibilità, la mancanza di controindicazioni e la capacità di imaging non invasivo in tempo reale. Gli svantaggi sono rappresentati dal fatto che l'ecografia è considerata una tecnologia operatore-dipendente.

Pur essendo uno strumento diagnostico molto sensibile per rilevare, ad esempio, l'ipertrofia sinoviale o la formazione di pannus prima della comparsa dell'erosione ossea, l'uso di routine delle tecniche di risonanza magnetica (RM) (preferibilmente con contrasto) nella diagnosi di AR è limitato da fattori di costo e dalla capacità limitata di visualizzare più articolazioni in un'unica misurazione.

Capitolo 3. Tecniche chirurgiche per la riparazione della cartilagine

La capacità di riparazione della cartilagine articolare è estremamente scarsa essendo in gran parte avascolare. L'assenza di un apporto di sangue nella cartilagine può sopprimere le normali risposte associate alla guarigione, come ad esempio nel caso della cartilagine matura e invecchiata la quale, contenendo un minor numero di cellule e ricevendo un apporto di sangue limitato, rappresenta per i condrociti stessi un ambiente sfavorevole [19].

Gli attuali metodi di gestione di piccoli difetti della cartilagine comprendono il trattamento palliativo con *debridement* e lavaggio artroscopico, il trattamento riparativo con tecniche di stimolazione del midollo, e trattamenti atti alla ricostruzione attraverso l'innesto osteocondrale e l'impianto di condrociti autologhi [20]. I difetti più grandi vengono gestiti con l'allotrapianto osteocondrale o con l'artroplastica.

La sostituzione dell'articolazione è una tecnica chirurgica consolidata che si concentra sul trattamento dello stadio finale dell'OA. L'obiettivo di qualsiasi trattamento di riparazione della cartilagine è quello di ottenere un tessuto di riparazione con caratteristiche strutturali paragonabili alla cartilagine ialina nativa, con conseguente lunga durata, funzione articolare e sollievo del dolore.

3.1 Arthroscopic debridement

L'*arthroscopic debridement* è stato introdotto per la prima volta nel 1981 per il trattamento dell'OA del ginocchio ed è stato utilizzato per il sollievo dei sintomi a breve termine, vista la sua bassa efficacia a lungo termine. In passato era considerato utile per migliorare i sintomi, in quanto eliminava gli enzimi proteolitici e i tessuti lassi dell'articolazione che causano il dolore. Il *debridement* della cartilagine articolare consiste nel levigare la lesione e nel rimuovere i frammenti sciolti per evitare la trasmissione di forze di taglio sugli strati intatti della cartilagine. Poiché questa pratica non evita la progressione della malattia, non è raccomandata come unico trattamento. Tuttavia, ha una posizione giustificata nella terapia dell'OA attivata quando sono presenti sintomi meccanici, nelle lesioni meniscali clinicamente sintomatiche e nelle sinovialite indotta da detriti, che può causare un'ulteriore degenerazione della cartilagine.

3.2 Tecniche di stimolazione del midollo osseo

Diverse procedure di stimolazione midollare dirette al reclutamento di cellule del midollo osseo sono state ampiamente utilizzate per trattare i difetti locali della cartilagine. Con questi metodi, l'osso subcondrale viene penetrato per consentire la formazione di coaguli all'interno del difetto e quindi la creazione di un tessuto di riparazione.

Le tecniche di stimolazione del midollo sono state descritte per la prima volta da Kenneth Pridie nel 1959. Nella sua tecnica, Pridie perforava la base ossea dei difetti condrali inducendo un sanguinamento con l'obiettivo di stimolare la guarigione del midollo osseo [21]. Le tecniche successive prevedevano l'utilizzo di una fresa per rimuovere diversi millimetri di osso dalla lesione condrale, ma hanno prodotto risultati marginali.

Steadman, negli anni '90, ha descritto la microfrattura come una tecnica per migliorare i difetti cartilaginei. La microfrattura consiste nella penetrazione diretta dell'osso subcondrale al di sotto di una lesione cartilaginea per provocare il sanguinamento (Figura 3.1) [22]. La stimolazione del midollo osseo avvia una risposta riparativa che segue essenzialmente la tradizionale sequenza di guarigione della ferita. Sebbene la microfrattura abbia dimostrato un lieve successo nel riempire le lesioni, lo fa in modo incoerente e con un tessuto fibrocartilagineo, che è costituito prevalentemente da collagene di tipo I, con quantità minime di collagene di tipo II, con il risultato di un costrutto meno duraturo [23].

La scarsa qualità del tessuto e gli esiti clinici molto variabili frequentemente osservati nell'uomo non sorprendono, considerando l'instabilità dei coaguli di sangue di derivazione midollare che si formano nella lesione [22]. Il fatto che la componente critica per la riparazione della cartilagine di derivazione midollare sia la quantità di coagulo di sangue iniziale presente nella lesione cartilaginea è evidenziato da studi che dimostrano una riparazione migliore con un coagulo più aderente e voluminoso.

La microfrattura può essere indicata per il trattamento di lesioni condrali di piccole dimensioni (al massimo 2-3 cm²). Le indicazioni ottimali includono pazienti giovani con difetti contenuti e a meno di un anno dalla lesione. Le controindicazioni includono patologie concomitanti del ginocchio che non possono essere facilmente trattate, come traumi significativi, infezioni o neoplasie; incapacità di seguire i protocolli di riabilitazione post-operatoria; degenerazione articolare diffusa.

Nel complesso, i risultati clinici a breve termine dopo la microfrattura sono stati favorevoli, dimostrando valutazioni da buona a eccellente nel 67-80% dei pazienti, con una percentuale simile di atleti che sono tornati a livelli sportivi precedenti all'infortunio. Sebbene i risultati

iniziali a breve termine siano incoraggianti, la partecipazione sportiva diminuisce nel tempo, con un massimo dell'83% che ha dimostrato una riduzione dell'attività a un follow-up medio di 5 anni [23]. Questo è dovuto al fatto che il tessuto che si forma è la fibrocartilagine ed essendo costituita prevalentemente da collagene di tipo 1, con minime quantità di collagene di tipo 2, le proprietà biomeccaniche risultano meno durature.

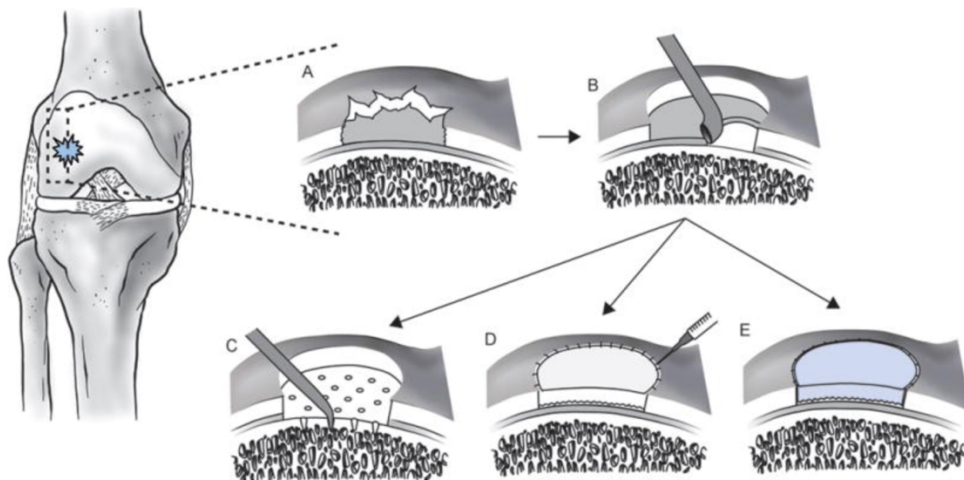


Figura 3.1: La riparazione della cartilagine attraverso la microfrattura prevede diverse fasi, tra cui il debridement fino a un margine cartilagineo stabile (A), la rimozione accurata dello strato cartilagineo calcificato (B) e il posizionamento omogeneo delle penetrazioni di microfrattura all'interno del difetto cartilagineo (C), con conseguente riempimento completo del difetto (D, E).

3.3 Mosaicoplastica

La mosaicoplastica, o autotrapianto osteocondrale, è una tecnica di riparazione della cartilagine che prevede l'ottenimento di innesti osteocondrali cilindrici di piccole dimensioni provenienti dalla periferia minima portante dei condili femorali a livello dell'articolazione femoro-rotulea e il loro trapianto in siti difettosi preparati sulle superfici portanti. Combinazioni di innesti di diverse dimensioni consentono un tasso di riempimento compreso tra il 90% e il 100% [24].

L'autotrapianto osteocondrale ha il vantaggio di trapiantare cartilagine articolare intatta, che ha dimostrato di mantenere le normali proprietà biomeccaniche al momento dell'impianto iniziale.

La procedura, in generale, consiste in quattro fasi principali (Figura 3.2) [25]:

1. durante l'esame artroscopico iniziale, si valutano le dimensioni e la localizzazione del difetto dopo aver eseguito un *debridement* adeguato. In seguito, è possibile valutare il numero e le dimensioni degli autoinnesti necessari;
2. il prelievo dell'innesto viene quindi eseguito dalla periferia della troclea non portante;

3. per preparare l'inserimento dell'innesto nel sito ricevente, si inserisce una guida per trapano perpendicolare alla superficie articolare nel difetto per consentire l'alesatura della cavità dell'innesto;
4. gli innesti devono essere distanziati di circa 3 mm per evitare la confluenza dei tunnel e l'indebolimento dei condili. L'orientamento e la profondità di inserimento degli innesti sono fondamentali per imitare la curvatura nativa della superficie articolare interessata.

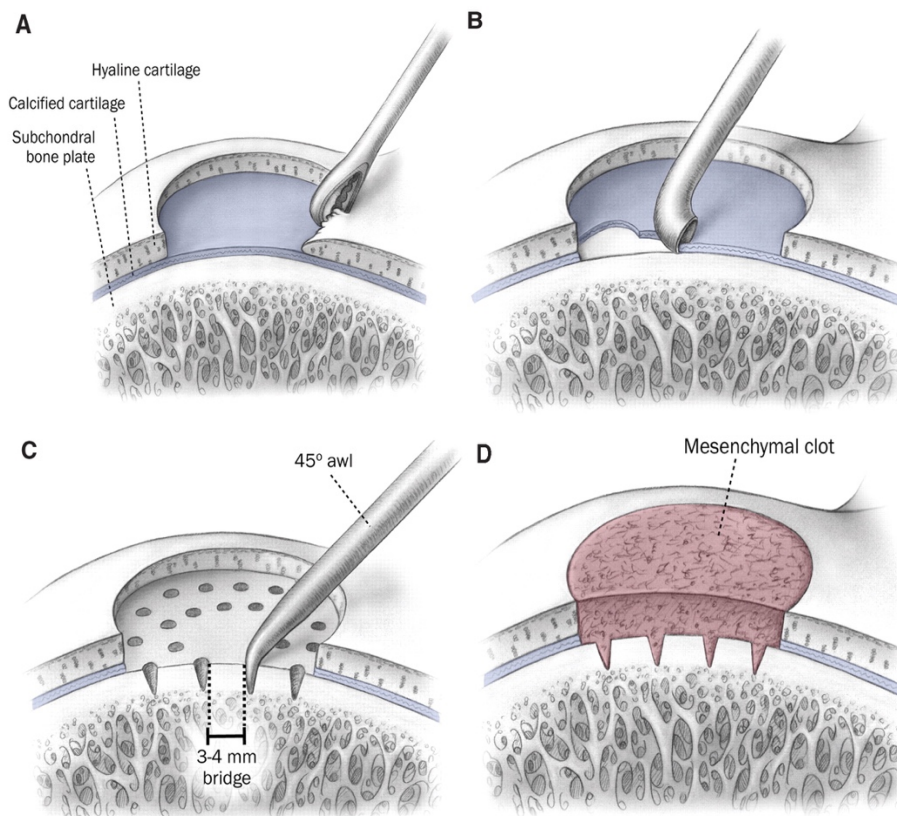


Figura 3.2: Illustrazione degli step per completare l'autotrapianto osteocondrale: debridement per ottenere una superficie regolare (A), rimozione dello strato cartilagineo calcificato (B), formazione dei tunnel per migliorare l'adesione dell'innesto (C), impianto dell'innesto per riparare il difetto (D). [25]

La mosaicoplastica utilizza il tessuto proveniente dal paziente stesso, eliminando il rischio di trasmissione di malattie infettive possibile con gli allotrapianti. La principale limitazione è la dimensione del difetto, in quanto la tecnica è più adatta per difetti da 1 a 4 cm². Le lesioni molto più grandi, fino a 8-9 cm², possono essere riempite con innesti multipli con il rischio di una significativa morbilità del sito di donazione.

L'analisi istologica dimostra un alto tasso di sopravvivenza della cartilagine ialina trasferita. Sono stati ottenuti risultati clinici da buoni a eccellenti nel 92% delle lesioni del condilo femorale, nell'87% delle lesioni tibiali, e nel 79% delle lesioni patellari. Ciò è stato confermato

in più studi con miglioramenti significativi del dolore e dei livelli di attività nell'85% dei pazienti con difetti osteocondrali del ginocchio.

Krych et al. hanno confrontato la microfrattura con l'autotrapianto osteocondrale in uno studio su 96 pazienti (48 pazienti per ogni tecnica) e hanno riscontrato un uguale miglioramento della componente fisica, delle attività di vita quotidiana a 5 anni di follow-up. Tuttavia, il gruppo di pazienti che hanno subito una mosaicoplastica è stato in grado di mantenere alti livelli di attività fisica rispetto all'altro gruppo nei follow-up successivi [23].

Lo studio di Solheim et al. ha riportato che il sesso femminile, un'età avanzata e una grande dimensione del difetto, rendono più probabile il fallimento della terapia. Marcacci et al hanno riscontrato che l'80% dei pazienti più giovani (età compresa tra 16 e 30 anni) ha ottenuto risultati clinici eccellenti e buoni con esiti clinici migliori rispetto ai pazienti più anziani (40 anni o più), attribuendo l'effetto a una migliore capacità di guarigione dei giovani.

Il limite massimo di età per la mosaicoplastica è stato accettato a 50 anni. Sebbene vi siano poche prove a sostegno di questa limitazione, è noto che la capacità di guarigione ossea e cartilaginea diminuisce con l'avanzare dell'età. Un altro fattore prognostico che può influenzare l'esito è la dimensione della lesione. Hangody et al. hanno affermato che un difetto condrale di 1-4 cm² è la dimensione ideale per la mosaicoplastica, dovuta alla limitata disponibilità di innesti da utilizzare per riempire i difetti di dimensione superiore senza causare morbidità del sito donatore [26].

3.4 Allotrapianto osteocondrale

L'osteochondral allograft trasplant (OCA) è una tecnica in un'unica fase che utilizza cartilagine ialina a tutto spessore, evita la morbidità del sito di donazione, consente il *resurfacing* di difetti di grandi dimensioni e potenzialmente produce un contorno più naturale e corrispondente all'anatomia della superficie del ricevente. Le ricerche condotte utilizzando il trapianto OCA per la riparazione condrale del ginocchio, hanno dimostrato un miglioramento dei punteggi di outcome riferiti dai pazienti (rispetto ai punteggi pre-chirurgici) e tassi di sopravvivenza dell'innesto compresi tra il 79% e il 100% a un follow-up medio di due-quattro anni [27].

L'OCA ha dimostrato risultati clinici costanti e può essere utilizzato per trattare una varietà di difetti articolari nel ginocchio utilizzando innesti da donatore di dimensioni adeguate che consentono un immediato ripristino strutturale della superficie articolare. L'innesto da cadavere elimina la morbidità del sito di donazione e consente il trattamento di lesioni più grandi (>2-3

cm²). Sebbene sia possibile una risposta immunogenica microscopica ai tessuti condrali trapiantati all'interfaccia osso-osso, è improbabile una risposta clinicamente significativa all'interno dell'articolazione, poiché la matrice cartilaginea intatta impedisce il contatto tra i condrociti del donatore e gli anticorpi dell'ospite.

La composizione degli allotrapianti osteocondrali è costituita da cartilagine ialina supportata da 5-8 mm di osso subcondrale.

William Bugbee et al. hanno creato una delle più grandi coorti di persone sottoposte a OCA, con oltre 800 pazienti. In una panoramica del 2016 hanno fornito dati di 467 pazienti, di età media di 34 anni (range 14-68) sottoposti a OCA per lesioni cartilaginee, degenerazione cartilaginea, osteonecrosi e osteoartrite precoce. I risultati variano in base all'eziologia e all'anamnesi. I risultati migliori sono stati osservati nei pazienti che avevano avuto un'osteonecrosi, 89% di sopravvivenza dell'innesto al follow-up medio di 5 anni, o dopo una precedente lesione cartilaginea. Sono stati osservati buoni risultati anche dopo OCA in pazienti di età inferiore ai 18 anni, con una sopravvivenza dell'innesto del 90% a 10 anni, o con un buon miglioramento della scala dei sintomi. I risultati non sono stati così positivi nell'OA con un tasso di fallimento del 46% in 48 pazienti.

Tuttavia, per molti pazienti affetti da OA, l'alternativa (se sono abbastanza anziani, in questo studio molti non lo erano, vista l'età media di 34 anni) sarebbe l'artroplastica di ginocchio (KA). In questi pazienti l'OCA potrebbe fornire solo un sollievo temporaneo dei sintomi in attesa di una successiva artroplastica.

Trico et al. hanno esaminato i risultati dell'OCA in base alle dimensioni del difetto cartilagineo in 156 pazienti. L'area media dell'innesto era di 6,4 cm², con un range da 2,3-11,5 cm². La sopravvivenza complessiva dell'innesto è stata del 97% a 5 anni e 93,5% a 10 anni, senza differenza in base alle dimensioni dell'innesto. Gli esiti sono stati sostanzialmente simili, ma i benefici sono stati maggiori nei difetti di grandi dimensioni (> 8 cm²) [28].

3.5 Impianto autologo di condrociti

L'Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) ha una storia clinica di 30 anni ed è una tecnica consolidata per il trattamento dei difetti della cartilagine [19].

In primo luogo, viene fatta una biopsia di cartilagine in un'area non portante dell'articolazione, viene poi trasferita in una soluzione nutritiva e sterile per il trasporto e la conservazione. Nel laboratorio di coltura cellulare i condrociti vengono isolati dal tessuto cartilagineo e vengono poi espansi in coltura monostrato. In un secondo intervento chirurgico, i condrociti espansi in

vitro vengono iniettati nel difetto; per aiutare l'adesione della massa un lembo periostale viene ulteriormente cucito sul difetto. È ben documentato che il lembo può avere capacità condrogeniche e aiutare nella riparazione della cartilagine [29].

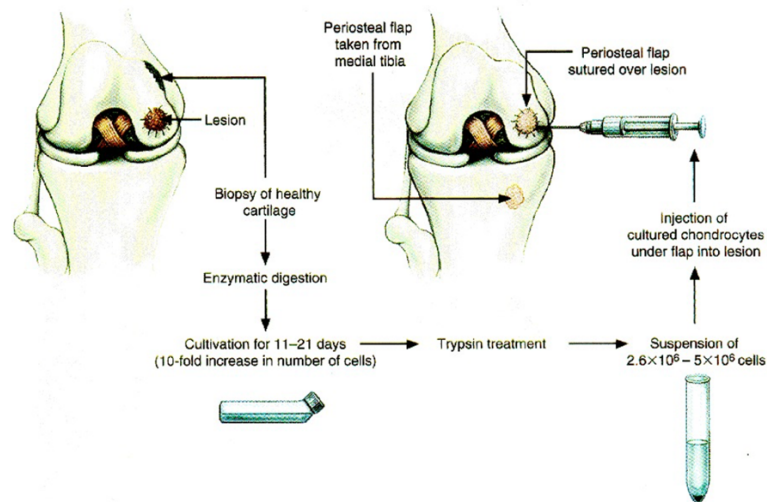


Figura 3.3: La riparazione della cartilagine attraverso la microfrattura prevede diverse fasi, tra cui la biopsia di cartilagine sana per estrarre i condrociti e successivamente per coltivarli in vitro (11-21 giorni). Successivamente viene effettuata l'iniezione di condrociti e per migliorarne l'adesione viene cucito sopra un lembo periostale.

Sebbene il tessuto di riparazione della cartilagine dopo l'ACI sia costituito principalmente da tessuto simile alla cartilagine che imita le caratteristiche macroscopiche, microscopiche e biomeccaniche della cartilagine ialina sana, è stato dimostrato che la maggior parte del collagene di tipo II è presente 30-60 mesi dopo il trattamento: ciò suggerisce che il tessuto di riparazione della cartilagine prodotto dopo il trattamento ACI richiede alcuni anni per maturare [30].

L'ACI è in uso clinico nell'uomo dal 1987 ed è stata eseguita su oltre 12.000 pazienti in tutto il mondo. Ha ridotto significativamente il dolore e si è osservata persino la produzione di tessuto cartilagineo durevole. I risultati dopo un follow-up di nove anni sono molto incoraggianti, sebbene la riparazione del difetto non sia uniforme in tutte le aree dell'articolazione.

Lo studio randomizzato di Knutsen et al. ha confrontato l'ACI con la microfrattura e i risultati a 5 anni hanno suggerito che entrambi i metodi hanno fornito esiti soddisfacenti nel 77% dei pazienti. Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nei risultati clinici e radiografici tra i due gruppi di trattamento.

Serie di casi a lungo termine con un follow-up di oltre 10 anni hanno dimostrato che l'ACI è un trattamento efficace e duraturo per le lesioni cartilaginee del ginocchio di grandi dimensioni

(maggiori di 4 cm²). Altri studi clinici hanno riportato risultati simili, evidenziando i vantaggi della combinazione dell'ACI con un'osteotomia correttiva. La superiorità dell'ACI rispetto ad altri trattamenti standard in studi clinici prospettici randomizzati e controllati, tuttavia, è controversa.

Nonostante i risultati clinici incoraggianti, vi sono ancora limitazioni all'uso dell'ACI. Queste sono principalmente legate alla complessità e al costo delle due procedure chirurgiche, alla risposta biologica del lembo periostale e alla de-differenziazione e la conseguente perdita di capacità associate all'espansione in vitro di condrociti isolati. La maggior parte delle complicanze cliniche associate all'ACI sono infatti legate al lembo periostale [29].

3.6 L'artroplastica del ginocchio

L'artroplastica del ginocchio è una procedura chirurgica intrapresa per sostituire le superfici portanti dell'articolazione del ginocchio ripristinandone la funzione. Può essere eseguita come artroplastica parziale, detta anche unicompartmentale (UKA), che sostituisce solo le superfici danneggiate, conservando le parti non danneggiate, oppure come artroplastica totale del ginocchio (TKA), che prevede la sostituzione di tutti e tre i compartimenti del ginocchio, noti come compartimento mediale, compartimento laterale e compartimento femoro-rotuleo [31].

3.6.1 Artroplastica unicompartmentale

Negli ultimi anni sono stati riportati buoni risultati clinici per l'artroplastica unicompartmentale del ginocchio (UKA), che risultano paragonabili alla TKA anche includendo un follow-up a lungo termine. Molti studi hanno riportato risultati soddisfacenti per quanto riguarda gli esiti clinici dopo l'UKA, come la riduzione del dolore dopo l'intervento, il ripristino del range di movimento, la correzione della deformità angolare e il miglioramento delle funzioni del ginocchio. Inoltre, presenta i vantaggi di ridurre al minimo la resezione ossea, di ridurre l'uso di polietilene e cemento osseo e di preservare le normali funzioni del ginocchio rispetto alla TKA, con conseguente riduzione dei tempi di intervento e rapido recupero. Di conseguenza, il periodo di morbilità dopo l'intervento è breve e si può ottenere un buon movimento dell'articolazione.

Tuttavia, l'UKA presenta anche alcuni difetti, come le difficoltà nelle tecniche chirurgiche, la possibile migrazione della protesi, le infezioni e i difetti ossei sviluppati dopo la revisione. Nonostante queste difficoltà tecniche, le complicanze dell'UKA sono state osservate raramente. Pandit et al. hanno riportato un tasso di sopravvivenza a dieci anni del 96%, se si considerano

come fallimenti tutte le rioperazioni legate all'impianto e la loro incidenza è stata del 2,9% durante il follow-up medio di 5 anni. La ragione più comune per un ulteriore intervento chirurgico è stata la progressione dell'artrite nel comparto laterale, seguita dalla dislocazione dell'accoppiamento e dalla revisione per dolore inspiegabile [32].

3.6.2 Artroplastica totale del ginocchio

La TKA è stata ampiamente eseguita a partire dagli anni Settanta. La OA è la principale indicazione clinica per cui vengono eseguiti questi interventi (Figura 3.3). A causa dell'invecchiamento della società e dell'epidemia di obesità, la prevalenza dell'OA è in aumento. Di conseguenza, si prevede che i tassi di intervento di TKA aumenteranno e alcune stime indicano addirittura una domanda quadruplicata entro il 2030.

L'aumento degli interventi ha importanti implicazioni per i costi dell'assistenza sanitaria, per questo motivo è molto importante che i pazienti siano selezionati con cura e che questi interventi siano programmati in modo ottimale per ottenere i migliori risultati possibili per il paziente e per evitare interventi di revisione, riducendo così i costi e gli esiti peggiori [33].

Il rischio di OA al ginocchio è governato da una complessa interazione di fattori costituzionali e meccanici. Questi fattori includono la densità ossea, la morfologia ossea, la disfunzione meniscale, i traumi e il sesso, tuttavia i fattori con più incidenza sono l'obesità e l'età. La mobilità dei pazienti è generalmente influenzata dai sintomi, ma il grado è variabile e il dolore predomina come indicazione principale per l'intervento chirurgico. Tuttavia, non c'è consenso su quale debba essere l'esatta gravità dei sintomi per indicare l'intervento chirurgico.

Nonostante alcuni risultati incoraggianti, i pazienti di età inferiore ai 55 anni o con obesità patologica preoperatoria hanno esiti più variabili dopo la sostituzione del ginocchio rispetto a quelli di età superiore ai 55 anni e a quelli con un indice di massa corporea inferiore [34].

Dopo la TKA, i movimenti del paziente sono limitati e ristretti a causa della diminuzione della forza muscolare. È stato riscontrato che la funzione muscolare è ridotta del 20-25% a un mese dalla TKA, mentre dopo un anno rimane inferiore a quella degli adulti sani. Inoltre, il range di movimento (ROM) dell'articolazione del ginocchio è ridotto a causa del dolore post-operatorio, dell'ematoma e del gonfiore. I programmi di riabilitazione sono di massima importanza perché possono migliorare la funzione, il risultato e la mobilità del paziente dopo l'operazione [35].

Nonostante le elevate percentuali di successo, molti pazienti sottoposti a TKA rimangono insoddisfatti del risultato clinico, in quanto sviluppano dolore cronico dopo l'intervento, che rappresenta un grave onere per la loro salute. Un numero significativo di pazienti richiede una

TKA di revisione (RTKA), una procedura che sostituisce la protesi del ginocchio precedentemente impiantata con una nuova protesi [34].

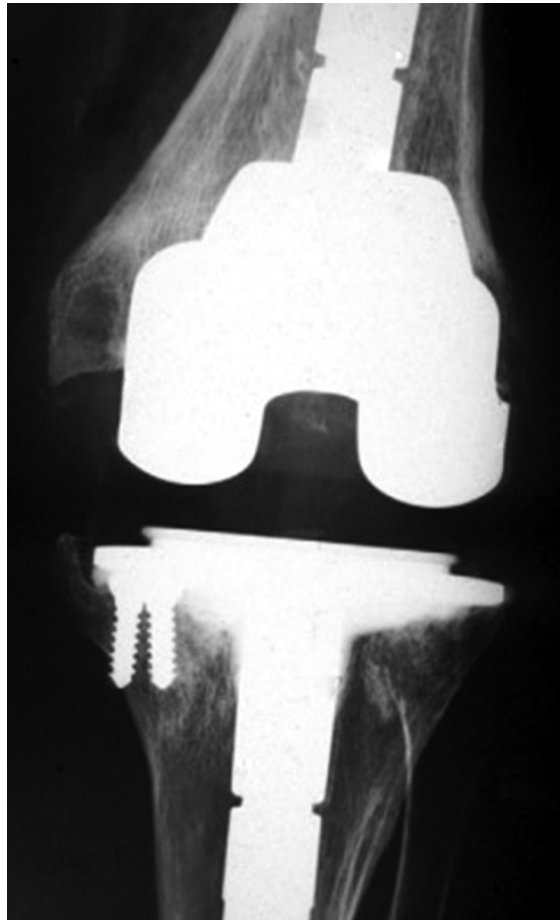


Figura 3.3. Radiografia postoperatoria per l'artroplastica totale di ginocchio.

3.6.3 Revisione dell'artroplastica totale del ginocchio

L'instabilità post-operatoria è una delle principali cause di revisione della TKA, che può essere richiesta per vari motivi, tra cui usura del polietilene, usura del metallo, mobilizzazione dell'impianto, instabilità, infezione, malposizionamento, frattura periprotetica e rottura dell'impianto.

L'instabilità è una delle modalità più comuni di fallimento della TKA e può essere definita come uno spostamento anomalo ed eccessivo di una protesi di ginocchio. L'artrite reumatoide, le malattie del tessuto connettivo e l'osteoartrite sono fattori di rischio per l'instabilità post-operatoria.

Nella TKA di revisione è imperativo identificare la causa del fallimento dell'operazione e risolvere i problemi specifici con metodi di trattamento appropriati. L'instabilità è per lo più

attribuibile alla mobilizzazione della protesi, alla perdita ossea, alla rottura della protesi, all'usura o alla lassità del legamento collaterale.

Petersen et al. sostengono che i pazienti con OA sottoposti a RTKA presentano un maggior numero di complicazioni croniche dopo l'intervento. Nel loro studio, 99 pazienti affetti da OA sono stati esaminati dopo l'intervento di RTKA e hanno riscontrato una riduzione della funzionalità, una peggiore qualità della vita e una maggiore intensità del dolore rispetto ai pazienti sottoposti a TKA.

Capitolo 4. L'ingegneria tissutale nella rigenerazione della cartilagine

4.1 Introduzione

Il grande numero di cause che possono determinare la degenerazione della cartilagine ha portato al centro dell'attenzione clinica nuovi metodi per riparare il tessuto danneggiato e per prevenire l'insorgenza di patologie. Si è potuto riscontrare che nessuna soluzione finora utilizzata ha riportato ottimi risultati a lungo termine.

Negli ultimi anni sono stati proposti diversi metodi di formazione di un nuovo tessuto attraverso l'uso di cellule proprie della cartilagine, i condrociti, oppure attraverso l'uso di cellule staminali. Infatti, l'ingegneria tissutale si occupa dell'applicazione combinata dei principi delle scienze della vita e dell'ingegneria per comprendere le relazioni strutturali e funzionali nei tessuti fisiologici e patologici, utilizzando biomateriali come supporti. Questo settore multidisciplinare della scienza utilizza le proprietà di un materiale poroso biocompatibile e biodegradabile sotto forma di impalcatura o modello tridimensionale (scaffold) su cui vengono seminate le cellule per promuovere la crescita del tessuto [36].

Molti studi si sono basati sui biomateriali che possono fungere da scaffold e molto si è fatto per migliorare l'ambiente di coltura delle cellule attraverso la messa a punto di specifici bioreattori.

I passaggi fondamentali dell'ingegneria tissutale si possono riassumere in tre punti:

- prelievo di cellule;
- produzione di uno scaffold;
- condizionamento biochimico e meccanico del costrutto, ottenuto seminando le cellule sullo scaffold, attraverso l'uso di fattori di crescita e bioreattori.

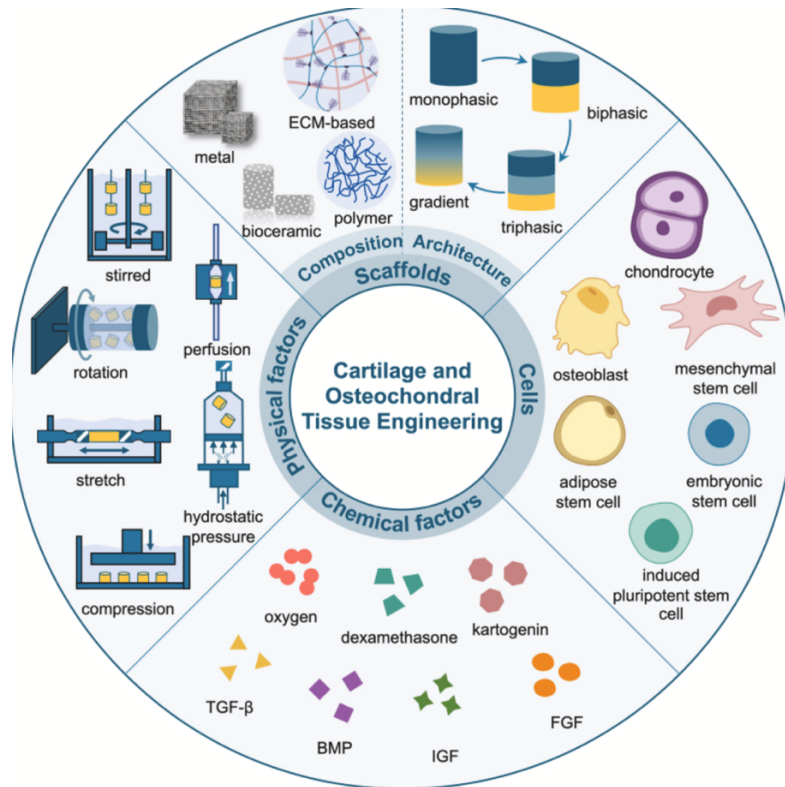


Figura 4.1: L'illustrazione schematica degli elementi chiave dell'ingegneria tissutale cartilaginea e osteocondrale, tra cui la progettazione dell'impalcatura dal punto di vista della composizione e dell'architettura, l'incapsulamento delle cellule e dei fattori di segnalazione e l'applicazione di stimoli fisici.

4.2 Selezione del tipo cellulare

4.2.1 Condrociti

I condrociti sembrano essere il tipo di cellule più ovvio da utilizzare nel trattamento dei difetti condrali. Tuttavia, l'esperienza acquisita con l'applicazione della tecnica ACI ha rivelato una serie di problemi con questa scelta. Il problema principale è che i condrociti maturi tendono a cambiare il loro fenotipo quando vengono coltivati in condizioni di laboratorio: per evitare ciò, è necessario attenersi a una procedura molto rigorosa e mantenere una coltura per non più di 4-6 settimane [37].

La maggior parte delle volte i condrociti si trasformano in cellule simili ai fibroblasti e ciò comporta un cambiamento nei costituenti della matrice extracellulare che producono.

Anche i condrociti non articolari, come i condrociti costali o nasali, sono oggetto di studio come fonti cellulari alternative. Come la cartilagine articolare, anche l'ambiente extracellulare della cartilagine costale è ricco di collagene e glicosamminoglicani: infatti, ha mostrato proprietà meccaniche e biochimiche simili a quelle della cartilagine articolare nativa.

I condrociti ottenuti dal setto nasale possiedono una maggiore capacità di produrre tessuti cartilaginei simili alla cartilagine ialina e mostrano anche la plasticità necessaria per adattarsi a un ambiente a elevati stimoli meccanici [38].

I condrociti vengono poi utilizzati per l'ACI; tuttavia, uno dei principali inconvenienti, indipendentemente dalla loro origine, è l'instabilità del loro fenotipo in coltura monostrato. Questa instabilità è accompagnata dall'orientamento delle cellule verso un fenotipo fibroblastico caratterizzato da un'aumentata espressione di collagene di tipo I e dall'adozione della caratteristica forma a fuso tipica dei fibroblasti. Nonostante la reversibilità di questo fenomeno in coltura 3D, questo processo di de-differenziazione ha motivato la ricerca di cellule alternative ai condrociti per l'ingegneria dei tessuti cartilaginei [39].

4.2.2 Cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate con un elevato potenziale rigenerativo e, almeno teoricamente, una capacità di divisione illimitata, in grado di auto-rigenerarsi e trasformarsi in qualsiasi linea cellulare. Sono presenti nei tessuti di tutti gli organismi multicellulari. A seconda del loro potenziale differenziativo, le cellule staminali possono essere toti-, pluri-, multi- o unipotenti.

Negli ultimi anni le cellule staminali sono state raccolte da una varietà di tessuti, come il midollo osseo, il tessuto adiposo, la pelle e la membrana sinoviale. I tipi più studiati includono le cellule ematopoietiche derivate dal midollo e le cellule staminali mesenchimali (MSC) del midollo e dell'adipe. Il potenziale condrogenico delle cellule staminali ematopoietiche derivate dal midollo è stato confermato da Johnstone nel 1998 [37], che ha introdotto il TGF- β 1 nella coltura. Le cellule hanno iniziato a produrre collagene di tipo II e X, mentre il numero di molecole di collagene di tipo I è diminuito. L'aspetto negativo di questa metodica è l'invasività, poiché per il prelievo del midollo osseo il paziente deve essere sottoposto ad anestesia generale o intraspinale; inoltre, il numero di cellule del tessuto che possono essere ottenute è relativamente basso, circa 1 ogni 105. Di conseguenza, è necessario moltiplicare il numero di cellule in una coltura ex vivo. Ciò richiede l'uso di terreni e fattori di crescita appropriati, ma comporta anche il rischio di variazione della capacità differenziativa nel corso della coltura o addirittura di perdita della stessa.

Negli ultimi anni, una fonte di cellule staminali mesenchimali è stata individuata nel tessuto adiposo. Analogamente al midollo osseo, il tessuto adiposo è di origine mesodermica e contiene una popolazione eterogenea di cellule staminali. Come si evince da numerosi studi pubblicati,

queste cellule mantengono la capacità di differenziarsi in osteociti, condrociti e miociti. Tuttavia, il loro più grande vantaggio è l'ubiquità e l'abbondanza di adipe nell'organismo, il che significa che la procedura di prelievo non è particolarmente invasiva. Le procedure di liposuzione sono ben tollerate e il rischio associato di complicazioni è solo dello 0,1% circa. Inoltre, il metodo consente un elevato tasso di sopravvivenza delle cellule prelevate, che può raggiungere il 98-100% [37]. Le cellule staminali di derivazione adiposa sono facili da coltivare all'esterno dell'organismo e, rispetto alle cellule ottenute da altre fonti, invecchiano a un tasso inferiore. D'altra parte, il potenziale condrogenico delle cellule staminali di derivazione adiposa è inferiore a quello delle cellule di derivazione midollare.

Un altro problema è il numero di cellule prodotte: le cellule staminali costituiscono tra l'1 e il 2% di tutte le cellule nucleate isolate dal tessuto adiposo. Per ottenere una popolazione pura di diversi milioni di cellule staminali, è necessaria una coltura a lungo termine in vitro e questo allunga notevolmente la durata del trattamento clinico [40].

4.3 Bioreattori

I bioreattori sono dispositivi che mantengono le condizioni biologiche ideali per la coltura cellulare. Attraverso l'uso dei bioreattori si cerca di imitare le condizioni presenti nell'organismo in modo da favorire il più possibile la crescita cellulare e in seguito quella tessutale.

Un'ulteriore applicazione è nella stimolazione della differenziazione cellulare. Molto spesso, infatti, la stimolazione meccanica viene usata per indurre le cellule staminali a differenziarsi in uno specifico tipo cellulare.

Nel caso della cartilagine, i bioreattori cercano di riprodurre i carichi meccanici a cui è solitamente sottoposta nell'organismo. Gli scaffold in cui sono state coltivate le cellule staminali sono introdotti in tali dispositivi per favorire la produzione di nuovo tessuto funzionale da essere usato come sostituto per il tessuto danneggiato. I bioreattori possono essere classificati in base al principale tipo di stress applicato [41].

4.3.1 Bioreattori Spinner Flasks (SFs)

I bioreattori spinner flask sono composti da pochi elementi e la loro architettura è relativamente semplice (Figura 4.2). Uno o più scaffold sono immersi in una camera riempita con un terreno di coltura (medium) e sospesi in esso con degli aghi. Tramite la rotazione di una barretta magnetica, posta all'interno della camera, viene messo in movimento il medium attorno allo

scaffold. Il moto convettivo che si genera favorisce il trasporto di massa di ossigeno e metaboliti e la rimozione dei cataboliti.

Gli SF sono stati utilizzati per creare cartilagine a partire da MCS derivate dal tessuto adiposo umano e i risultati hanno dimostrato che la differenziazione condrogenica in vitro è risultata migliore rispetto alle colture monostrato. Nonostante ciò, questo tipo di bioreattori presenta molte limitazioni: le cellule che sono penetrate più in profondità nello scaffold non ricevono sufficiente apporto di nutrienti e ossigeno andando incontro ad apoptosi; inoltre, non è possibile applicare stimoli di tipo meccanico o elettrico se non lo sforzo di taglio sulle pareti dello scaffold generato dal moto del medium.

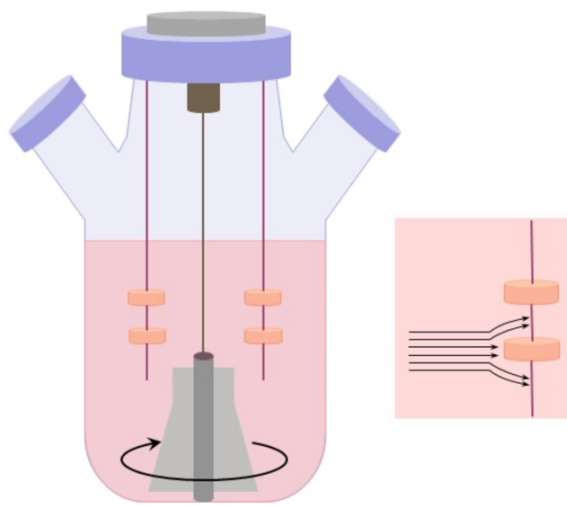


Figura 4.2: Bioreattore Spinner Flask [42].

4.3.2 Bioreattori a parete rotante (RWVs)

Questi bioreattori sono costituiti da una coppia di cilindri concentrici: cilindri esterni rotanti per contenere scaffold o cellule e cilindri interni statici per lo scambio di gas (Figura 4.3). Questo tipo di bioreattori può essere visto come l'opposto dei spinner flask, in quanto è il costruito a muoversi all'interno del medium e non viceversa. Lo scaffold, alloggiato su un supporto cilindrico e immerso nel medium, è messo in rotazione tramite un attuatore posto all'esterno della camera di coltura. Questo permette una colonizzazione cellulare più omogenea nello scaffold rispetto allo spinner flask, anche se permane il problema del non adeguato trasporto di massa per elevate densità cellulari.

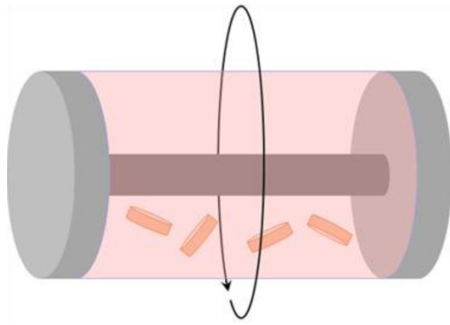


Figura 4.3: Bioreattore a parete rotante [42].

4.3.3 Bioreattori a perfusione

I bioreattori a perfusione sono tra i più diffusi nelle applicazioni di ingegneria tissutale poiché le loro caratteristiche si adattano a più tessuti. Questa tipologia di bioreattori è stata introdotta per superare le limitazioni presenti in altri tipi di bioreattori come quelli spinner flask, soprattutto per quanto riguarda il trasporto di massa e la semina delle cellule sullo scaffold. Quest'ultimo, durante il funzionamento di questo tipo di bioreattori, viene fissato in una camera di coltura e il medium gli fluisce attraverso, messo in moto da una pompa a monte della camera.

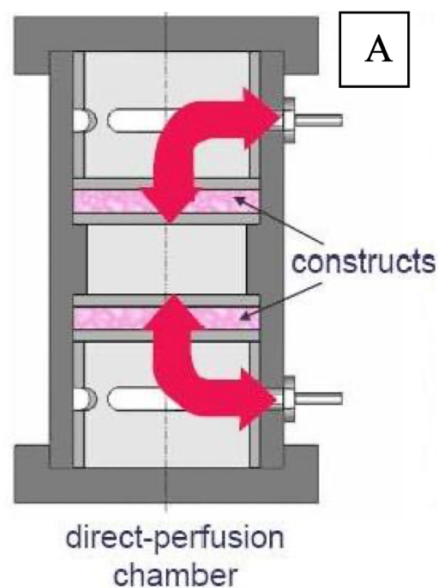


Figura 4.4: esempio di bioreattore a perfusione.

4.3.4 Bioreattore a compressione

Questa tipologia di bioreattori è ampiamente utilizzata nella rigenerazione del tessuto cartilagineo e osseo. Tramite questo sistema di coltura è possibile applicare al costruito sia una sollecitazione statica, quindi una compressione costante nel tempo, che un carico dinamico,

ossia una sollecitazione meccanica variabile nel tempo per intensità e verso. In uno studio [43] si dimostra come una compressione meccanica dello scaffold seminato con condrociti favorisca la produzione di componenti della ECM oltre a mantenere il fenotipo delle cellule seminate.

4.3.5 Bioreattori magnetici

Recenti studi hanno dimostrato che i campi magnetici influenzano cellule, tessuti e interi organismi, compresa la formazione della matrice extracellulare della cartilagine ialina, la proliferazione dei condrociti e la sintesi dei proteoglicani. Questo tipo di bioreattori consiste in uno o più magneti permanenti che influenzano il comportamento delle cellule attraverso l'intensità del campo magnetico statico o dinamico (Figura 4.5) [42].

In uno studio [42] è stato analizzato un bioreattore a campo magnetico variabile composto da magneti permanenti, utilizzato per la coltura di MSC senza scaffold; i risultati hanno mostrato che il bioreattore non ha migliorato la condrogenesi, pertanto è necessario condurre ulteriori studi per convalidarne il miglioramento in risposta ad un campo magnetico.

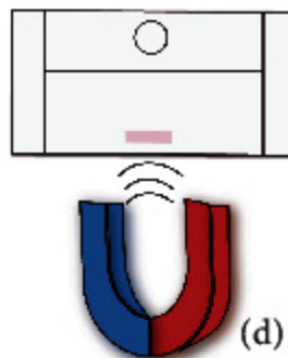


Figura 4.5: Bioreattore magnetico [42].

4.3.6 Stimoli meccanici

La cartilagine articolare è in grado di sopportare stimoli meccanici complessi e di distribuire carichi all'osso subcondrale. È stato dimostrato che un'adeguata stimolazione meccanica regola l'espressione genica nei condrociti, mantenendo il loro fenotipo e promuovendo così la formazione della cartilagine. Allo stesso modo, una compressione approfondita dell'effetto della stimolazione meccanica sulla differenziazione condrogenica delle MSC può facilitare il successo delle terapie rigenerative della cartilagine a base di MSC nelle articolazioni, che hanno un ambiente meccanicamente impegnativo [44]. Si propone che le MSC rispondano alla stimolazione meccanica attraverso un'attività paracrina per migliorare la loro differenziazione condrogenica e la capacità di riparare i danni alla cartilagine. Sono stati applicati vari tipi di

stimolazione meccanica per migliorare la differenziazione condrogenica delle MSC nell'ingegneria del tessuto cartilagineo. Uno studio ha esaminato l'effetto della compressione dinamica sulla differenziazione condrogenica delle MSC e hanno scoperto che essa migliorava e sopprimeva l'ipertrofia condrocitaria. La resistenza meccanica dei costrutti è risultata significativamente migliorata e simile a quella della cartilagine nativa [45]. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che gli ultrasuoni pulsati a bassa intensità (LIPUS), che forniscono una stimolazione meccanica sotto forma di onde sonore, possono essere utilizzati per promuovere il differenziamento condrogenico delle cellule [46]. Dopo la stimolazione con LIPUS a 3 MHz, le MSC hanno secreto una maggiore quantità di ECM simile alla cartilagine e hanno mostrato una maggiore espressione di geni condrogenici, come COL II, SOX9 e ACAN [46].

Campo elettromagnetico

È stato dimostrato che il campo elettromagnetico (EMF) promuove il differenziamento condrogenico delle MSC [13]. Uno studio [47] ha analizzato l'impatto dei campi elettromagnetici sulle hMSC durante il differenziamento condrogenico e hanno scoperto che le MSC esposte a un campo elettromagnetico a bassa frequenza (5 mT) mostravano una maggiore espressione di COL II, un aumento del contenuto di glicosamminoglicani e una minore espressione di COL X rispetto a quelle non trattate con un campo elettromagnetico. Analogamente, è stato dimostrato che la differenziazione condrogenica ottimale delle MSC è stata ottenuta con un'esposizione a campi elettromagnetici pulsati di breve durata (10 minuti) e bassa intensità (2 mT) prima dell'induzione condrogenica, piuttosto che con un'esposizione a campi elettromagnetici prolungata e ripetitiva [48].

4.4 Differenziazione condrogenica

Le cellule staminali mesenchimali sono cellule multipotenti caratterizzate dalla capacità di proliferare e differenziarsi. Le MSC possono dare origine a diversi tipi di cellule differenziate, tra cui condrociti, adipociti, osteoblasti. La fonte più studiata di MSC è il midollo osseo, ma sono state isolate anche da muscoli e tessuto adiposo.

Le MSC possono essere indotte al differenziamento condrogenico utilizzando specifici fattori ambientali. Tra questi fattori, la coltura 3D, la bassa tensione di ossigeno e gli stimoli meccanici sono i più documentati. L'aggregazione ad alta densità mediante centrifugazione pone le cellule in un ambiente 3D in vitro che imita da vicino la condensazione cellulare osservata durante lo sviluppo embrionale della cartilagine in vivo.

Considerando che la cartilagine articolare è un tessuto sottoposto a vari stimoli meccanici, tra cui la pressione idrostatica e lo stress compressivo o di taglio, è stato considerato il ruolo degli stimoli meccanici. Il carico fisiologico è un fattore centrale che influenza la differenziazione condrogenica delle MSC durante lo sviluppo della cartilagine articolare. Gli stimoli meccanici applicati ai condrociti sono risultati essenziali per mantenere l'integrità della cartilagine. Di conseguenza, vi sono rapporti convincenti sul fatto che gli stimoli meccanici possono essere utilizzati per generare costrutti ingegnerizzati di cartilagine con un'organizzazione strutturale dei componenti della ECM (collagene e glicosamminoglicani) molto simile a quella della cartilagine nativa [39].

4.4.1 Fattori di crescita

I fattori di crescita sono un gruppo di proteine che mediano la proliferazione, la migrazione e la differenziazione cellulare legandosi a recettori transmembrana situati sulle cellule bersaglio. Quando un numero sufficiente di recettori viene attivato, il processo di trasduzione della segnalazione può innescare una serie di attività cellulari specifiche. Per quanto riguarda lo sviluppo della cartilagine, i fattori di crescita svolgono un ruolo essenziale nella regolazione dei processi di condrogenesi e ipertrofia, come i membri della superfamiglia del transforming growth factor- β (TGF- β), del fattore di crescita insulino simile (IGF-1), della famiglia del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e del fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) [40].

Transforming Growth Factor- β

La superfamiglia del TGF- β comprende più di 30 proteine strettamente correlate, tra cui principalmente i tipici TGF- β e le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs). Un gran numero di studi ha dimostrato che hanno effetti regolatori significativi sull'omeostasi e sulla riparazione della cartilagine.

Esistono tre isoforme di TGF- β (1-3) che sono generalmente considerate potenti stimolatori in tutte le fasi della condrogenesi con la funzione di indurre la sintesi di proteoglicani e collagene di tipo II.

Il TGF- β è uno dei principali iniziatori della differenziazione delle cellule staminali mesenchimali (MSC) in condrociti. Migliora l'adesione, l'aggregazione cellulare e, successivamente, promuove la proliferazione, la differenziazione e la deposizione della matrice extracellulare specifica della cartilagine. Tra queste tre isoforme, il TGF- β 1 è stato il primo a

essere scoperto e i TGF- β 1 e TGF- β 3 sono stati utilizzati in un gran numero di studi per esplorare l'effetto del TGF- β sulla riparazione dei difetti della cartilagine. Sebbene alcuni studi suggeriscano che la capacità del TGF- β 2 e del TGF- β 3 di promuovere la differenziazione della cartilagine possa essere superiore a quella del TGF- β 1, è opinione condivisa che non vi siano differenze significative tra le tre isoforme [49].

Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) sono membri della superfamiglia TGF- β e possono indurre la differenziazione delle MSC attraverso le classiche vie Smad e non-Smad (classe di proteine che modulano l'attività dei ligandi del TGF- β) per formare la cartilagine e promuovere la sintesi della ECM della cartilagine. Finora sono state individuate almeno 15 diverse BMPs, di cui la BMP-2, la BMP-4, la BMP-6 e la BMP-7 sono state le più studiate nel campo dell'ingegneria tissutale della cartilagine. In particolare, è stato dimostrato che la BMP-2 è altamente espressa durante il processo condrogenico; pertanto, è stata comunemente applicata per migliorare la rigenerazione della cartilagine in vitro e in vivo [40].

Insulin-like growth factor

In studi in vitro e in vivo è stato dimostrato che entrambe le isoforme del fattore di crescita insulino-simile (IGF), IGF-1 e IGF-2, promuovono la proliferazione dei condrociti, stimolano la sintesi della matrice extracellulare della cartilagine e inibiscono l'attività degli enzimi che degradano la matrice extracellulare, a vantaggio della riparazione della cartilagine (Figura 4.6). In particolare, è stato dimostrato che l'IGF-1 è in grado di indurre la differenziazione condrogenica delle MSC in modo indipendente e che le sue funzioni sono state potenziate se combinato con altri fattori di crescita [50]. In uno studio hanno riportato che l'IGF-1 e il TGF- β 1, inseriti in un'impalcatura di gel di laminina in combinazione con cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (BM-MSCs) hanno ottenuto un effetto migliore sulla formazione di cartilagine articolare con una migliore disposizione cellulare rispetto allo scaffold di gel di laminina che caricava il solo IGF-1 in difetti osteocondrali di coniglio [51].

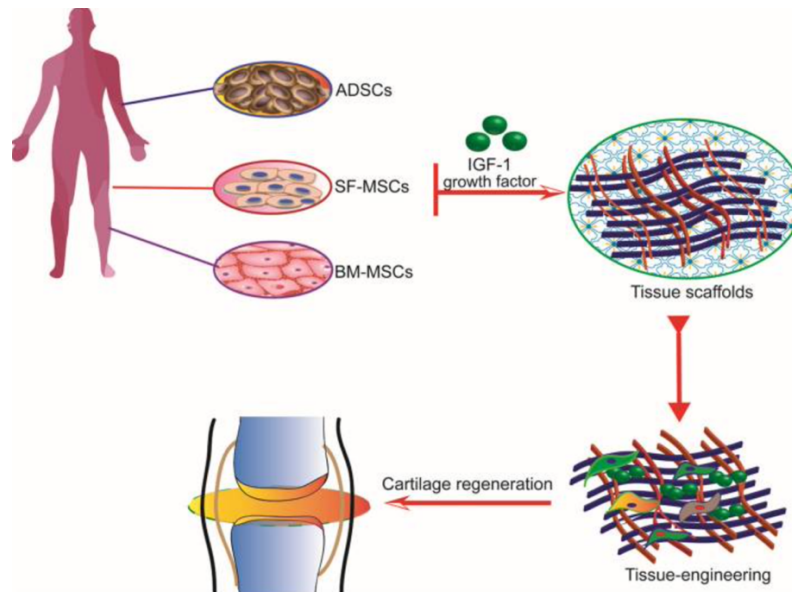


Figura 4.6: Le MSC, come ADSC, e BM-MSC, vengono seminate su scaffold. L'aggiunta di IGF-1 può indurre la differenziazione condrogenica delle MSC e promuovere la formazione di tessuto cartilagineo, l'accumulo di GAG della matrice cartilaginea e la produzione di collagene di tipo II [49].

Fibroblast growth factors

I fattori di crescita dei fibroblasti (FGF) sono una famiglia di 22 proteine altamente omologhe che hanno dimostrato di avere il potenziale per promuovere la rigenerazione dei tessuti. Per quanto riguarda la cartilagine, gli FGF sono strettamente correlati alla proliferazione dei condrociti, allo sviluppo delle articolazioni e all'omeostasi della matrice cartilaginea. L'FGF di base (bFGF) o FGF-2 è il membro rappresentativo che è stato maggiormente esaminato in termini di effetti sui condrociti e sulle MSC [40]. Il trattamento con FGF-2 ha influito sul mantenimento del potenziale di condrogenesi durante l'espansione della cartilagine monostrato, consentendo un uso più efficace del tessuto prelevato per la rigenerazione della cartilagine. In un contesto in vitro, le MSC umane esposte a FGF-2 (hMSCs) hanno subito una differenziazione condrogenica precoce. Inoltre, il trattamento con FGF-2 e coagulo di fibrina si è rivelato utile per la riparazione rigenerativa della cartilagine articolare e dell'osso subcondrale sottostante. Tuttavia, la combinazione di FGF-2 e BMP-6 potrebbe sopprimere la capacità di quest'ultima di indurre la differenziazione condrogenica.

Esistono anche ricerche che riportano che l'FGF-2 può inibire il TGF- β e indebolire il potenziale condrogenico del TGF- β nelle MSC. Tuttavia, l'FGF è coinvolto nello sviluppo della cartilagine e il processo di differenziazione condrogenica delle MSC e la sua interazione con altri fattori di crescita devono essere ulteriormente studiati al fine di chiarire la strategia ottimale per la rigenerazione della cartilagine in vitro e in vivo [50].

Platelet-derived growth factor

Il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) ha potenti effetti mitogeni e chemiotattici sulle cellule di origine mesenchimale, comprese le MSC e i condrociti. È stato osservato che l'esposizione prolungata a PDGF aumenta significativamente i condrociti in modo dose-dipendente e aumenta la produzione di matrice cartilaginea, mentre sopprime la progressione delle cellule lungo la via di maturazione endocondrale [50]. Grazie a uno studio si è potuto valutare l'effetto della somministrazione locale di PDGF per i difetti osteocondrali a tutto spessore; è stato confermato un miglioramento macroscopico e istologico [52].

4.4.2 Scaffold

Per trattare i difetti della cartilagine utilizzando il trapianto di MSC, è necessario un mezzo che le contenga, ne consenta la crescita e le renda meno soggette a effetti ambientali deleteri. In genere, il problema comune che si presenta durante il trapianto di cellule nei difetti della cartilagine è la loro fuoriuscita. Queste cellule non aderiscono al sito del difetto e quindi è necessario uno scaffold per il loro trapianto [46].

L'uso di scaffold è una componente chiave per il successo dell'ingegneria della cartilagine. Le matrici utilizzate sono seminate con diverse fonti di cellule espanse in vitro (come MSC), consentendo il mantenimento, il recupero o l'acquisizione di un fenotipo condrocitario differenziato che può essere trapiantato in vitro. Le matrici servono anche come supporto per reclutare BM-MSC (cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo) nel sito dei difetti osteocondrali per attivare il processo di riparazione subcondrale. In tutti i casi la natura dello scaffold, cioè le sue caratteristiche fisiche e chimiche, influenzano la qualità del tessuto neosintetizzato. Gli scaffold, per definizione, devono essere:

1. biocompatibili per ridurre al minimo, per quanto possibile, le risposte immunologiche e per integrarsi con il tessuto adiacente;
2. biodegradabili, per consentire il riassorbimento graduale e controllato che deve avvenire in contemporanea alla crescita cellulare e tissutale;
3. porosi, per consentire la migrazione cellulare delle cellule caricate o delle cellule native e la diffusione di sostanze nutritive, gas e rifiuti;
4. pro-adesivi, per l'adesione delle cellule e la somministrazione di molecole bioattive;
5. strutturalmente e meccanicamente compatibili, per sostenere il carico e la deformazione del tessuto senza perdita di volume [40].

Per l'ingegneria tissutale della cartilagine è stata prodotta e valutata una quantità considerevole di biomateriali basati su polimeri naturali e sintetici, tra cui spugne, idrogel e fibre, ma pochi sono comunemente utilizzati nell'approccio clinico.

Nei difetti osteocondrali, le impalcature che vengono sostituite dalla neocartilagine devono sopravvivere fino alla formazione di due tipi di tessuti: osso e cartilagine. La crescita della cartilagine superficiale dipende dalla disponibilità di osso subcondrale e, se quest'ultimo non si forma entro un determinato periodo, la rigenerazione della cartilagine può essere ostacolata [46]. Durante la guarigione della cartilagine articolare, l'integrazione del tessuto rigenerato con quello nativo adiacente è un altro problema. Le isole di cartilagine formate dopo la rigenerazione non riescono a sopravvivere se non sono integrate con la cartilagine normale circostante. Pertanto, è necessario trapiantare scaffold che favoriscano la crescita e la sopravvivenza delle cellule impiantate e promuovano anche la colonizzazione delle cellule native. La progettazione dello scaffold per la riparazione della cartilagine deve mirare a normalizzare le proprietà biochimiche (che influenzano il comportamento e l'attività cellulare) e fisiche (architettura dello scaffold, funzione meccanica e degradabilità).

Gli scaffold possono essere formati da biomateriali naturali, che derivano da proteine (collagene, fibroina di seta, gelatina), polisaccaridi (chitosano, acido ialuronico (HA), alginati, materiali a base di amido, cellulosa, destrani, agarosio) e poliesteri di origine microbica (poliidrossialcanoati (PHA), poli-idrossibutirati (PHB)) [12].

Gli scaffold naturali mostrano molteplici bioattività, perché molti di essi sono costituenti del corpo o della matrice extracellulare. Forniscono una superficie naturale e pro-adesiva e trasportano le informazioni necessarie per l'attività cellulare (crescita e maturazione cellulare). Essi sono anche biocompatibili e biodegradabili, ma il riassorbimento prematuro può causare la perdita di forma e dimensioni dei biomateriali impiantati o coltivati. Inoltre, gli scaffold naturali sotto forma di idrogel hanno scarse proprietà biomeccaniche che rendono molto difficile la loro resistenza alla compressione dell'articolazione. Le matrici a base di collagene e ialuronato sono gli scaffold naturali più popolari perché sono i normali costituenti della cartilagine articolare [50].

Gli scaffold sintetici sono modificati chimicamente per una migliore versatilità e biodegradabilità controllabile; mancano, però, di una cito-compatibilità ottimale e possono anche suscitare una risposta dell'ospite al rilascio di sottoprodotti tossici. La tendenza attuale nell'ingegneria tissutale è quella di combinare biomateriali naturali e sintetici per sfruttare i vantaggi di ciascuno, poiché la composizione, l'architettura (dimensione dei pori, porosità e forma) e le proprietà meccaniche influenzano la condrogenesi, il comportamento e il destino

delle cellule [46]. Ciò ha portato allo sviluppo di scaffold ibridi che utilizzano lo scheletro polimerico (che fornisce la resistenza meccanica) e l'idrogel (che supporta il rilascio di cellule) che assomiglia alla natura bifasica della cartilagine. È stato riscontrato che l'idrogel trattiene le cellule nella fase tridimensionale in un ambiente favorevole e la loro distribuzione omogenea nei pori dell'impalcatura solida.

Sono stati sviluppati anche altri tipi di scaffold di ingegneria tissutale, ovvero scaffold zonali biomimetici e scaffold nanofibrosi/nanoporosi, per superare gli svantaggi associati agli scaffold convenzionali, ovvero la compatibilità e le proprietà funzionali. Gli scaffold zonali comprendono diverse zone/strati distinti, con o senza cellule, che assomigliano alla cartilagine naturale. Questo sistema zonale imita le proprietà fisiche della cartilagine articolare nativa e le cellule, se impiantate, secernono ECM che assomiglia ai diversi strati della cartilagine [53]. La tecnologia dell'impalcatura zonale biomimetica, sebbene promettente, è ancora agli inizi e sono necessari ulteriori studi sulla sua progettazione e sulla tecnologia di fabbricazione. Gli scaffold non fibrosi/nanoporosi, grazie alle loro dimensioni nanometriche, imitano le proprietà biologiche e fisico-chimiche della ECM nativa e, pertanto, svolgono un ruolo chiave nella crescita delle cellule staminali e/o dei condrociti e nella rigenerazione dei tessuti. Nella fase preclinica, le cellule sono incapsulate in scaffold nanofibrosi fabbricati mediante elettrofilatura (Figura 4.7). Tuttavia, il problema principale che si presenta è quello dell'omogeneità cellulare, in quanto le cellule si raggruppano in questo tipo di fabbricazione.

Uno studio [50] ha dimostrato che gli scaffold stampati in 3D con strutture micro/nanoporose possono promuovere il differenziamento condrogenico delle MSC derivate dal midollo osseo meglio degli scaffold con strutture non porose. È stato riportato che gli scaffold a pori piccoli (dimensioni dei pori di 125-250 μm) avevano maggiori probabilità di migliorare la differenziazione condrogenica e di inibire l'ossificazione endocondrale delle cellule rispetto agli scaffold a pori grandi (dimensioni dei pori di 425-600 μm).

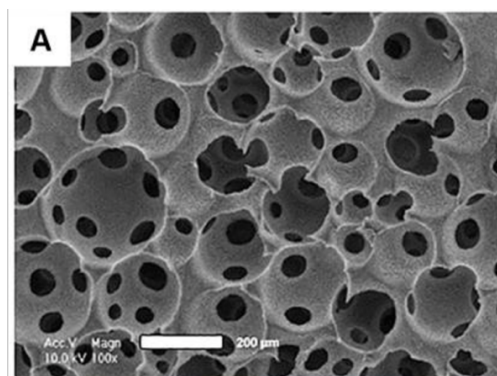


Figura 4.7: Micrografie SEM di scaffold nanofibrosi in PLLA con strutture macroporose.

Capitolo 5. Studi clinici sulla rigenerazione della cartilagine

Le cellule progenitrici mesenchimali (MPC) o le MSC, solitamente derivate dal sangue del cordone ombelicale, dal tessuto adiposo o dal midollo osseo, sono considerate come potenziali opzioni terapeutiche per le lesioni della cartilagine.

Uno studio [54] ha valutato l'efficacia di MPC autologhe espanse in vitro derivate dal tessuto adiposo come trattamento per l'OA. Le MPC sono state scelte per la facilità e la ripetibilità di accesso al tessuto adiposo sottocutaneo, la semplicità della procedura di isolamento e l'elevata produzione. Sono stati selezionati pazienti di età compresa tra i 18 e i 70 anni, con una diagnosi certa di OA del ginocchio, accompagnata da dolore all'articolazione e con un grado inferiore a 4 secondo i criteri di Kellgren-Lawrence. I criteri di esclusione prevedevano:

1. infezione grave concomitante, tumore maligno, disturbo della coagulazione o malattie sistematiche incontrollate o ingestibili;
2. presenza di altri tipi di artrite tranne l'OA;
3. iniezione intra-articolare di acido ialuronico (HA) nei due mesi precedenti;
4. donne in gravidanza o in allattamento.

Trattandosi di uno studio in doppio cieco i pazienti arruolati (Tabella 5.1) sono stati divisi, casualmente, in due gruppi: uno per l'iniezione intra-articolare di cellule staminali, l'altro per l'iniezione di solo HA (Figura 5.1). Al fine di mantenere il doppio cieco, la preparazione per l'iniezione e la stessa sono state eseguite in due camere differenti da un professionista diverso dal valutatore. Nel gruppo HA l'iniezione è stata somministrata una volta alla settimana, per quattro settimane consecutive. Al gruppo MPC sono state somministrate 5×10^7 cellule alla prima e terza settimana, nelle due restanti sono state eseguite finte iniezioni (per mantenere il doppio cieco). Le valutazioni sono state eseguite prima e una settimana dopo il trattamento e alle visite di controllo dopo 6 e 12 mesi.

	MPC		HA	
Numero di pazienti	26		26	
Uomini	3		3	
Donne	23		23	
Età media	55.03		59.64	
Grado di Kellgren-Lawrance	Right Knee	Left Knee	Right Knee	Left Knee
Grado 0	0	0	0	0
Grado 1	1	1	2	2
Grado 2	9	9	8	8
Grado 3	16	16	16	16

Tabella 5.2: Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti arruolati nello studio [1].

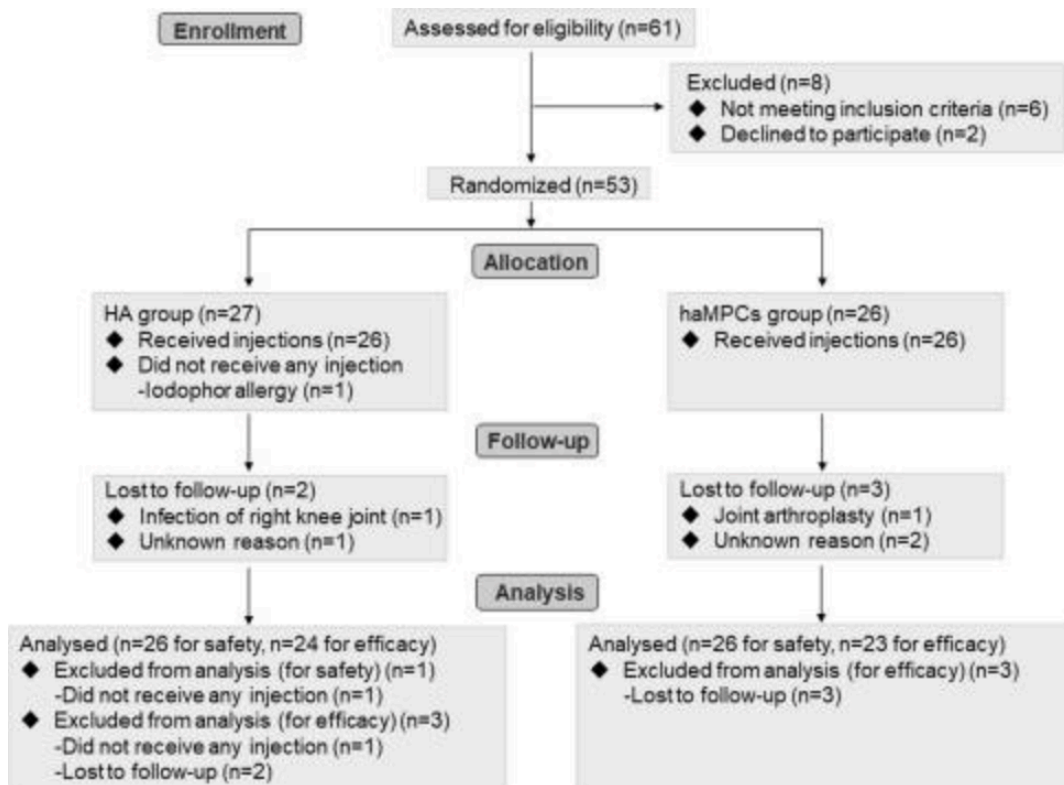


Figura 5.1: Diagramma di flusso dello studio clinico [54].

L'analisi degli esiti della terapia è stata fatta attraverso la valutazione del punteggio Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC); altri parametri valutati sono stati la risonanza magnetica alle ginocchia e la scala analogica visiva (VAS, rappresentata da una semiretta dove un'estremità, 0 cm, rappresenta assenza di dolore, mentre l'altra, 10 cm, rappresenta uno stato di dolore massimo).

Risultati clinici

In entrambi i gruppi è stata osservata una riduzione significativa del punteggio WOMAC nelle visite di controllo, mentre la variazione dello stesso è stata simile tra i due gruppi. Il punteggio WOMAC medio, dopo sei mesi dall'iniezione, si è ridotto da $30,83 \pm 19,14$ a $21,70 \pm 17,87$ nel gruppo MPC e da $34,17 \pm 17,16$ a $27,58 \pm 16,93$ nel gruppo HA. Dopo 12 mesi, si è passati, rispettivamente, a $21,35 \pm 18,19$ e a $27,25 \pm 16,33$, mostrando così un ulteriore miglioramento (Figura 5.2).

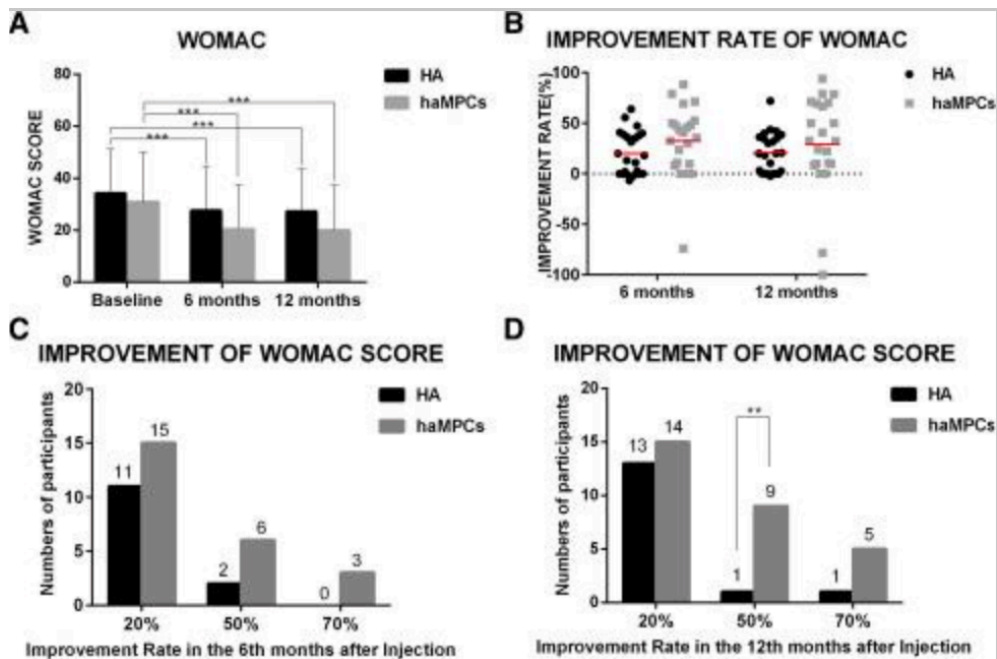


Figura 5.2: Variazioni del punteggio WOMAC 12 mesi dopo l'iniezione intra-articolare di MPCs e HA [54].

Entrambi i gruppi sono stati associati a una riduzione del punteggio VAS durante il follow-up. Un miglioramento significativo è stato osservato nei pazienti a cui sono state somministrate le cellule staminali, che dopo 6 mesi hanno ottenuto un punteggio di $2,85 \pm 2,65$ (mentre l'altro gruppo ha ottenuto $4,17 \pm 2,55$). Risultati molto simili sono stati ottenuti anche per la visita di controllo dopo 12 mesi (Figura 5.3).

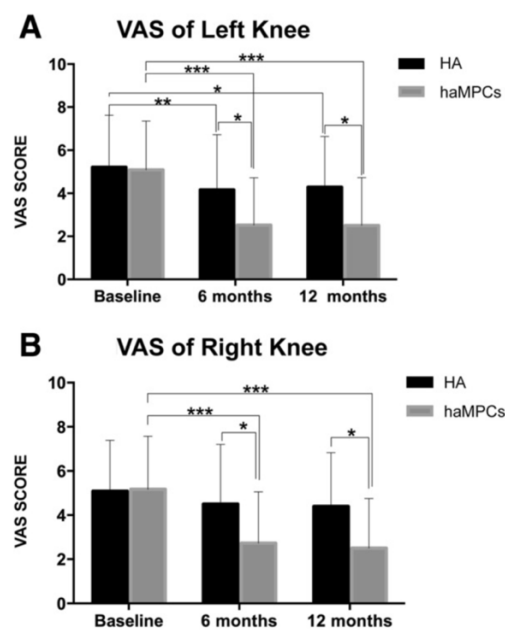


Figura 5.3: Variazione del punteggio VAS nei 12 mesi successivi all'iniezione intra-articolare di MPCs e HA [54].

Dopo la terapia con le MPCs derivanti dal tessuto adiposo, è stato possibile osservare un aumento del volume della cartilagine articolare di entrambe le ginocchia mediante risonanza magnetica. Al contrario, per il gruppo HA, è stata osservata una tendenza alla progressiva diminuzione del volume della cartilagine (Tabella 5.2 e Figura 5.4).

	MPCs		HA	
	Left knee (mm ³)	Right knee (mm ³)	Left knee (mm ³)	Right knee (mm ³)
Dopo 6 mesi	17,25 ± 394,23	77,81 ± 155,37	-10,15 ± 201,59	-54,00 ± 227,21
Dopo 12 mesi	193,36 ± 282,80	108,70 ± 220,13	-101,88 ± 224,30	-23,47 ± 291,37

Tabella 5.2: Variazione del volume della cartilagine dopo l'iniezione intra-articolare di MPCs e HA [54].

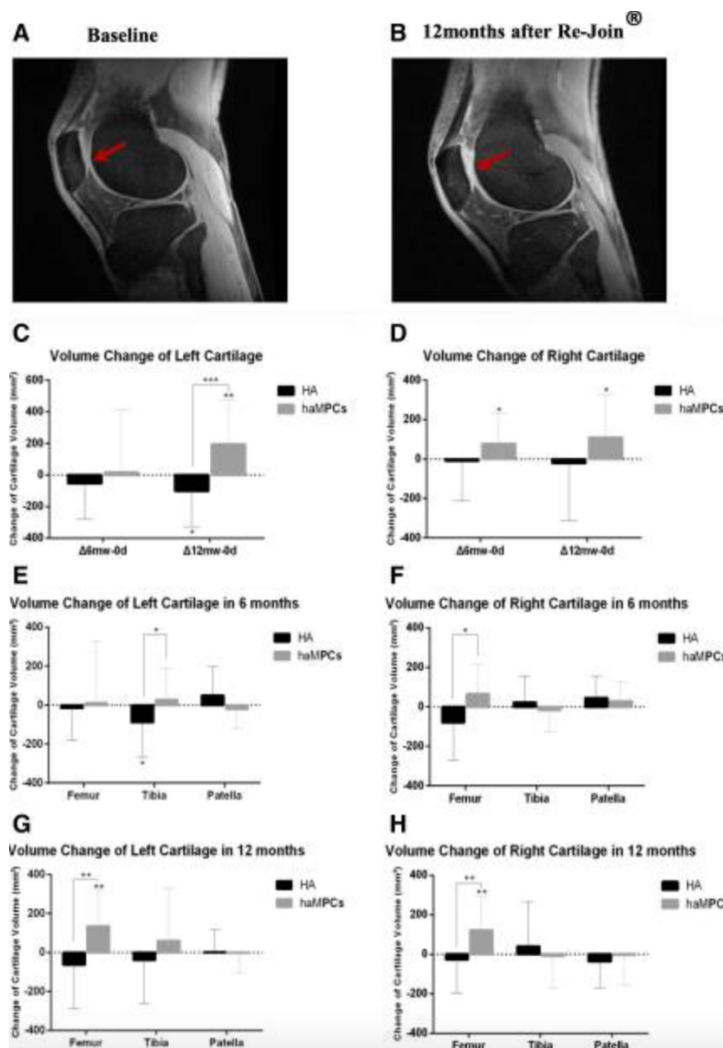


Figura 5.4: (A, B) Immagini di risonanza magnetica dell'articolazione del ginocchio prima e dopo il trattamento con MPCs. (C, D) Variazioni del volume della cartilagine del ginocchio sinistro e destro mediante risonanza magnetica nei gruppi MPC e HA dopo 6 e 12 mesi. Variazioni del volume della cartilagine del ginocchio sinistro e destro nei diversi compartimenti anatomici dopo 6 (E, F) e 12 mesi (G, H) dall'iniezione [54].

L'iniezione di MPCs è risultata superiore all'HA in termini di sollievo dal dolore e di miglioramento della qualità di vita, come dimostrato dalla VAS. Entrambi i gruppi hanno mostrato una riduzione significativa del punteggio WOMAC dopo un follow-up di dodici mesi,

con una tendenza a un tasso di miglioramento maggiore nel gruppo MPCs, sebbene la differenza non fosse statisticamente significativa.

È stato interessante scoprire che le iniezioni intra-articolari di MPCs hanno avuto un effetto sull'aumento del volume della cartilagine, con un incremento evidente dodici mesi dopo l'iniezione. Invece nel gruppo HA si è osservata una diminuzione del volume della cartilagine come nel corso naturale della progressione dell'OA.

È opportuno precisare che lo studio presenta alcune limitazioni. In primo luogo, la dimensione del campione di pazienti è relativamente piccola. In secondo luogo, i pazienti arruolati erano tutti di grado inferiore a 4 secondo la classificazione di Kellgren-Lawrence. Non è noto se il trattamento a base di MPC possa essere efficace in pazienti con OA più grave e ciò necessita di ulteriori studi. Sebbene la rigenerazione della cartilagine articolare sia stata chiaramente identificata con la risonanza magnetica, la durata dell'effetto terapeutico delle MPCs è ancora sconosciuta. Per valutarne ulteriormente l'efficacia e il profilo di sicurezza nei pazienti affetti da OA, sono necessari ulteriori studi.

Anche le MSC derivate dal sangue del cordone ombelicale (hUCB-MSCs) sono state utilizzate come possibile terapia per la rigenerazione della cartilagine, in quanto possono essere isolate in modo non invasivo, sono ipoimmunogeniche e hanno dimostrato un'elevata capacità di espansione. Infatti, in un trial clinico di fase II in aperto [55] si è valutata l'efficacia e la sicurezza delle hUCB-MSCs come terapia per la rigenerazione della cartilagine articolare umana, con un periodo di follow-up a lungo termine. I pazienti con diagnosi di OA dell'articolazione del ginocchio con grado Kellgren-Lawrence 3 e difetti cartilaginei dolorosi a tutto spessore, che non rispondevano più al trattamento palliativo, erano idonei a partecipare.

Altri criteri di inclusione erano:

1. difetto cartilagineo di dimensioni superiori a 2 cm²;
2. gonfiore e limitazione dell'ampiezza di movimento;
3. adeguata attività di coagulazione del sangue, adeguata funzionalità renale ed epatica;
4. punteggio della scala analogica visiva (VAS) per il dolore compreso tra 40 e 60 mm durante lo screening.

I partecipanti sono stati esclusi in base ai seguenti criteri: malattie autoimmuni o infiammatorie dell'articolazione; instabilità legamentosa; anamnesi di infezione; intervento chirurgico o radioterapia all'articolazione del ginocchio nelle ultime 6 settimane; uso di immunosoppressori nelle ultime 6 settimane e gravidanza o allattamento in corso.

Sono stati studiati due gruppi per garantire la sicurezza dei partecipanti e per determinare la dose massima tollerata (MTD) in base alla tossicità dose-limitante (DLT) del medicinale in studio (un composto di hUCB-MSC allogene e HA idrogel). I primi quattro partecipanti sono stati assegnati a ricevere MSC a basso dosaggio (gruppo A), mentre i successivi tre sono stati assegnati a ricevere MSC ad alto dosaggio (gruppo B) (Tabella 5.3).

La DLT è stata definita come qualsiasi caso con due o più delle seguenti reazioni avverse gravi dopo il trapianto: gonfiore, limitata gamma di movimento e dolore dell'articolazione del ginocchio.

Gruppo	Età	Sesso	K-L grade	Defect Size (cm ²)	No. of cells	Follow-up
A	68	F	3	5.0	1.25x10 ⁷	1
A	66	M	3	4.8	1.20x10 ⁷	7
A	58	F	3	5.0	1.25x10 ⁷	7
A	29	F	3	4.6	1.15x10 ⁷	7
B	62	F	3	6.6	1.65x10 ⁷	7
B	51	M	3	8.1	2.00x10 ⁷	7
B	77	F	3	7.1	1.80x10 ⁷	7

Tabella 5.3: Caratteristiche di base e di trattamento dei partecipanti allo studio [55].

Durante il periodo di follow-up esteso a 7 anni, sono state eseguite valutazioni di sicurezza, valutazione del punteggio VAS per il dolore e del punteggio IKDC¹, artroscopia, risonanza magnetica per immagini (RM) e valutazioni istologiche. I parametri di sicurezza, il punteggio VAS per il dolore e il punteggio IKDC sono stati valutati alle visite di follow-up a 1, 3 e 7 anni. Dopo un anno, è stata eseguita un'artroscopia e una valutazione istologica. A 3 anni dal trapianto è stata eseguita una risonanza magnetica con iniezione di gadolinio (dGEMRIC) per valutare la qualità della cartilagine rigenerata. La dGEMRIC misura il tempo di rilassamento T1² della cartilagine e prevede la somministrazione endovenosa di un agente di contrasto (Gd-DTPA2-). La sua distribuzione è inversamente proporzionale al contenuto di glicosamminoglicani del tessuto di interesse. La cartilagine sana, che abbonda di GAG, mostrerà una bassa concentrazione dell'agente di contrasto, mentre una cartilagine degradata e impoverita di GAG ne mostrerà un'alta concentrazione. I tempi di rilassamento T1 sono inversamente proporzionali alla concentrazione di Gd-DTPA2-.

¹ L'International Knee Documentation Committee Subjective Knee è stato progettato per valutare i pazienti con una serie di disturbi del ginocchio, tra cui lesioni legamentose e osteoartrite; il punteggio va da 0, livello minimo di funzionalità o livello massimo di dolore, a 100, livello minimo di dolore o livello massimo di funzionalità.

² In risonanza magnetica, il tempo di rilassamento T1 è il tempo necessario ad ogni tessuto per ritornare allo stato di equilibrio dopo l'eccitamento a radiofrequenza, attraverso il procedimento di rilassamento longitudinale.

Risultati clinici

Il punteggio VAS per il dolore è migliorato da 49.1 a 19.3 a 24 settimane dall'iniezione, anche il punteggio IKDC è migliorato da 39.1 a 63.2 in tutti e sette i partecipanti. Questi punteggi sono stati mantenuti senza peggioramenti significativi fino all'ultimo follow-up di 7 anni (Figura 5.5).

Cinque partecipanti hanno acconsentito alla valutazione con risonanza magnetica a 3 anni e le immagini ottenute mostrano un elevato contenuto di GAG nella cartilagine rigenerata (Figure 5.6 e 5.7).

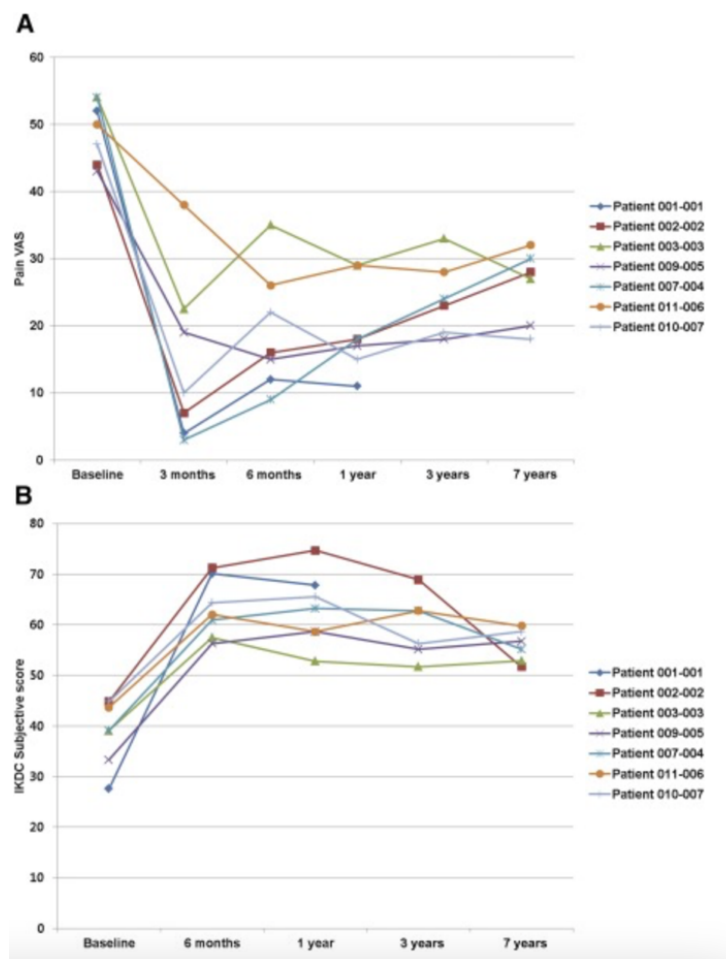


Figura 5.5: Variazioni del punteggio VAS per il dolore (A) e dei punteggi soggettivi IKDC del ginocchio (B) nel periodo di follow-up di 7 anni [55].

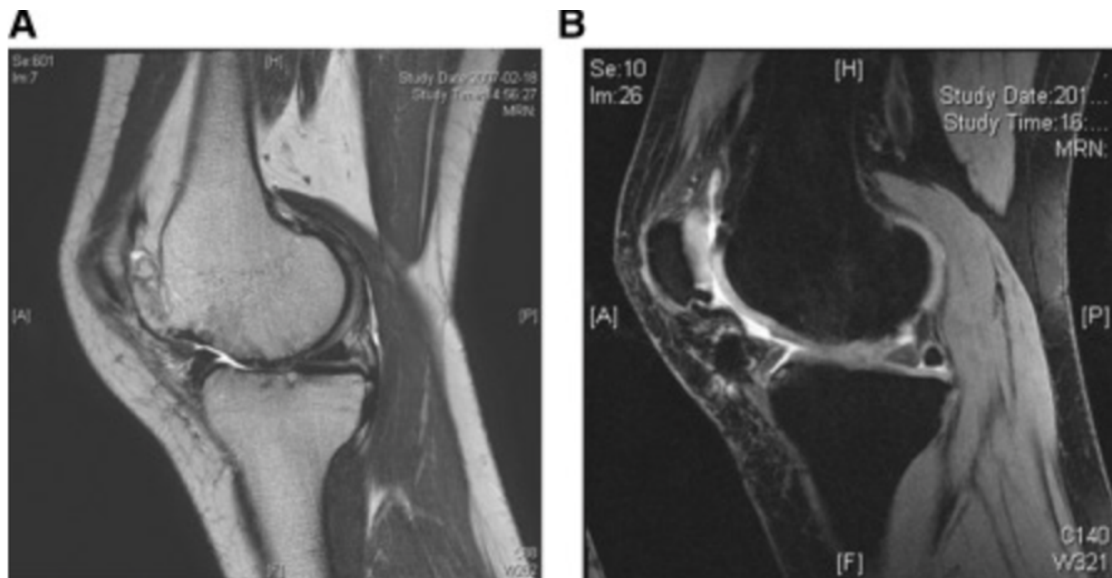


Figura 5.6: Valutazione della risonanza magnetica della rigenerazione della cartilagine 3 anni dopo l'iniezione di hUCB-MSC. (A) Un difetto cartilagineo è stato rilevato al condilo femorale mediale da una MRI preoperatoria. (B) La rigenerazione della cartilagine nel sito del difetto è stata osservata a 3 anni dal trapianto [55].

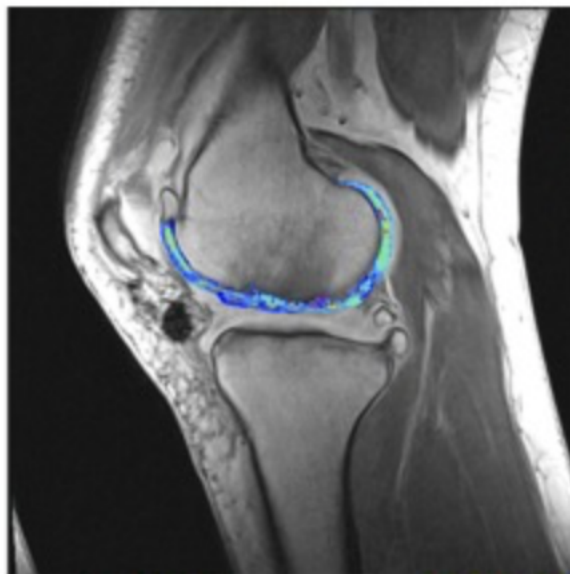


Figura 5.7: Un elevato contenuto di glicosamminoglicani (GAG) è stato osservato nella cartilagine rigenerata mediante risonanza magnetica con iniezione di gadolinio. Valori T1 più elevati (blu) sono associati a un aumento del contenuto relativo di GAG [55].

I risultati di questo studio suggeriscono che il trattamento a base di cellule staminali determina una rigenerazione della cartilagine di buona qualità nell'osteoartrite. La valutazione istologica a un anno ha rivelato che il tessuto era simile alla cartilagine ialina nativa.

Un altro risultato degno di nota, in questo studio, riguarda il miglioramento del dolore e della funzione, che a 24 settimane dal trapianto non si sono deteriorati in modo significativo per 7 anni.

Dopo tre anni, la risonanza magnetica indica che il difetto è stato ripristinato con tessuto cartilagineo ialino-simile e questi risultati suggeriscono che il composito hUCB-MSC-HA può essere un prodotto terapeutico a base di cellule staminali per il trattamento di difetti cartilaginei causati da OA.

Occorre considerare le limitazioni di questo studio. In primo luogo, una ridotta popolazione in studio, un limite intrinseco di questo tipo di studi clinici, poiché il rapporto rischio/beneficio nell'uomo non è ancora ben chiaro. Inoltre, i pazienti avevano tutti un'OA di grado III nella scala di Kellgren-Lawrance; pertanto, non è ancora conosciuta l'efficacia di questa terapia per danni cartilaginei più gravi.

Oltre a trattare l'OA, le cellule staminali sono state usate anche come possibile cura per altre patologie, come l'osteocondrite dissecante (OCD). Uno studio [56] ha riportato che un uomo di 26 anni con dolore crescente al ginocchio e debilitazione funzionale, a cui è stata diagnosticata un'OCD all'età di 13 anni, si è sottoposto a un'iniezione di cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo. La radiografia ha confermato un'alterazione degenerativa precoce con osteofiti coerenti con il grado II di Kellgren-Lawrence. Inoltre, la risonanza magnetica ha mostrato una marcata anomalia sulla porzione portante del condilo femorale mediale di 2,3 cm × 1,5 cm. Il paziente ha ricevuto un totale di 118 milioni di MSC sospese in 3 ml di soluzione fisiologica. È stata effettuata una seconda iniezione di 50 milioni di MSC a 6 mesi.

L'analisi prospettica dell'esito della terapia è stata fatta utilizzando le seguenti misure:

1. il Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS): si tratta di un sistema di punteggio convalidato per la valutazione delle lesioni al ginocchio. Il punteggio è composto da 5 sottoscale ed a ognuna viene fornito un valore normalizzato (100 indica assenza di sintomi e 0 indica sintomi massimi);
2. scala numerica di valutazione del dolore (NPRS): il paziente valuta l'intensità del proprio dolore al ginocchio su una scala da 0 a 10.

I punteggi di outcome sono stati compilati all'inizio, a 1, 3, 6, 12 e 18 mesi dall'inizio della terapia con MSC. Il punteggio numerico del dolore è aumentato a un mese da 4 a 5, riflettendo un'iniziale riacutizzazione autolimitante. Il follow-up a 6 mesi ha tuttavia mostrato un miglioramento del 50% dell'NPRS rispetto all'inizio, che è ulteriormente migliorato del 75% con un punteggio di dolore pari a 1 al termine del follow-up a 18 mesi (Figura 5.8).

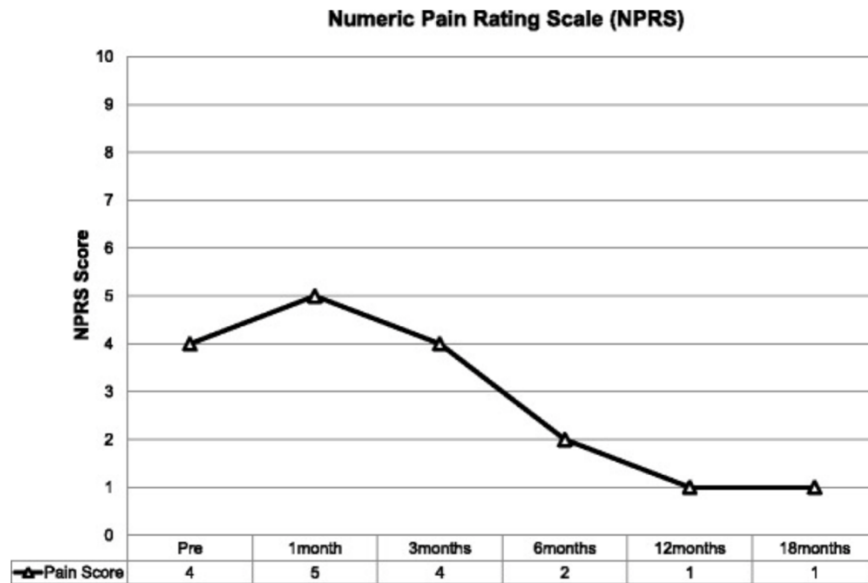


Figura 5.8: Scala numerica di valutazione del dolore (NPRS). Il dolore è inizialmente aumentato a causa di un evento avverso dopo l'iniezione di MSC. In seguito, si è ridotto ed è migliorato fino al completamento del follow-up a 18 mesi [56].

Il punteggio KOOS è migliorato costantemente durante il periodo di follow-up. Dopo 6 mesi, il punteggio dei sintomi del paziente era migliorato del 44% e, analogamente, il punteggio di sport e attività ricreative era migliorato di oltre il 100%, mostrando un miglioramento fino al termine del follow-up a 18 mesi (Figura 5.9).

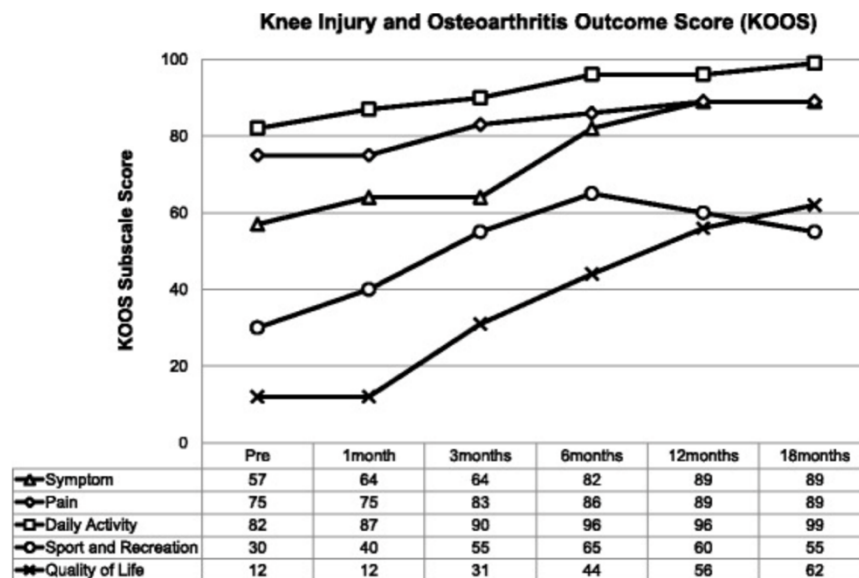


Figura 5.9: Variazione del punteggio KOOS durante il follow-up di 18 mesi [56].

Il follow-up strutturale mediante risonanza magnetica a 6 e a 18 mesi ha mostrato un aumento significativo del tessuto che ricopre il condilo femorale mediale. L'integrazione con la cartilagine nativa circostante alla periferia dell'OCD è avvenuta senza problemi.

La mappatura T2 a 6 mesi ha restituito valori elevati nel sito della cartilagine rigenerativa, coerenti con un elevato contenuto di acqua e una cartilagine immatura. Ulteriori analisi a 18 mesi, tuttavia, hanno indicato un miglioramento dei valori di T2, suggestivo di una progressiva maturazione del tessuto rigenerativo (Figura 5.10).

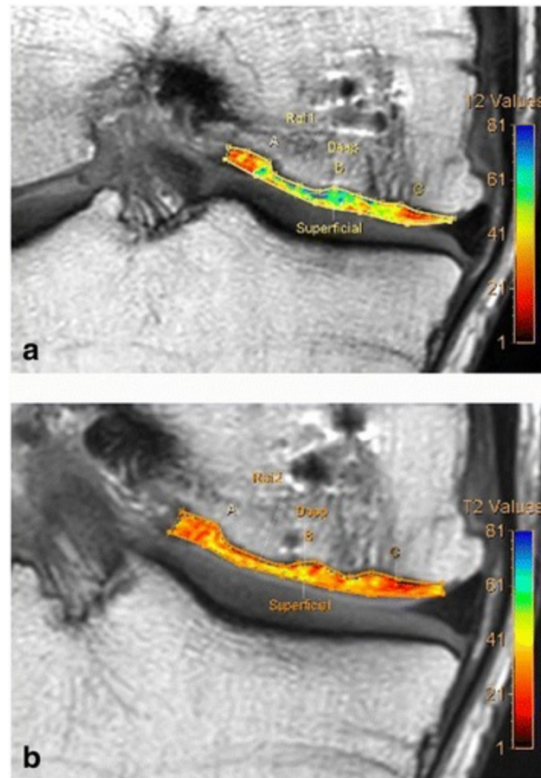


Figura 5.10: Mappatura T2 della risonanza magnetica post-trattamento. (a) Mappatura T2 a 6 mesi: valori elevati all'interno della cartilagine rigenerata indicano una morfologia fibrocartilaginea. (b) Mappatura T2 a 18 mesi: i valori migliorati sia negli strati profondi che in quelli superficiali indicano una cartilagine ialina [56].

Questo caso clinico prova le potenzialità della terapia con cellule staminali mesenchimali nel trattamento delle patologie articolari, comprese le lesioni condrali isolate e l'osteoartrite. Il follow-up basato su un questionario quantitativo ha indicato un miglioramento costante del dolore e della funzione fino al completamento della raccolta dei dati dopo 18 mesi. L'osservazione più sorprendente è stata il miglioramento della qualità della vita (KOOS) di un fattore superiore al 400% rispetto al valore di base pretrattamento. Questo dato da solo evidenzia l'importanza delle tecniche rigenerative emergenti.

Il follow-up con risonanza magnetica di routine ha evidenziato un sensibile miglioramento del volume della cartilagine e dell'architettura osteocondrale nel sito della lesione. La mappatura T2 della risonanza magnetica a 6 mesi indica che l'area di rigenerazione della cartilagine presenta un elevato contenuto di acqua, indicativo di una cartilagine immatura o di una

morfologia fibrocartilaginea. La successiva mappatura T2 a 18 mesi indica una progressiva maturazione della cartilagine dagli strati profondi a quelli superficiali con una morfologia più simile alla cartilagine ialina.

Conclusioni

Le lesioni cartilaginee, dovute a malattie degenerative o a traumi, rappresentano un problema attuale per un numero consistente di persone e per questo sono state proposte diverse tecniche riparative al fine di ripristinare le normali funzioni delle articolazioni coinvolte.

Le tecniche proposte ed applicate prima dell'avvento dell'ingegneria tissutale hanno permesso una riduzione del dolore per il paziente, formando un tessuto cartilagineo simile alla fibrocartilagine, che possiede però proprietà meccaniche inferiori e che porta, con il passare del tempo, ad una successiva degradazione. Per ottenere migliori risultati a lungo termine è stata proposta l'applicazione dell'ingegneria tissutale che sembra possedere alcune caratteristiche assai promettenti per la rigenerazione della cartilagine.

I risultati riportati da studi clinici confermano che l'iniezione di cellule staminali combinate con scaffold (come idrogel di HA) ha portato un miglioramento della qualità di vita nei pazienti, con riduzione del dolore e rigenerazione del tessuto cartilagineo.

Grazie alle valutazioni attraverso l'uso della risonanza magnetica, si è potuto confermare che il tessuto rigenerato, dopo un periodo di maturazione, presenta una conformazione ialino-simile. Purtroppo, gli studi clinici sono ancora troppo pochi per poter affermare la sicura efficacia di questi metodi e sono necessari ulteriori test con un numero di pazienti maggiore e con un follow-up a lungo termine.

L'ingegneria tissutale è quindi una valida alternativa alle procedure tradizionali, quali ad esempio la microfrattura o la mosaicoplastica, ma ulteriori studi sono necessari per validarne l'applicazione clinica, cercando di limitare il più possibile il tempo necessario per la coltura cellulare e per la maturazione del tessuto rigenerato.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Andrea Bagno per avermi dedicato il suo tempo e la sua presenza in quest'attività di tesi.

Ringrazio i miei genitori, Marta e Marco, perché mi hanno sempre accompagnato in ogni decisione e hanno sempre saputo dirmi le cose giuste al momento giusto.

Ringrazio mia sorella, Valentina, perché sempre pronta ad aiutarmi, a darmi consigli e senza di lei sarebbe tutto più triste.

Ringrazio zii, nonni e cugini per avermi supportato e incoraggiato durante tutto il percorso di studio.

Ringrazio la mia fidanzata, Sara, per essermi sempre stata accanto, per aver festeggiato nei momenti belli e per avermi confortato in quelli più difficili.

Bibliografia

- [1] J. L. Olson, A. Atala, e J. J. Yoo, «Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions», *Chonnam Med. J.*, vol. 47, fasc. 1, p. 1, 2011, doi: 10.4068/cmj.2011.47.1.1.
- [2] F. H. Martini, R. B. Tallitsch, e J. L. Nath, *Human Anatomy*, 7^a ed. EdiSES, 2019.
- [3] Joseph P. Iannotti e R. D. Parker, *Apparato locomotore Volume 2 - Colonna vertebrale e arto inferiore*, 2^a ed. Edra Masson, 2013.
- [4] S. Standring, *Anatomia del Grey*, 41^a ed., vol. 1, 2 voll. Edra Masson, 2017.
- [5] F. P. Kendall e E. K. McCreary, *I muscoli. Funzioni e test con postura e dolore*, 5^a ed. Verduci, 2005.
- [6] P. Rosati, R. Colombo, e N. Maraldi, *Istologia*, 5^a ed. Edi. Ermes, 2006.
- [7] A. Matsiko, T. Levingstone, e F. O'Brien, «Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair», *Materials*, vol. 6, fasc. 2, pp. 637–668, feb. 2013, doi: 10.3390/ma6020637.
- [8] W. Swieszkowski, B. H. S. Tuan, K. J. Kurzydowski, e D. W. Huttmacher, «Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints», *Biomol. Eng.*, vol. 24, fasc. 5, pp. 489–495, nov. 2007, doi: 10.1016/j.bioeng.2007.07.014.
- [9] H. Kwon *et al.*, «Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair», *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 15, fasc. 9, pp. 550–570, set. 2019, doi: 10.1038/s41584-019-0255-1.
- [10] J. N. Katz, K. R. Arant, e R. F. Loeser, «Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review», *JAMA*, vol. 325, fasc. 6, p. 568, feb. 2021, doi: 10.1001/jama.2020.22171.
- [11] P. S. Q. Yeoh *et al.*, «Emergence of Deep Learning in Knee Osteoarthritis Diagnosis», *Comput. Intell. Neurosci.*, vol. 2021, pp. 1–20, nov. 2021, doi: 10.1155/2021/4931437.
- [12] R. D. Altman, «Early management of osteoarthritis», *Am. J. Manag. Care*, vol. 16 Suppl Management, pp. S41-47, mar. 2010.
- [13] M. J. Lespasio, N. S. Piuze, M. E. Husni, G. F. Muschler, A. Guarino, e M. A. Mont, «Knee Osteoarthritis: A Primer», *Perm. J.*, vol. 21, fasc. 4, pp. 16–183, dic. 2017, doi: 10.7812/TPP/16-183.
- [14] B. Heidari, «Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I», *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 2, fasc. 2, pp. 205–212, 2011.
- [15] A. Litwic, M. H. Edwards, E. M. Dennison, e C. Cooper, «Epidemiology and burden of

- osteoarthritis», *Br. Med. Bull.*, vol. 105, fasc. 1, pp. 185–199, mar. 2013, doi: 10.1093/bmb/lds038.
- [16] C. Slemenda, «Quadriceps Weakness and Osteoarthritis of the Knee», *Ann. Intern. Med.*, vol. 127, fasc. 2, p. 97, lug. 1997, doi: 10.7326/0003-4819-127-2-199707150-00001.
- [17] K. D. Deane, M. K. Demoruelle, L. B. Kelmenson, K. A. Kuhn, J. M. Norris, e V. M. Holers, «Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis», *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 31, fasc. 1, pp. 3–18, feb. 2017, doi: 10.1016/j.berh.2017.08.003.
- [18] A.-F. Radu e S. G. Bungau, «Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview», *Cells*, vol. 10, fasc. 11, p. 2857, ott. 2021, doi: 10.3390/cells10112857.
- [19] A. Mobasheri, G. Kalamegam, G. Musumeci, e M. E. Batt, «Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions», *Maturitas*, vol. 78, fasc. 3, pp. 188–198, lug. 2014, doi: 10.1016/j.maturitas.2014.04.017.
- [20] C. S. Shin e J. H. Lee, «Arthroscopic Treatment for Osteoarthritic Knee», *Knee Surg. Relat. Res.*, vol. 24, fasc. 4, pp. 187–192, dic. 2012, doi: 10.5792/ksrr.2012.24.4.187.
- [21] M. Z. Mirza, R. D. Swenson, e S. A. Lynch, «Knee cartilage defect: marrow stimulating techniques», *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.*, vol. 8, fasc. 4, pp. 451–456, dic. 2015, doi: 10.1007/s12178-015-9303-x.
- [22] W. D. Stanish *et al.*, «Novel Scaffold-Based BST-CarGel Treatment Results in Superior Cartilage Repair Compared with Microfracture in a Randomized Controlled Trial», *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 95, fasc. 18, pp. 1640–1650, set. 2013, doi: 10.2106/JBJS.L.01345.
- [23] C. L. Camp, M. J. Stuart, e A. J. Krych, «Current Concepts of Articular Cartilage Restoration Techniques in the Knee», *Sports Health Multidiscip. Approach*, vol. 6, fasc. 3, pp. 265–273, mag. 2014, doi: 10.1177/1941738113508917.
- [24] L. Hangody e P. Füles, «AUTOLOGOUS OSTEOCHONDRAL MOSAICPLASTY FOR THE TREATMENT OF FULL-THICKNESS DEFECTS OF WEIGHT-BEARING JOINTS: TEN YEARS OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL EXPERIENCE», *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.*, vol. 85, pp. 25–32, 2003, doi: 10.2106/00004623-200300002-00004.
- [25] E. Inderhaug e E. Solheim, «Osteochondral Autograft Transplant (Mosaicplasty) for Knee Articular Cartilage Defects», *JBJS Essent. Surg. Tech.*, vol. 9, fasc. 4, p. e34, 2019, doi: 10.2106/JBJS.ST.18.00113.
- [26] T. Y. Emre, T. Ege, O. Kose, D. Tekdos Demircioglu, B. Seyhan, e M. Uzun, «Factors affecting the outcome of osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects of the knee joint: retrospective analysis of 152 cases», *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, vol. 133, fasc. 4, pp. 531–536, apr. 2013, doi: 10.1007/s00402-013-1680-2.
- [27] D. B. Haber, C. A. Logan, C. P. Murphy, A. Sanchez, R. F. LaPrade, e M. T. Provencher, «OSTEOCHONDRAL ALLOGRAFT TRANSPLANTATION for the KNEE: POST-OPERATIVE REHABILITATION», *Int. J. Sports Phys. Ther.*, vol. 14, fasc. 3, pp. 487–499, giu. 2019, doi: 10.26603/ijsp20190487.
- [28] H. Mistry *et al.*, «The cost-effectiveness of osteochondral allograft transplantation in the knee», *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, vol. 27, fasc. 6, pp. 1739–1753, giu. 2019, doi:

10.1007/s00167-019-05392-8.

[29] G. Knutsen *et al.*, «Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee: A Randomized Trial», *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 86, fasc. 3, pp. 455–464, mar. 2004, doi: 10.2106/00004623-200403000-00001.

[30] J. A. Grant, «Outcomes Associated with Return to Sports Following Osteochondral Allograft Transplant in the Knee: a Scoping Review», *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.*, vol. 12, fasc. 2, pp. 181–189, giu. 2019, doi: 10.1007/s12178-019-09557-3.

[31] P. Lei, R. Hu, e Y. Hu, «Bone Defects in Revision Total Knee Arthroplasty and Management: Bone Defects in Revision TKA», *Orthop. Surg.*, vol. 11, fasc. 1, pp. 15–24, feb. 2019, doi: 10.1111/os.12425.

[32] S. Johal, N. Nakano, M. Baxter, I. Hujazi, H. Pandit, e V. Khanduja, «Unicompartmental Knee Arthroplasty: The Past, Current Controversies, and Future Perspectives», *J. Knee Surg.*, vol. 31, fasc. 10, pp. 992–998, nov. 2018, doi: 10.1055/s-0038-1625961.

[33] M. J. Chang, H. Lim, N. R. Lee, e Y.-W. Moon, «Diagnosis, Causes and Treatments of Instability Following Total Knee Arthroplasty», *Knee Surg. Relat. Res.*, vol. 26, fasc. 2, pp. 61–67, giu. 2014, doi: 10.5792/ksrr.2014.26.2.61.

[34] F. Canovas e L. Dagneaux, «Quality of life after total knee arthroplasty», *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, vol. 104, fasc. 1, pp. S41–S46, feb. 2018, doi: 10.1016/j.otsr.2017.04.017.

[35] W. Alrawashdeh, J. Eschweiler, F. Migliorini, Y. Mansy, M. Tingart, e B. Rath, «Effectiveness of total knee arthroplasty rehabilitation programmes: A systematic review and meta-analysis», *J. Rehabil. Med.*, vol. 53, fasc. 6, p. jrm00200, 2021, doi: 10.2340/16501977-2827.

[36] P. Khayambashi, J. Iyer, S. Pillai, A. Upadhyay, Y. Zhang, e S. Tran, «Hydrogel Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes for Tissue Engineering», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, fasc. 2, p. 684, gen. 2021, doi: 10.3390/ijms22020684.

[37] B. Żylińska, P. Silmanowicz, A. Sobczyńska-Rak, Ł. Jarosz, e T. Szponder, «Treatment of Articular Cartilage Defects: Focus on Tissue Engineering», *In Vivo*, vol. 32, fasc. 6, pp. 1289–1300, 2018, doi: 10.21873/invivo.11379.

[38] E. Medvedeva *et al.*, «Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, fasc. 8, p. 2366, ago. 2018, doi: 10.3390/ijms19082366.

[39] C. Vinatier e J. Guicheux, «Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments», *Ann. Phys. Rehabil. Med.*, vol. 59, fasc. 3, pp. 139–144, giu. 2016, doi: 10.1016/j.rehab.2016.03.002.

[40] P. Kangari, T. Talaei-Khozani, I. Razeghian-Jahromi, e M. Razmkhah, «Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects», *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 11, fasc. 1, p. 492, dic. 2020, doi: 10.1186/s13287-020-02001-1.

[41] R. M. Schulz e A. Bader, «Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes», *Eur. Biophys. J.*, vol. 36, fasc. 4–5, pp. 539–568, apr. 2007, doi: 10.1007/s00249-007-0139-1.

- [42] L. Fu *et al.*, «The Application of Bioreactors for Cartilage Tissue Engineering: Advances, Limitations, and Future Perspectives», *Stem Cells Int.*, vol. 2021, pp. 1–13, gen. 2021, doi: 10.1155/2021/6621806.
- [43] R. L. Mauck, B. A. Byers, X. Yuan, e R. S. Tuan, «Regulation of Cartilaginous ECM Gene Transcription by Chondrocytes and MSCs in 3D Culture in Response to Dynamic Loading», *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 6, fasc. 1–2, pp. 113–125, gen. 2007, doi: 10.1007/s10237-006-0042-1.
- [44] J. D. Gibson *et al.*, «Regeneration of Articular Cartilage by Human ESC-Derived Mesenchymal Progenitors Treated Sequentially with BMP-2 and Wnt5a», *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, fasc. 1, pp. 40–50, gen. 2017, doi: 10.5966/sctm.2016-0020.
- [45] Y. Xie, X. Liu, S. Wang, M. Wang, e G. Wang, «Proper mechanical stimulation improve the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Improve the viscoelasticity and chondrogenic phenotype», *Biomed. Pharmacother.*, vol. 115, p. 108935, lug. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108935.
- [46] K. Zha *et al.*, «Recent Developed Strategies for Enhancing Chondrogenic Differentiation of MSC: Impact on MSC-Based Therapy for Cartilage Regeneration», *Stem Cells Int.*, vol. 2021, pp. 1–15, mar. 2021, doi: 10.1155/2021/8830834.
- [47] S. Mayer-Wagner *et al.*, «Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells», *Bioelectromagnetics*, vol. 32, fasc. 4, pp. 283–290, mag. 2011, doi: 10.1002/bem.20633.
- [48] D. Parate *et al.*, «Enhancement of mesenchymal stem cell chondrogenesis with short-term low intensity pulsed electromagnetic fields», *Sci. Rep.*, vol. 7, fasc. 1, p. 9421, ago. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09892-w.
- [49] L. Chen, J. Liu, M. Guan, T. Zhou, X. Duan, e Z. Xiang, «Growth Factor and Its Polymer Scaffold-Based Delivery System for Cartilage Tissue Engineering», *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 15, pp. 6097–6111, ago. 2020, doi: 10.2147/IJN.S249829.
- [50] M. Gugjoo, Amarpal, G. Sharma, H. Aithal, e P. Kinjavdekar, «Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds», *Indian J. Med. Res.*, vol. 144, fasc. 3, p. 339, 2016, doi: 10.4103/0971-5916.198724.
- [51] M. B. Gugjoo *et al.*, «Mesenchymal stem cells with IGF-1 and TGF- β 1 in laminin gel for osteochondral defects in rabbits», *Biomed. Pharmacother.*, vol. 93, pp. 1165–1174, set. 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.032.
- [52] S. Sarban, «The positive impact of platelet-derived growth factor on the repair of full-thickness defects of articular cartilage», *Jt. Dis. Relat. Surg.*, vol. 30, fasc. 2, pp. 91–96, ago. 2019, doi: 10.5606/ehc.2019.64018.
- [53] W.-J. Li, Y. J. Jiang, e R. S. Tuan, «Cell–Nanofiber-Based Cartilage Tissue Engineering Using Improved Cell Seeding, Growth Factor, and Bioreactor Technologies», *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, fasc. 5, pp. 639–648, mag. 2008, doi: 10.1089/tea.2007.0136.
- [54] L. Lu *et al.*, «Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: a prospective, randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial», *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, fasc. 1, p. 143, dic. 2019, doi:

10.1186/s13287-019-1248-3.

[55] Y.-B. Park, C.-W. Ha, C.-H. Lee, Y. C. Yoon, e Y.-G. Park, «Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: Results from a Clinical Trial for Safety and Proof-of-Concept with 7 Years of Extended Follow-Up», *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, fasc. 2, pp. 613–621, feb. 2017, doi: 10.5966/sctm.2016-0157.

[56] J. Freitag, K. Shah, J. Wickham, R. Boyd, e A. Tenen, «The effect of autologous adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of a large osteochondral defect of the knee following unsuccessful surgical intervention of osteochondritis dissecans – a case study», *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 18, fasc. 1, p. 298, dic. 2017, doi: 10.1186/s12891-017-1658-2.