



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE
E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, produzione e benessere animale (XXVI CICLO)

La riparazione della cartilagine.

Studio comparativo su modello animale.

Docente Guida

Dott. Gerolamo Masala

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del

Dott. Andrea Pes

ABSTRACT

BACKGROUND: The treatment of cartilage's damage represents a problem of considerable practical interest in human and veterinary medicine. Over the years many surgical techniques have been proposed with the aim of inducing the growth of repairing tissue and limiting degeneration. Indeed, the articular cartilage's lesions do not heal spontaneously or heal only partially in certain conditions.

PURPOSE: Compare the results of different experimental protocols in sheep animal model, in the healing of chondral lesions and ultrastructural regeneration.

METHODS: we have carried out experimental lesions in 45 sheep. The animals were shared into 4 groups, based on for different treatments: group A (embryonic stem cells), group B (microfracture + PRP), group C (microfracture + ACP), group D (Nanoceria).

RESULTS: In group A we did not detect statistically significant differences between treatment groups, although the defects treated with ES showed a trend towards better healing process. In group B and group C treated subjects showed significantly better scores than their controls. For the group D are available only macroscopic data, which reveal an attempt to regenerate cartilage injuries.

DISCUSSION: all treatments we used promote, at various levels, a tissue reparative response that can be hypothesized as a possible clinical application. However, in no one of the controls case at 12 months, was produced hyaline cartilage. Further studies are necessary to verify the results in long term.

INDICE	3
1. INTRODUZIONE	4
2. ANATOMIA DELLA CARTILAGINE	7
3. FISIOPATOLOGIA DELLA CARTILAGINE	18
4. LA RIPARAZIONE CARTILAGINEA	28
5. NANOCERIA	47
6. IL MODELLO ANIMALE	53
7. MATERIALI E METODI	61
8. RISULTATI	80
9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	101
BIBLIOGRAFIA	114

1. INTRODUZIONE.

Il trattamento delle lesioni cartilaginee rappresenta un problema di rilevante interesse pratico e scientifico sia nell'ambito della medicina umana che veterinaria. La cartilagine articolare è un tessuto altamente specializzato, caratterizzato dalla capacità di resistere a sollecitazioni e compressioni, costituito da un'unica popolazione cellulare, i condrociti, che sono in grado di mantenere l'omeostasi tissutale. La quasi totalità del tessuto cartilagineo è invece formata dalla matrice extracellulare costituita da proteoglicani e glicosaminoglicani in grado di trattenere una grande quantità di acqua conferendo elasticità alla struttura, e altre macromolecole, quali il collagene, che consentono legami in grado di mantenere la forma e sopportare sollecitazioni.

Il liquido sinoviale provvede al nutrimento e alla lubrificazione dei capi articolari, essendo la cartilagine un tessuto non vascolarizzato e non innervato.

I numerosi tentativi sperimentali e clinici fatti per indurre la guarigione di lesioni microscopiche e macroscopiche della cartilagine articolare matura hanno sempre avuto lo scopo di ristabilire un tessuto di natura durevole, strutturalmente e funzionalmente competente. Infatti, le lesioni della cartilagine articolare non guariscono spontaneamente o guariscono solo parzialmente in determinate condizioni. Il processo degradativo inizia a carico della cartilagine e avanza poi verso gli strati sottostanti sino a raggiungere lo strato osseo; una volta coinvolto l'osso subcondrale, si può verificare sanguinamento locale con conseguente formazione di un coagulo di sangue che funge da base per la riparazione spontanea.

La riparazione spontanea della cartilagine articolare è quindi associata a difetti che coinvolgono l'osso e il midollo osseo, essendo dipendente dal sanguinamento e dalla formazione di un coagulo. In questo processo sono implicati vari tipi di cellule staminali provenienti dal midollo osseo, dal tessuto adiposo, vascolare, perivascolare, dall'osso stesso e dalla sinoviale.

La composizione biochimica del tessuto riparativo è più simile a quella di un tessuto fibroso che alla cartilagine ialina e la sua competenza meccanica è significativamente inferiore rispetto a questa. Il tessuto riparativo può persistere per alcune settimane o anche mesi, per poi inevitabilmente andare incontro a degenerazione. Il tessuto rigenerato spontaneamente inoltre non si integra perfettamente con la cartilagine nativa, e possono comunemente essere osservati siti di discontinuità. La composizione eterogenea e le proprietà biomeccaniche inferiori della

cartilagine di riparazione contribuiscono senza dubbio alla sua incompetenza funzionale e alla sua facile deperibilità.

Nel corso degli anni sono state proposte numerose tecniche chirurgiche, tutte con risultati contraddittori, con l'obiettivo di indurre la crescita di tessuto riparativo a livello del difetto. I risultati ottenuti più frequentemente portano alla formazione di un tessuto riparativo con proprietà strutturali e biomeccaniche inferiori rispetto alla cartilagine nativa con un rallentamento nello sviluppo del processo artrosico, evento progressivo ineluttabile.

Tra le varie metodiche proposte, gli innesti osteocondrali autologhi e la mosaicoplastica ripristinano il normale tessuto cartilagineo, però queste tecniche trovano indicazione solo per piccoli difetti e la morbilità del sito donatore continua a destare più di una preoccupazione. Anche per tali motivi la ricerca si è rivolta a soluzioni alternative.

I recenti progressi scientifici nel campo dell'ingegneria tissutale hanno permesso significativi passi in avanti verso lo sviluppo di nuovi modelli per la riparazione della cartilagine articolare. In particolare, la ricerca ha dimostrato il potenziale delle proprietà fisico-chimiche dei biomateriali che influenzano in modo significativo la proliferazione, la differenziazione e la deposizione di matrice da cellule progenitrici.

Nonostante i promettenti risultati, sono ancora numerose le difficoltà e le problematiche ancora aperte tra cui citiamo la reazione infiammatoria avversa verso gli innesti che porta ad una riduzione della funzionalità, la scarsa integrazione con i tessuti ospitanti che se non controllata porta inevitabilmente al loro rifiuto.

Per superare questi problemi sono state testate diverse strategie : ad esempio, è stato dimostrato che i costrutti coltivati *in vitro* in uno stato parzialmente o completamente maturato e poi impiantati *in vivo*, sono in grado di sopportare un ambiente catabolico a livello della regione malata meglio di un trapianto fresco o di un trapianto non maturo. Altre strategie includono l'applicazione di molecole in grado di combattere l'infiammazione, quali il desametasone o cross-linkers esogeni.

In alternativa, un approccio *in situ* clinicamente molto interessante per il controllo dell'infiammazione, consiste nell'inserimento negli impianti di sostanze biocompatibili auto-rigenerative in grado di allontanare le sostanze reattive. Tale approccio ha il vantaggio di una guarigione più rapida poichè consente la maturazione *in vivo* degli innesti.

Studi recenti hanno dimostrato come le nanoparticelle di ossido di cerio rivestano potenzialmente tale ruolo in quanto è stato dimostrato *in vitro* che sono in grado di pulire le sostanze reattive dell'ossigeno (ROS) e le sostanze azotate, di combattere l'infiammazione, di abbassare i livelli di citochine e conferire protezione cellulare. L'inibizione delle proteine nitrato è particolarmente significativa dal momento che queste costituiscono una delle cause più importanti del rigetto degli innesti. La nanocerina ha già dimostrato di proteggere diversi tipi cellulari di mammiferi tra cui le cellule nervose, retiniche, epatiche, epiteliali, cardiache, mammarie ed epidermiche.

L'obiettivo della ricerca è quello di confrontare i risultati di differenti protocolli sperimentali *in vivo*, su modello animale ovino, nella guarigione delle lesioni condrali con particolare riferimento alle caratteristiche cliniche, biomeccaniche, istologiche, immuno-istochimiche ed ultrastrutturali del rigenerato e la sua integrazione con i tessuti vicini. Inoltre, si è cominciato a valutare il potenziale di Nanocerina (nanoparticelle di Ossido di Cerio) nel controllo del sistema infiammatorio articolare e l'influenza che questo controllo può avere nel miglioramento delle proprietà biochimiche e meccaniche del tessuto cartilagineo rigenerato spontaneamente.

2. ANATOMIA DELLA CARTILAGINE

2.1. Generalità e cenni di istogenesi della cartilagine.

La cartilagine è una forma specializzata di tessuto connettivo caratterizzata da un'abbondante matrice extracellulare nella quale, racchiusi all'interno di lacune o cavità, si trovano i *condrociti*. Il tessuto cartilagineo appartiene ai tessuti connettivi di sostegno o scheletrici ed è, per questo, dotato di particolari proprietà meccaniche e funzionali tra cui spiccano l'elevata resistenza alla tensione e alla pressione e l'elasticità. La matrice amorfa della cartilagine, diversamente dal comune tessuto connettivo, è solida; il suo contenuto in collagene, quello in proteoglicani e altre proteine, come ad esempio le glicoproteine, è variabile a seconda del tipo di cartilagine.

A differenza del connettivo propriamente detto, la cartilagine non contiene vasi e nervi, e il nutrimento raggiunge i condrociti situati nelle lacune grazie alla permeabilità della matrice extracellulare. Ad eccezione delle superfici articolari, la cartilagine è rivestita da uno strato di tessuto connettivo fibroso compatto ricco di vasi chiamato *pericondrio*, che provvede a conferire maggiore resistenza e a nutrire per diffusione la cartilagine stessa, di per sé non vascolarizzata.

Nella vita fetale, il tessuto cartilagineo forma la quasi totalità dello scheletro e viene successivamente sostituito da tessuto osseo, eccetto che in corrispondenza delle articolazioni e di poche altre regioni. Uno strato cartilagineo, la *fisi*, localizzato al confine tra epifisi e diafisi delle ossa lunghe, permane durante tutto il corso dell'accrescimento corporeo consentendo l'allungamento dell'osso; con la sua scomparsa termina anche lo sviluppo scheletrico dell'organismo; nell'adulto, la cartilagine continua a svolgere un importante ruolo di sostegno, andandosi a localizzare nelle superfici articolari, nella porzione cartilaginea delle coste e fornendo supporto alla parte esterna dell'orecchio, naso, laringe, trachea e bronchi.

La cartilagine si forma nell'embrione quando gruppi di cellule mesenchimali o stromali (cellule staminali adulte pluripotenti del midollo osseo) perdono la loro forma allungata e si trasformano in *condroblasti*, cellule rotondeggianti dotate di elevata attività metabolica appartenenti alla classe dei fibroblasti. I condroblasti si replicano e, nello stesso tempo, iniziano a secernere matrice extracellulare. Grazie al ciclo continuo di produzione e accumulo della matrice, le cellule si distanziano le une dalle altre per interposizione di nuovo materiale; la matrice tende a solidificare progressivamente e, di conseguenza, i condroblasti rimangono imprigionati all'interno di lacune scavate nella sostanza da loro stessi prodotta. I condroblasti si trasformano quindi in *condrociti*,

cellule quiescenti di minore volume. Tuttavia, può accadere che queste cellule vadano incontro a divisione anche quando la matrice è già solida impedendo un ulteriore distanziamento tra le cellule figlie. Ciò spiega la presenza di gruppi di condrociti derivati dalla stessa cellula, i *gruppi isogeni*, accolti nella medesima lacuna cartilaginea nell'individuo adulto. In mancanza di vascolarizzazione, i condrociti isolati nelle lacune, nuclei di accrescimento, scambiano gas e nutrienti necessari a sostenere il loro ridotto metabolismo attraverso la matrice in maniera diretta per diffusione attraverso le fitte maglie fibrose della sostanza stessa. Questo processo di istogenesi della cartilagine è definito *accrescimento interstiziale* (endogeno) ed è integrato da un secondo meccanismo detto *accrescimento per apposizione* (esogeno). Uno strato di tessuto mesenchimale circostante i nuclei di accrescimento interstiziale appena descritti si differenzia nel pericondrio. Questo è formato da fibroblasti immersi in un'abbondante quantità di fibre collagene e da un certo numero di cellule indifferenziate, alcune delle quali si trasformano a loro volta in condroblasti che appongono nuovo tessuto cartilagineo intorno al centro di accrescimento.

2.2. Tipi di cartilagine.

Cartilagine elastica.

Si ritrova principalmente nel padiglione auricolare, nelle pareti del meato acustico esterno, nelle tube di Eustachio, nell'epiglottide e nelle cartilagini cuneiformi della laringe. È caratterizzata dalla presenza di pochi condrociti e da una piccola concentrazione di proteoglicani, ma contiene una trama abbondante di sottili fibre elastiche oltre a fibrille di collagene di tipo II in grado di conferirle una grande flessibilità. La cartilagine elastica possiede un colore giallastro per la presenza dell'elastina nelle fibre elastiche, è circondata dal pericondrio che ne garantisce nutrizione e crescita e risulta meno vulnerabile ai cambiamenti degenerativi rispetto agli altri tipi.

Cartilagine fibrosa.

La cartilagine fibrosa costituisce i dischi intervertebrali, i menischi articolari, le inserzioni tendinee e il tessuto di unione delle ossa in tutte le sinfisi. Contiene condrociti, isolati o in gruppi, disposti in lunghe file separate da fibre collagene, prevalentemente di tipo I, che si dispongono o a formare fasci irregolari interposti fra i gruppi di condrociti o parallelamente alle colonne di cellule. Questo

orientamento dipende dagli stimoli meccanici che agiscono sulla fibrocartilagine, poiché i fasci di collagene assumono una direzione parallela a quella delle forze applicate. È priva di pericondrio.

Cartilagine ialina.

La cartilagine ialina è la più diffusa nell'organismo. A fresco risulta traslucida, di colore bluastrò, con una superficie liscia. Nell'embrione, funge da scheletro temporaneo finché non è sostituita gradualmente dal tessuto osseo. Nei mammiferi adulti la cartilagine ialina è localizzata sulle superfici articolari, nelle pareti del naso, della laringe, della trachea, dei bronchi, nelle terminazioni ventrali delle coste e nelle placche epifisarie dove è responsabile dell'accrescimento longitudinale delle ossa. Fatta eccezione per quelle articolari, tutte le cartilagini ialine sono rivestite dal pericondrio, una lamina di tessuto connettivo fibrillare denso a fasci intrecciati riccamente vascolarizzata.

2.3. La cartilagine articolare.

La cartilagine articolare è uno strato di tessuto connettivo specializzato che ricopre le superfici articolari delle epifisi ossee nelle articolazioni sinoviali. Ha la funzione di trasmettere i carichi tra le ossa contigue, distribuire gli stress all'osso subcondrale durante il carico e di offrire un basso attrito allo scorrimento delle superfici articolari. L'efficiente lubrificazione sulla superficie della cartilagine consente di minimizzare la frizione e l'usura e di far fronte a un'ampia gamma di situazioni di carico.

È costituita da una densa matrice extracellulare in cui sono immersi, in numero percentualmente limitato, i condrociti. La cartilagine matura, a differenza degli altri tessuti, non presenta innervazione, strutture linfatiche e vascolarizzazione; le sue cellule sono nutrite dal liquido sinoviale per diffusione attraverso la matrice extracellulare e tramite la stessa via vengono eliminati i cataboliti.

La funzione biomeccanica della cartilagine in diverse condizioni di carico dipende dalla sua composizione molecolare, dall'organizzazione strutturale e dall'integrità della matrice extracellulare. La presenza e la disposizione delle fibre collagene di tipo II conferiscono la capacità di resistenza alla trazione, mentre la presenza di grandi aggregati di proteoglicani e acido ialuronico conferiscono le caratteristiche di elasticità e resistenza alla compressione. Queste

macromolecole inoltre, svolgono un ruolo nell'interazione della cartilagine con il liquido sinoviale e, insieme ad altre molecole proteoglicaniche a basso peso molecolare e a molecole glicoproteiche, nei processi di calcificazione della cartilagine.

2.4. Composizione chimica.

La cartilagine articolare è composta da due fasi, una solida e una liquida. Generalmente il 65-80% del peso totale è costituito dalla parte liquida che contribuisce alle sue proprietà caratteristiche mentre il restante 20-35% è costituito dalla parte solida. Tale tessuto possiede la più bassa densità volumetrica cellulare rispetto ad ogni altro tessuto nel corpo: i condrociti, l'unica componente cellulare presente, costituiscono l'1% del volume totale del tessuto mentre il rimanente 99% è costituito da una complessa matrice extracellulare.

Il 65-80% del peso umido della cartilagine articolare è costituito da acqua, con differenze a seconda della zona considerata: con percentuali maggiori nelle zone più profonde del tessuto rispetto a quelle più superficiali. L'acqua ha una grande importanza dal punto di vista funzionale e biomeccanico: consente la deformazione della cartilagine quando questa è sottoposta a carichi, lubrifica le superfici di scorrimento creando un basso attrito e fornisce nutrimento agli elementi cellulari. Nelle articolazioni colpite da osteoartrosi (OA) il contenuto di acqua si innalza notevolmente, raggiungendo il 90% circa del peso umido a causa della disgregazione della matrice e dell'aumento della permeabilità. Questo comporta una diminuzione del modulo di elasticità e di conseguenza una riduzione della capacità di carico.

La matrice extracellulare della cartilagine articolare è costituita da acqua, elettroliti disciolti e da diverse macromolecole strutturali, sintetizzate dai condrociti, che costituiscono dal 15% al 40% del peso secco della cartilagine. Il collagene di tipo II costituisce da solo il 50% del peso secco del tessuto, i proteoglicani circa il 30-35%, mentre le proteine non collagene e le glicoproteine il 15-20%. L'organizzazione delle molecole strutturali mantiene il movimento dei fluidi attraverso la matrice stessa: questo è essenziale sia per le proprietà meccaniche del tessuto, sia perché fornisce ai condrociti nutrienti e metaboliti. La matrice e la sua interazione con il liquido interstiziale giocano quindi un ruolo fondamentale nella biomeccanica della cartilagine.

Il collagene è la macromolecola maggiormente presente nella cartilagine articolare (10-20% del peso secco). Nella matrice cartilaginea sono stati isolati 13 tipi di collagene (i principali sono

rappresentati dal collagene II, V, VI, IX, X e XI) divisi in due grandi gruppi: collagene fibrillari (II, V, XI) e collagene non fibrillari (VI, IX, e X). Il collagene di tipo II è la principale forma nella cartilagine ialina e costituisce una rete fibrillare tridimensionale di aggregati molecolari a forma di funi intrecciate. È costituito da tre catene polipeptidiche $\alpha 1$ avvolte a spirale. Ogni catena α è costituita da circa 1000 amminoacidi disposti secondo la formula x-y-Gly. Il terzo amminoacido è rappresentato dalla glicina, mentre x e y sono per la maggior parte prolina e idrossiprolina, amminoacidi ciclici che conferiscono rigidità alla catena, limitandone la rotazione. Un altro amminoacido, di notevole importanza funzionale, è l'idrossilisina che concorre a promuovere la formazione di legami tra collagene e proteoglicani. Idrossilisina e idrossiprolina sono amminoacidi tipici del collagene, per cui la loro escrezione può rappresentare un utile indice del turnover cartilagineo. Il collagene tipo II interagisce con altri tipi di collagene, quantitativamente meno rappresentati (IX, X, XI), che hanno funzioni di regolazione nei meccanismi di calcificazione e nelle interazioni tra macromolecole.

Il collagene di tipo IX si trova prevalentemente a livello dell'intersezione tra le fibrille, risultando una molecola di raccordo di notevole importanza nel determinare le proprietà biomeccaniche della cartilagine articolare.

Il collagene di tipo X, sintetizzato solo dai condrociti ipertrofici, si ritrova soprattutto a livello della cartilagine calcificata; quello di tipo XI è presente all'interno delle fibrille di tipo II e probabilmente ne regola lo spessore, mentre quello di tipo VI è ampiamente distribuito nella rete pericondrocitaria. L'organizzazione molecolare della rete collagene, le cui fibre sono disposte con diverso orientamento spaziale a seconda delle linee di forza delle sollecitazioni meccaniche, conferisce al tessuto resistenza alle forze di trazione e di taglio e consente l'ancoraggio della cartilagine all'osso.

Il turnover del collagene è molto lento ed è modulato dall'attività di collagenasi specifiche secrete dai condrociti. L'attività di queste collagenasi è controllata da enzimi proteolitici che scindono i precursori, e da inibitori specifici delle collagenasi presenti all'interno della matrice.

I proteoglicani sono molecole complesse composte da un asse proteico centrale cui sono legate catene laterali di glicosaminoglicani mediante legami covalenti. Vengono prodotti all'interno dei condrociti e secreti nella matrice e forniscono resistenza alla compressione della cartilagine articolare. Esistono due principali famiglie di proteoglicani: grandi proteoglicani aggregati

(comprendente aggregani e versicani) e piccoli proteoglicani interstiziali (comprendente biglicani, decorina, fibromodulina e lumicani).

Gli aggregani sono formati da una proteina centrale cui si lega covalentemente un numero elevato di catene laterali di glicosaminoglicani, molecole disaccaridiche, principalmente di due tipi: condroitinsolfato e cheratinsolfato. Questa catena è resa stabile per la presenza di legami proteici con acido ialuronico, andando così a formare una struttura complessa. Ci sono due tipi (tipo 4 e tipo 6) di condroitinsolfato. Il tipo 6 persiste in quantità costanti per tutta la vita, mentre il tipo 4 diminuisce con l'età. Nella maggior parte degli aggregani, le catene di cheratinsolfato si ritrovano nelle vicinanze della molecola di acido ialuronico, mentre le catene di condroitinsolfato sono più distanziate da quest'ultima. La distribuzione di questi due glicosaminoglicani varia molto tra gli individui anche a causa di differenze genetiche. La struttura è stabilizzata dalla connessione tra aggregani e acido ialuronico formando complessi macromolecolari di proteoglicani. Un carattere tipico di queste molecole è l'elevato numero di catene di glicosaminoglicani caricate negativamente. Questo comporta il legame di grandi quantità di acqua e di cationi determinando un'elevata pressione osmotica con rigonfiamento del tessuto. L'acqua, che viene ceduta sotto carico e riassunta al termine della compressione, permette alla cartilagine di resistere a deformazioni reversibili. Per tale motivo la capacità della cartilagine articolare di sopportare la forza peso è direttamente proporzionale ai livelli di proteoglicani. L'idratazione dei proteoglicani è tuttavia rigidamente limitata dalla rete tridimensionale di fibrille di collagene nella quale sono immerse tali strutture. È stato dimostrato sperimentalmente che l'esaurimento di aggregano è una caratteristica della cartilagine colpita da artrosi. La cartilagine articolare contiene anche proteoglicani di dimensioni minori come il biglicano, la decorina e la fibromodulina. Studi recenti hanno evidenziato, nelle fasi precoci dell'osteoartrosi, un'abnorme e incontrollata espressione dei proteoglicani minori come tentativo, peraltro inadeguato, di risposta riparativa tissutale.

La cartilagine, inoltre, contiene numerose proteine di matrice tra cui una particolare menzione merita la COMP (proteina oligomerica della matrice cartilaginea) che sembra avere un ruolo fondamentale nella formazione e nella struttura della cartilagine articolare. Durante l'artrosi si è riscontrata una maggiore quantità di questa proteina nel sangue e nel liquido sinoviale (Schulz, R. M. 2007)

La matrice cartilaginea è organizzata in tre diverse zone : pericellulare, territoriale e interterritoriale.

La matrice pericellulare è un sottile strato di matrice (2 mm circa) in stretto contatto con la membrana cellulare. Questa regione è ricca di proteoglicani e proteine non collagene, come la decorina, associate alle membrane cellulari. Contiene inoltre collagene di tipo VI.

La matrice capsulare o territoriale circonda i singoli condrociti o gruppi di condrociti compresa la loro matrice pericellulare, costituendo il “*condrone*”, struttura a forma di canestro dotata di notevole plasticità e deformabilità. Le fibrille di collagene in questa regione sono incrociate tra loro, formando così una trama fibrillare attorno ai cluster di condrociti, proteggendoli dagli impatti meccanici. Le matrici pericellulare e territoriale servono ad avvolgere le cellule dalla matrice interterritoriale, per proteggerle da un possibile danno dovuto al carico applicato e per trasmettere i segnali meccanici alle cellule.

La matrice interterritoriale che costituisce la maggior parte del volume della matrice, è costituita da fibrille di collagene di grande diametro. Le fibre sono orientate in maniera diversa a seconda della zona e a seconda della necessità, in particolare hanno un andamento parallelo nella zona superficiale e perpendicolare nella zona radiale. Questa regione è distinguibile dalle altre per la presenza di aggregati di proteoglicani.

La matrice ha diverse funzioni: protegge i condrociti dal carico meccanico, contribuendo così a mantenere il loro fenotipo; immagazzina alcune citochine e fattori di crescita, necessari per condrociti, intervenendo anche come trasduttore di segnale per le cellule; inoltre, determina il tipo, la concentrazione e la velocità di diffusione delle sostanze nutritive verso i condrociti. La deformazione della matrice produce segnali meccanici, elettrici e chimici, che influenzano le funzioni delle cellule. Così, anche la matrice svolge un ruolo nella regolazione del carico sulla cartilagine articolare.

I condrociti sono cellule altamente specializzate, formano solo l' 1-5% del volume cartilagineo e sono scarsamente diffusi all'interno della matrice. Sono caratterizzati da un'alta attività metabolica individuale, ed una ridotta attività totale a causa del volume cellulare generale molto basso. Sintetizzano tutti i componenti della matrice e ne regolano il metabolismo.

Sono contenuti in lacune circondati da matrice extracellulare e non prendono rapporti gli uni con gli altri. Essi variano, per ciò che concerne dimensioni, forma e attività metabolica, tra porzioni

distinte della stessa superficie articolare. Ultrastrutturalmente, sono caratterizzati dalla presenza di organelli deputati alla sintesi di matrice extracellulare: reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi. Contengono con frequenza filamenti intracitoplasmatici, lipidi, glicogeno, vescicole secretorie e ciglia che si estendono dalle cellule alla matrice al fine di rilevare i cambiamenti meccanici della matrice stessa. Di forma sferoidale, sono deputati alla formazione e al mantenimento della matrice. Sono infatti responsabili della produzione delle molecole che costituiscono la matrice e degli enzimi responsabili della sua degradazione.

Il loro comportamento è influenzato dal carico articolare, garantiscono il mantenimento della superficie articolare e la variazione della stessa in risposta ai cambiamenti che avvengono a livello della matrice a seguito della degradazione delle macromolecole che la compongono e ai cambiamenti pressori che gravano su di essa. Traggono i nutrienti indispensabili alle loro reazioni metaboliche direttamente dal liquido sinoviale. Per raggiungere le cellule intrappolate nelle lacune della matrice tali molecole devono attraversare una doppia barriera composta dalla membrana e fluido sinoviale e dalla matrice extracellulare che è selettiva non solo in termini di grandezza dei metaboliti ma anche di carica. Tale sistema obbliga i condrociti ad un metabolismo prevalentemente anaerobio in conseguenza della bassa concentrazione di ossigeno che li circonda.

2.5. Struttura.

La cartilagine matura, in base alla disposizione, alla forma dei condrociti e alla diversa quantità ed organizzazione di collagene e proteoglicani, viene suddivisa in quattro zone :

- Strato superficiale
- Strato intermedio o zona di transizione
- Strato profondo o radiale
- Strato calcificato

Lo strato superficiale è il più sottile degli strati; costituisce circa il 10-20% dello spessore e contiene la maggiore quantità d'acqua (80%) e di collagene (85% del peso secco). I condrociti, in gran numero, di forma ovoidale, sono orientati parallelamente alla superficie articolare e presentano un'attività metabolica relativamente limitata. Sintetizzano alte concentrazioni di collagene e basse concentrazioni di proteoglicani, rendendo questa zona l'area con il più alto contenuto di acqua.

Sono coperti da una sottile pellicola di liquido sinoviale, la “lamina splendens”, che fornisce una superficie di scorrimento alla cartilagine articolare. Le fibrille di collagene, principalmente di tipo II, sono orientate parallelamente alla superficie articolare, caratteristica che rende questo strato particolarmente resistente alla trazione e alle forze di taglio che derivano dal movimento articolare. Alterazioni a carico di questa zona possono determinare dei cambiamenti importanti a carico delle proprietà meccaniche contribuendo quindi allo sviluppo di osteoartrosi. Un'altra funzione della zona superficiale è la sua attività di filtrazione delle macromolecole che protegge la cartilagine dal sistema immunitario del tessuto sinoviale .

Lo strato intermedio presenta una densità cellulare inferiore, contiene condrociti più grandi, sferici, singoli o a coppie e presenta un'attività metabolica maggiore rispetto allo strato superficiale. La percentuale di collagene invece diminuisce del 15%, le fibrille presentano diametri maggiori e una disposizione casuale. Il contenuto di acqua è più basso (65%), mentre la concentrazione di proteoglicani è maggiore.

Nello *strato profondo* i contenuti di collagene e di acqua rimangono costanti. Le fibrille sono orientate perpendicolarmente alla superficie dell'osso sottostante col quale si fondono. Questa disposizione delle fibre collagene, prima casuale e poi perpendicolare, crea un'architettura che favorisce l'omogenea distribuzione delle forze pressorie e la loro dissipazione verso l'osso subcondrale, soprattutto per quanto riguarda le forze perpendicolari di tipo compressivo. La densità cellulare è bassa, i condrociti hanno forma sferica e presentano un'alta attività metabolica. Una linea ondulata basofila separa lo strato radiale dalla cartilagine calcificata e viene definita *tidemark*: questa zona costituisce un'importante zona di transizione verso l'osso subcondrale, meno resistente, e rappresenta il fronte di un processo di mineralizzazione che deriva dalla crescita cartilaginea epifisaria e che viene inibito nella cartilagine matura.

La zona calcificata o mineralizzata è quasi completamente anelastica a causa della bassa concentrazione di collagene e proteoglicani e contiene piccole quantità di cellule incorporate in una matrice calcificata, dotate quindi di una bassa attività metabolica. Queste cellule sintetizzano collagene tipo X, di importanza fondamentale in quanto fornisce integrità strutturale e provvede all'assorbimento degli urti insieme all'osso subcondrale.

2.6. Caratteristiche e proprietà biomeccaniche.

Le specifiche caratteristiche viscoelastiche della cartilagine articolare sono dovute alla sua nano-architettura molecolare e all'organizzazione, particolare di ogni zona. L'assenza di vasi sanguigni e linfatici, di fibre nervose e membrane basali, la rende unica tra i tessuti connettivi dell'organismo. La nutrizione è assicurata principalmente dal liquido sinoviale mediante diffusione e, per gli strati più profondi, dai vasi provenienti dal sottostante osso subcondrale.

La cartilagine articolare assorbe con efficienza le pressioni meccaniche cui molte articolazioni sono soggette. Le molecole di proteoglicani, che si rinvengono isolate od aggregate in un reticolo, trattengono grandi quantità di acqua. Questi componenti della matrice, ricchi di glicosaminoglicani idrofilici, funzionano come una molla. Quando si applica una pressione, l'acqua viene spinta fuori dalla matrice cartilaginea al liquido sinoviale.

Quando l'acqua è espulsa, entra in gioco un altro meccanismo che contribuisce alla resilienza della cartilagine; si tratta della repulsione elettrostatica reciproca tra i gruppi carbossilici e solforici, dotati di cariche negative, presenti nelle molecole di glicosaminoglicani. Queste cariche sono anche responsabili della separazione delle diramazioni dei glicosaminoglicani con conseguente creazione di spazi che saranno occupati dall'acqua. Quando la pressione cessa, l'acqua è di nuovo attratta negli interstizi fra le diramazioni dei glicosaminoglicani. Questi spostamenti dell'acqua sono provocati dall'utilizzo delle articolazioni. Essi sono essenziali per il nutrimento della cartilagine e per facilitare gli scambi di ossigeno, di anidride carbonica e di altre molecole fra il liquido sinoviale e la cartilagine articolare. La mancanza del pericondrio nella cartilagine articolare comporta una più debole capacità di auto-riparazione. Il pericondrio infatti contiene delle cellule, precursori dei fibroblasti, in grado di migrare nelle ferite dove si circondano di matrice e rimpiazzano il tessuto.

La cartilagine articolare inoltre rappresenta un tessuto altamente idratato con una struttura composita che possiede una rigidità in compressione relativamente bassa ($E = 0,1-2 \text{ MPa}$), un coefficiente di Poisson (ν) di 0,2 e un coefficiente di permeabilità pari a $k=5 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$. Inoltre la cartilagine possiede, insieme con il liquido sinoviale, coefficiente di frizione pari a 0,008 (Swieszkowski, 2007).

2.7. Omeostasi articolare.

I condrociti sono dotati di sistemi enzimatici sia per la produzione della matrice che per la sua degradazione; l'equilibrio tra sintesi e degradazione mantiene il normale turnover e di conseguenza l'integrità strutturale e funzionale. Inoltre la matrice protegge i condrociti dal danno meccanico durante la normale funzione articolare e regola il trofismo e l'omeostasi delle cellule, assicurandone il normale metabolismo e l'attività sintetica.

Diverse sostanze riescono a passare attraverso la matrice dipendentemente dalla composizione della matrice stessa: sostanze nutritive, substrati per la sintesi delle molecole della matrice, molecole neosintetizzate, molecole degradate della matrice, prodotti metabolici di scarto e altre, quali citochine, fattori di crescita e inibitori delle proteasi tissutali [interleuchina-1(IL-1), fattore di necrosi tumorale (TNF), fattore di crescita trasformante (TGF- β), inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP), che contribuiscono alla regolazione della funzione cellulare. I principali fattori che influenzano tali processi sono concentrazione, composizione e organizzazione dei proteoglicani. Il turnover dei proteoglicani nella cartilagine matura è costante in condizioni fisiologiche, con velocità di sintesi uguale a quella di degradazione, determinata dalla stromalisina, che porta alla formazione di frammenti ricchi in condroitinsolfato. L'emivita dei proteoglicani è variabile (da 3.5 a 20 giorni), e poiché il tempo di degradazione del collagene è molto più lento di quello dei proteoglicani, improvvisi cambiamenti che interessino la componente proteoglicanica sono molto più dannosi per il metabolismo cartilagineo.

3. FISIOPATOLOGIA DELLA CARTILAGINE.

3.1. Epidemiologia delle lesioni della cartilagine.

Una recente revisione di 993 artroscopie, con l'utilizzo dello score di valutazione della *Società Internazionale per la Riparazione della Cartilagine (ICRS)*, ha riportato il 66% di patologie della cartilagine articolare, con l'11% di lesioni condrali a tutto spessore (Aroen, 2004). Un altro studio retrospettivo, che ha valutato 31000 artroscopie, ha rivelato il 63% di incidenza di difetti della cartilagine (Curl, 1997). L'incidenza di questo problema così complesso appare sottostimata. Johnson-Nurse e Dandy riferiscono che su 72 pazienti con infortunio al ginocchio, il 95% ha presentato dolore, il 76% tumefazione articolare e il 18% blocco articolare (Johnson-Nurse, 1985). Gli autori hanno concluso che le lesioni della cartilagine articolare sono state più comunemente osservate durante la quarta decade di vita, con lesioni a tutto spessore comuni nei giovani adulti nel loro terzo decennio di vita, in genere a seguito di lesioni acute traumatiche. Sia traumi minori ripetuti che lesioni di maggiore entità possono condurre allo sviluppo di osteoartrosi.

I sintomi tipici di una lesione condrale sono simili a quelli della rottura del menisco e si presentano sotto forma di gonfiore, dolore locale, blocco articolare, pseudo-blocco o intrappolamento. Outerbridge (1961) ha classificato i difetti condrali focali in diversi stadi, a seconda della gravità del difetto. Tuttavia, grandi difetti focali, se non trattati, portano precocemente allo stadio terminale dell'artrosi. Il trattamento più comunemente utilizzato per l'artrosi del ginocchio in fase terminale è la sostituzione protesica della superficie articolare. Tuttavia, questo trattamento è adatto per le persone anziane, con più di 60 anni di età, e con uno stile di vita sedentario. Pertanto, pazienti di età inferiore ai 45 anni di età non sono candidati ideali per la protesi totale del ginocchio.

3.2. Il deterioramento della cartilagine articolare .

A livello della superficie articolare cartilaginea possiamo avere sia lesioni di piccole dimensioni, come i difetti focali, sia lesioni generalizzate, come nel caso dell'osteartrosi.

Le lesioni cartilaginee focali possono essere suddivise in due grandi categorie:

1- Lesioni causate da traumi meccanici diretti alla matrice, senza danneggiamento delle cellule, in cui possiamo avere un ripristino della cartilagine qualora la perdita dei componenti della matrice non superi la capacità dei condrociti di sintetizzare nuove molecole di proteoglicani;

2- Lesioni che determinano una distruzione meccanica delle cellule e della matrice, dovute in genere a traumi ottusi o penetranti: questa situazione è quella più comunemente osservata nella pratica clinica. I risultati della riparazione dipendono da differenti fattori.

Un fattore che influisce notevolmente sulla guarigione dei difetti cartilaginei focali è la profondità della lesione. Il difetto cartilagineo presenta un'estensione bidimensionale limitata e può essere sia condrale, coinvolgendo solo le zone cartilaginee, oppure osteocondrale, raggiungendo l'osso subcondrale. Il difetto condrale puro è ulteriormente suddiviso in difetto a tutto spessore, cioè fino all'osso sub condrale (senza comprenderlo), a spessore parziale o a flap cartilagineo. Questi difetti tendono ad aumentare di dimensioni e profondità e a non ripararsi da soli (Buckwalter, 1990). Il difetto osteocondrale invece è un difetto cartilagineo a tutto spessore che comprende l'osso subcondrale sottostante. Un difetto osteocondrale attraversa il tidemark, aprendo la strada alle cellule mesenchimali del midollo osseo, portando alla formazione di un tessuto di riparazione fibrocartilagineo.

Quindi, la profondità del difetto è cruciale per stimolare una risposta riparativa. Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato che questo tessuto di riparazione risulta essere biomeccanicamente e strutturalmente inferiore rispetto alla cartilagine ialina e pertanto può non essere adatto alla sua funzione.

La dimensione del difetto è un altro fattore importante nella risposta riparativa. Uno studio effettuato su modello equino (Cahill, 1995) ha dimostrato che difetti di 3 mm di diametro possono andare incontro a riparazione completa dopo 9 mesi, mentre difetti più estesi possono non ripararsi completamente. La risposta riparativa della cartilagine articolare dipende quindi anche dall'entità della lesione, misurata in volume ed estensione del difetto. I difetti di diametro $<1 \text{ cm}^2$ hanno meno probabilità di influenzare la distribuzione delle sollecitazioni sull'osso subcondrale, e probabilmente peggiorano.

Anche l'età influisce sulla guarigione di una lesione cartilaginea e costituisce un fattore di rischio per quanto riguarda lo sviluppo di osteoartrosi. L'invecchiamento riduce l'idratazione della cartilagine e la popolazione dei condrociti; inoltre, con l'età, diminuiscono le attività mitotiche e di sintesi dei condrociti. Studi effettuati sul coniglio hanno dimostrato una migliore risposta riparativa in difetti condrali di 2 mm negli animali più giovani (5 settimane) rispetto ad animali più grandi (4 mesi) (Johnsone, 1999). Anche la profondità della lesione è risultata essere correlata

all'età. Bambini e adolescenti sviluppano più frequentemente lesioni osteocondrali, mentre gli adulti lesioni condrali pure, probabilmente a causa di una zona calcificata più sviluppata e matura. Altre differenze legate all'età riguardano le lesioni osteocondrali (osteocondrite dissecante-OCD), che nei bambini con ossa in crescita (fisi aperte) di solito guariscono senza alcuna problema mentre nell'individuo adulto non guariscono quasi mai.

Anche l'entità del trauma è importante nel determinare il tipo di lesione e le sue conseguenze. Un forte impatto improvviso sulla superficie articolare oppure carichi ripetuti possono causare microlesioni a carico dei condrociti, che portano a degenerazione e morte cellulare. Questo determina anche alterazioni della matrice con conseguente aumento dell'idratazione, fissurazioni cartilaginee e ispessimento dell'osso subcondrale. I traumi portano inoltre alla diminuzione della produzione di proteoglicani da parte dei condrociti.

L'osteoartrite invece, è una malattia cronica-degenerativa delle articolazioni diartrodiali, caratterizzata dall'attivazione di cascate infiammatorie e cataboliche a livello molecolare che portano, in ultima analisi, ad un progressivo deterioramento della cartilagine articolare. Quando sottoposti a stress meccanici o biochimici (produzione locale di citochine proinfiammatorie e mediatori dell'infiammazione come l'interleuchina-1 β , il Tumor Necrosis Factor- α , l'ossido nitrico, le prostaglandine o i prodotti di degradazione della matrice), i condrociti subiscono cambiamenti patologici nei loro pattern di espressione genica che compromettono la normale omeostasi cartilaginea (diminuzione della produzione di molecole della matrice con un contemporaneo aumento della produzione di enzimi di degradazione della matrice e diminuzione della reattività riparativa agli stimoli). Questo si traduce in una degradazione della matrice extracellulare e nella senescenza cellulare dei condrociti con successiva apoptosi.

L'artrosi può anche essere il risultato di una precedente lesione di tendini e legamenti o fratture intra-articolari, che portano a instabilità articolare e usura della cartilagine articolare (artrosi secondaria). È importante ricordare che l'artrosi colpisce non solo la cartilagine, ma anche l'osso subcondrale e in misura minore la sinoviale, i legamenti, i tendini e i muscoli.

3.3. Lo stress ossidativo.

A livello articolare, in seguito ad un insulto traumatico e soprattutto in corso di artrosi, si assiste ad un'importante modificazione nel microambiente articolare caratterizzata dall'aumento dei radicali liberi capaci di indurre ed amplificare quelle alterazioni degenerative, successivamente infiammatorie, tra loro strettamente associate nel termine di "stress ossidativo-infiammatorio".

Lo stress ossidativo è una condizione indotta da un'alterazione dell'equilibrio dinamico fra i processi ossidativi e riduttivi che avvengono in ogni cellula con la produzione di numerose specie radicaliche.

I radicali liberi sono molecole caratterizzate dalla presenza di un elettrone spaiato nel loro orbitale esterno; i più diffusi sono quelli a contenuto d'ossigeno (ROS) come l'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) ed il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Fisiologicamente prodotti in piccole quantità dall'organismo durante le tappe intermedie del metabolismo aerobico, i radicali liberi possiedono determinate caratteristiche chimiche (elevata instabilità, emivita brevissima, diffusione a breve distanza nell'ambiente circostante) che ne spiegano l'intrinseca tossicità. In condizioni normali, il potenziale tossico viene efficacemente neutralizzato dalle difese antiossidanti endogene in grado di minimizzare gli effetti dell'insulto ossidativo, non solo intrappolando i radicali liberi (cosiddetta azione "scavenger"), ma anche catalizzandone la trasformazione e sequestrando ioni metallici, ferro e rame in particolare, necessari alla loro formazione. In questa situazione si parla di "bilancia ossidativa" intendendo, con tale termine, l'equilibrio biologico tra produzione di radicali liberi da una parte, ed efficacia delle difese antiossidanti dall'altra. In sostanza, un vero e proprio "paradosso della vita aerobica", tale per cui l'utilizzo dell'ossigeno comporta necessariamente la messa in atto di meccanismi che ne controllino la valenza tossica (Davies, 1995).

Questo equilibrio può però essere turbato da una miriade di fattori ambientali (es. radiazioni, raggi UV, inquinamento), para-fisiologici (es. attività fisica, invecchiamento) o patologici (es. traumi, infezioni, infiammazioni, neoplasie), che aumentano considerevolmente la formazione di radicali liberi e, allo stesso tempo, riducono l'efficienza delle difese antiossidanti (Fielding, 1997). In questi casi, si instaura una condizione nota come "stress ossidativo", che sta ad indicare un alterato rapporto tra fattori pro-ossidanti e meccanismi di difesa antiossidante (Sayre, 2001; Cizewski, Culotta 2000).

Quando presenti in eccesso, i radicali liberi agiscono da potenti “tossine endogene”, capaci di danneggiare i costituenti ubiquitari dei tessuti (proteine, lipidi, acidi nucleici, carboidrati), alterare la permeabilità e l’approvvigionamento energetico delle cellule e attivare gli enzimi responsabili della morte cellulare per apoptosi. Lo stress ossidativo non è connesso unicamente al metabolismo aerobico e da cui dipendono danni tissutali aspecifici; i radicali liberi infatti non sono solo potenziali tossine, ma anche “molecole di segnale” che condizionano la proliferazione e la crescita cellulare ed attivano enzimi (es. ciclo-ossigenasi) e specifici fattori di trascrizione genica (es. NFκB, protein chinasi), direttamente implicati nell’innescare e nella propagazione di risposte immunitarie ed infiammatorie (Hancock, 2001).

L’accumulo incontrollato di radicali liberi è quindi responsabile oltre che dei danni cellulari imputabili ad un alterato stato ossidativo, anche delle modifiche fisiopatologiche connesse all’attivazione della cascata infiammatoria.

Nello specifico, a livello articolare, i radicali liberi sono in grado di: avviare la condrodegenerazione per apoptosi dei condrociti e la degradazione della matrice extracellulare; scatenare e perpetuare l’infiammazione sinoviale influenzando il microcircolo; attivare i fattori preposti alla sintesi di mediatori pro-infiammatori; determinare la sensibilizzazione delle fibre nervose periferiche che hanno azione nocicettiva; indurre alterazioni metaboliche a carico dell’osso subcondrale per compromissione dell’equilibrio tra fasi di deposizione e riassorbimento della matrice ossea. Tra i mediatori maggiormente responsabili di danni degenerativo-infiammatori devono essere quindi menzionati i radicali liberi, iperprodotti dalle cellule articolari e non sufficientemente contrastati dal potenziale antiossidante endoarticolare (Dimock, 2000).

I radicali liberi vengono prodotti all’interno del microambiente articolare in seguito a :

- Danno diretto: carichi meccanici anomali e/o eccessivi o traumi diretti alle strutture articolari generano un’immediata produzione di radicali liberi, quale diretta conseguenza della rottura dei legami covalenti tra molecole (Milam, 1998).
- Ipossia/riperfusion: in condizioni normali, indipendentemente dal movimento o dal carico applicato all’articolazione, la pressione intrarticolare ha valori negativi, condizione essenziale per garantire sia la stretta contiguità anatomica tra membrana sinoviale e cartilagine, che la pervietà dei vasi sinoviali da cui dipende l’apporto nutritivo al tessuto cartilagineo. In uno stato infiammatorio articolare le alterazioni microcircolatorie,

unitamente all'aumentata produzione di liquido sinoviale, determinano la variazione della pressione idrostatica intrarticolare che, durante il movimento, supera la pressione di perfusione dei capillari (Blake, 1994). La conseguenza è uno stato ipossico, in cui si creano variazioni metaboliche dei tessuti articolari e, nel successivo periodo di ri-perfusione, si ha un considerevole aumento della produzione di radicali liberi da parte delle cellule endoteliali.

- Microemorragie intrarticolari: frequente reperto in traumi ed infiammazioni. L'emoglobina che si deposita nei tessuti agisce da potente fattore flogogeno, catalizzando, grazie agli ioni ferro in essa contenuti, la formazione di radicali idrossilici, potenti induttori di danni perossidativi a carico dell'endotelio, nonché di alterazioni del turnover osseo e della vitalità cellulare, in particolare dei condrociti (Hooiveld, 2001).
- Infiammazione: in corso di flogosi, i radicali liberi vengono iperprodotti da cellule articolari residenti (sinoviociti, condrociti, fibroblasti, macrofagi, mastociti, cellule endoteliali) e da elementi circolanti richiamati in situ dalla flogosi locale, tra cui i polimorfonucleati neutrofili (PMN).

È ormai pienamente dimostrato che i condrociti rappresentano una delle fonti più importanti di radicali liberi: sono in grado di produrre quantità limitate in condizioni fisiologiche e ne aumentano marcatamente il rilascio in svariate situazioni patologiche.

Questo si verifica in corso di artrosi: i condrociti, iperattivati da stimoli meccanici e da un surplus di citochine ad attività catabolica e pro-infiammatoria (IL-1, TNF), generano ingenti quantità di radicali liberi, capaci di compromettere a più livelli l'omeostasi del tessuto cartilagineo.

In particolare, si è dimostrato che essi inducono:

- Apoptosi dei condrociti: si creano modifiche perossidative a carico di lipidi e proteine, tappa obbligata per avviare le alterazioni di membrana e la successiva frammentazione cellulare. I condrociti si sono rivelati tra le cellule più vulnerabili all'azione citotossica dei radicali liberi (ROS e NO) che sono in grado di comprometterne rapidamente il potenziale proliferativo e la produzione energetica e decretarne la morte per apoptosi (Asada, 2001).
- Degradazione della matrice extracellulare: i radicali liberi hanno la capacità di degradare le principali macromolecole della matrice cartilaginea (aggreccani, collagene, acido ialuronico),

innescando diversi meccanismi di danno litico come la rottura diretta di aggregati, collagene di tipo II ed acido ialuronico.

- Inibizione della sintesi dei proteoglicani ed alterazione della composizione qualitativa dei glicosaminoglicani.
- Attivazione delle proteasi, principali enzimi responsabili della lisi della matrice cartilaginea (es. metalloproteasi, cisteinoproteasi, serinoproteasi ed aggreganasi): ai radicali liberi è stata attribuita un'influenza progressivamente più vasta sul potenziale litico delle metalloproteasi (MMP), essendo in grado di attivarne le forme latenti e di antagonizzare, nel contempo, l'azione dei corrispondenti inibitori (es. TIMP).
- Induzione della sintesi di enzimi proteolitici: i radicali liberi iperprodotti intervengono nei meccanismi di attivazione di specifici fattori (NF- κ B, protein chinasi), preposti alla sintesi degli enzimi ad attività condrolitica (es. collagenasi, gelatinasi). Ciò costituisce un tassello essenziale nella condrodegenerazione poiché, non solo mediano il danno ai condrociti ed ai componenti di matrice, ma amplificano e sostengono nel tempo, l'insulto tissutale.

Un discorso a parte merita uno specifico radicale libero, il monossido di azoto o NO (*nitric oxide*) in virtù del suo comportamento bifasico. Infatti, bassi livelli di questo radicale gassoso aumentano il riassorbimento osteoclastico della matrice ossea. Viceversa, concentrazioni maggiori di NO inibiscono l'attività sia degli osteoclasti sia degli osteoblasti, compromettendo gravemente il turnover della matrice. È stato ipotizzato che questa potrebbe essere la spiegazione della limitatezza dei fenomeni erosivi che si riscontrano in molte artropatie, artrosi compresa. La produzione di NO potrebbe, in sostanza, rappresentare la messa in atto di un meccanismo protettivo innescato in condizioni patologiche ed incentrato sulla regolazione dell'attività osteoclastica.

La ricerca di base nel campo della biologia dei radicali liberi ha generato, negli ultimi anni, risultati di primaria importanza per la comprensione dei complicati meccanismi patogenetici dell'artrosi. Ha contribuito ad aprire nuovi orizzonti nello studio e nella terapia di questa patologia invalidante e nella rigenerazione cartilaginea. Le strategie di ricerca si stanno focalizzando sulla valutazione, sia in vivo che in vitro (es. colture cellulari), del ripristino del corretto ambiente ossidativo endoarticolare e, attraverso questo, del controllo dei risvolti degenerativi, infiammatori ed algogeni associati al suo disequilibrio.

3.4. Riparazione e rigenerazione della cartilagine.

Con i termini di Riparazione e Rigenerazione cartilaginea vengono descritti due processi del tutto diversi e distinti tra loro.

Il termine *Riparazione* si riferisce al ripristino della cartilagine danneggiata e alla sua sostituzione con un tessuto che presenta somiglianze strutturali con la cartilagine ialina articolare per quanto riguarda l'aspetto macroscopico o i tipi cellulari. Questo tessuto di riparazione manifesta un'organizzazione delle sue fibre diversa rispetto a quella della cartilagine sana e non presenta una stratificazione zonale ben definita dei suoi condrociti (Hunziker, 2002). La sua composizione biochimica è più simile a quella di un tessuto fibroso, e la sua competenza meccanica è significativamente inferiore a quella della cartilagine ialina (Franke, 2007); in conclusione, in questo processo di riparazione, non viene ripristinata la cartilagine ialina nativa (Caplan, 1997).

Al contrario, quando si parla di *Rigenerazione* ci si riferisce alla *restitutio ad integrum* della cartilagine articolare a livello istologico, biochimico e biomeccanico; questo la rende indistinguibile dalla cartilagine sana adiacente. È interessante notare che, al contrario della riparazione, la rigenerazione dei tessuti avviene facilmente solo negli embrioni, mentre è rara nei neonati e assente negli adulti.

Esistono differenze fondamentali nella riparazione spontanea di difetti focali condrali e quelli osteocondrali. La tipica risposta dell'organismo a qualsiasi danno tissutale è costituita da necrosi, infiammazione, riparazione e rimodellamento della cicatrice. Nel processo di guarigione ha una grande importanza la fase vascolare. A causa della mancanza di vascolarizzazione, la cartilagine articolare non possiede la capacità di generare questo tipo di risposta. Così, in seguito ad insulto meccanico o lesione, la capacità riparativa intrinseca della cartilagine è molto bassa. La mancanza di pericondrio nella cartilagine articolare riduce ulteriormente la capacità di auto-rigenerazione, poiché la sostituzione di tessuto tramite apposizione esogena da parte di fibroblasti del pericondrio è assente. Inoltre l'accesso di cellule progenitrici verso il sito di una lesione condrale è limitato, per cui i difetti condrali vengono in parte ripopolati da cellule che migrano dalla membrana sinoviale. Tuttavia, il riempimento di tali difetti è insufficiente e, dopo alcune settimane o mesi, a carico del tessuto di riparazione si osserva degenerazione e mancata integrazione, con discontinuità e regioni di ipocellularità. In ultima analisi, queste regioni della

superficie contigua diventano necrotiche, senza mostrare segni di rimodellamento né di riassorbimento e nel tempo questo può portare ad un aumento delle dimensioni del difetto.

Al contrario, un difetto osteocondrale viene riempito con un coagulo di sangue che si forma solo se il midollo osseo è in comunicazione con il difetto. Le cellule mesenchimali pluripotenti presenti nel coagulo di sangue si differenziano in condrociti e osteoblasti che poi formano il tessuto cartilagineo di riparazione e l'osso subcondrale.

Il processo di condrogenesi viene completato dopo alcuni mesi ed è caratterizzato dalla comparsa di cellule rotonde e dalla presenza di una nuova matrice cartilaginea. A seconda della maturazione del tessuto di riparazione, questa matrice cartilaginea contiene proteoglicani e collagene di tipo I e di tipo II in diversi rapporti. In particolare, l'espressione del collagene di tipo I, dei collagene associati al tipo I (V, VI, XII, XV) e dei marker delle cellule proliferative aumenta nel tessuto di riparazione rispetto alla normale cartilagine articolare, mentre la trascrizione è più elevata nella cartilagine normale per quanto riguarda i proteoglicani, le proteine di adesione non collageniche e i biomarkers di sviluppo della cartilagine. Il tessuto di riparazione ha un contenuto di acqua maggiore, ma presenta i moduli di equilibrio e di Young diminuiti rispetto alla vicina cartilagine sana, mostrando un contenuto di aggrecano e collagene di tipo II che progressivamente aumenta nel tempo (Strauss, 2005; Anraku, 2009).

Tuttavia, questo tessuto di riparazione non si integra con la matrice sana adiacente e i condrociti all'interno della cartilagine articolare vicina non partecipano al riempimento del difetto, ma subiscono apoptosi nel corso del tempo, facendo sì che la cartilagine in questa regione diventi acellulare. Dopo alcuni mesi, il nuovo tessuto all'interno del difetto presenta un fenotipo fibrocartilagineo e iniziano a essere visibili i primi segni di degenerazione. Sia il tessuto di riparazione sia la cartilagine alla periferia del difetto non sono in grado di sopportare carichi meccanici nel tempo e tendono a degenerare dopo diversi anni (Jackson, 2001). Se non trattato, il difetto si può quindi estendere alla cartilagine normale circostante e può esitare in OA generalizzata dell'articolazione.

In un'articolazione colpita da OA la capacità di riparazione della cartilagine articolare è compromessa. Poiché la dimensione critica per la riparazione di un difetto cartilagineo è di 3 cm² (Gomoll, 2010), lesioni di maggiori dimensioni che si verificano in caso di OA, non consentono un

sufficiente riempimento del difetto e un contenimento del tessuto di riparazione. Di conseguenza, il deterioramento della cartilagine osteoartrosica rimane irreparabile e progredisce nel tempo.

In conclusione si può affermare che, a causa della limitata o quasi assente capacità di auto-riparazione o auto-rigenerazione e della spesso inadeguata rimozione dei prodotti di scarto o rifiuto, i danni che interessano la cartilagine articolare rappresentano uno dei maggiori problemi per la salute dell'uomo.

4. LA RIPARAZIONE CARTILAGINEA.

I difetti della cartilagine articolare, sia nell'uomo sia nelle diverse specie animali, rappresentano ancora una sfida terapeutica aperta a causa dei risultati a lungo termine non ancora sempre ottimali (Mithoefer, 2013).

Quando un trauma o una patologia provocano un processo distruttivo intra-articolare, la cartilagine di un individuo adulto ha una capacità limitata di guarigione spontanea, soprattutto nei casi in cui il difetto sia di grandi dimensioni (> 3 mm) e in particolar modo quando non è coinvolto l'osso subcondrale, o nei pazienti più anziani (Buckwalter, 2005). Tra le ragioni che spiegherebbero l'inefficace risposta riparativa al danno cartilagineo si può includere l'incapacità dei condrociti di migrare verso il sito di lesione, la natura avascolare della cartilagine e l'assenza di un coagulo nel caso in cui la lesione non interessi l'osso sub condrale (Mithoefer, 2013; Hunziker, 2002).

Nonostante attualmente esistano diverse opzioni, la maggior parte delle scelte terapeutiche portano solo a una riduzione della sintomatologia e si pongono l'obiettivo di ricreare una lesione in modo da stimolare la capacità biologica di guarigione a lungo termine .

Il sollievo sintomatico può essere principalmente ottenuto tramite farmaci analgesici per via orale, perdita di peso, fisioterapia per rafforzare la muscolatura o con una condroplastica artroscopica che mira a pulire i margini liberi della cartilagine coinvolti nell'irritazione meccanica dell'articolazione. Questi trattamenti indubbiamente riducono il dolore, ma non sono in grado di impedire la principale conseguenza a lungo termine delle lesioni cartilaginee: lo sviluppo di osteoartrosi (Widuchowski, 2008).

Nel trattamento dell'osteoartrosi possono essere utilizzate misure conservative che comprendono opzioni non farmacologiche, come la riduzione del peso e l'esercizio fisico controllato e approcci farmacologici a base di anti-infiammatori non steroidei, analgesici oppiacei e iniezioni intra-articolari di corticosteroidi o di acido ialuronico. Le opzioni chirurgiche comprendono osteotomie correttive atte a trasferire il carico dalle zone danneggiate verso aree non danneggiate, e l'artroplastica, che può essere eseguita nella maggior parte delle grandi articolazioni sinoviali. Questa metodica consiste nel sostituire l'articolazione colpita da gravi processi artrosici, o parte di essa, con una protesi metallica. La tecnica, pur garantendo una buona qualità di vita, non è adatta per individui giovani, poichè è alto il rischio di insuccesso a lungo termine, e per coloro che svolgono attività fisica o lavori intensi.

Per quanto riguarda il trattamento dei difetti focali della cartilagine articolare, possono essere utilizzati sia approcci conservativi, che mirano esclusivamente a ridurre il dolore, sia opzioni chirurgiche di stimolazione ossea, come il debridement, la perforazione subcondrale o le microfratture. Tali trattamenti, detti “biologici”, hanno lo scopo di stabilire una comunicazione tra il difetto cartilagineo e il midollo osseo, permettendo alle cellule mesenchimali di migrare dall’osso subcondrale verso il difetto. Altre terapie chirurgiche utilizzate sono le procedure “ricostruttive” che includono il trapianto osteocondrale autologo (mediante cilindri osteocondrali prelevati da zone di minor carico dell’articolazione) o allogenico.

Tuttavia, nessuna procedura conservativa o chirurgica per il trattamento sia di lesioni focali che generalizzate della cartilagine articolare porta a una *restitutio ad integrum* completa; è infatti molto difficile ottenere la formazione di cartilagine ialina e il tessuto di riparazione fibrocartilagineo non è in grado, nel tempo, di sopportare sollecitazioni meccaniche.

Il trattamento ideale dovrebbe infatti ristabilire sia le proprietà biomeccaniche fisiologiche della cartilagine, sia la capacità di resistere all’usura nel tempo, ripopolando la lesione con condrociti capaci di produrre matrice ialina completamente integrata con la cartilagine sana circostante, ritardando o addirittura fermando la progressione dell’artrosi articolare.

Negli ultimi anni gran parte degli sforzi tesi a raggiungere questo obiettivo sono stati diretti verso l’ingegneria tissutale.

4.1. TECNICHE CHIRURGICHE.

4.1.1. Lavaggio artroscopico e debridement.

Il *debridement* è stato descritto per la prima volta da Magnusson (1946). È un termine ampio, che comprende levigatura della lesione articolare, meniscectomia, rimozione di osteofiti liberi in articolazione e sinoviectomia. L’effetto combinato di queste procedure sul difetto condrale è difficile da quantificare, in quanto i risultati sono influenzati da dimensioni, numero e grado di degenerazione dei difetti condrali. In ogni caso, grazie al lavaggio, è possibile rimuovere i detriti degenerativi della cartilagine articolare, gli enzimi proteolitici e i mediatori dell’inflammatione, portando ad un’attenuazione del dolore e del disturbo funzionale; tuttavia questa tecnica non impedisce la progressione dell’artrosi (Hubbard, 1996). Nella pratica clinica, il debridement articolare non è raccomandato quindi come unico trattamento, ma dovrebbe essere considerato

come una fase delle tecniche di stimolazione midollare, come la perforazione o le microfratture (Madry, 2011; Smith, 2005).

4.1.2. Tecniche di stimolazione del midollo osseo.

Rappresentano le tecniche più comunemente usate per le lesioni sintomatiche più piccole in quanto si tratta di tecniche semplici, con costi relativi minori rispetto ad altri trattamenti.

Ispirati al processo di riparazione spontanea dei difetti cartilaginei a tutto spessore, questi metodi mirano a creare microfratture nell'osso subcondrale sottostante tramite perforazione, rasatura o abrasione, in modo da richiamare, a livello del difetto cartilagineo, cellule progenitrici del midollo osseo. La riparazione avviene in maniera simile alla riparazione naturale di difetti a tutto spessore. Le cellule mesenchimali si differenziano infatti in fibrocondrociti che sono in grado di formare un tessuto fibrocartilagineo molto simile alla cartilagine ialina, anche se meccanicamente inferiore (Madry, 2011; Bedi, 2010). Questa è infatti costituita da collagene di tipo I, II e III in quantità variabili, e si differenzia dalla circostante cartilagine ialina per una minore concentrazione di collagene di tipo II.

A differenza di altre tecniche, la stimolazione del midollo osseo non comporta un trasferimento diretto dei condrociti nella lesione. Una tecnica di questo tipo venne proposta per la prima volta da Pridie nel 1959 e consisteva nella perforazione dell'osso subcondrale dopo applicazione del debridement.

La microfrattura, una modifica del metodo di Pridie, è una metodica semplice che viene effettuata in artroscopia e che risulta tra le più utilizzate come prima scelta per il trattamento dei difetti condrali. È particolarmente efficace per i piccoli difetti della cartilagine articolare (<2 cm²) ed è interessante per la sua natura relativamente mini-invasiva, per i brevi tempi di recupero e per la sua bassa morbilità (Clair, 2009).

La procedura consiste nel rimuovere tutta la cartilagine instabile sino ad ottenere un difetto condrale ben definito, circondato da cartilagine sana, con una completa esposizione dell'osso subcondrale. È importante creare dei bordi di cartilagine ialina sana perpendicolari al difetto. Viene poi utilizzato un punteruolo per artroscopia per produrre fori di 3-4mm di profondità nella placca dell'osso subcondrale. È importante che l'integrità della lamina ossea subcondrale venga mantenuta. Il difetto viene riempito con un cosiddetto "super coagulo" che rappresenta un

ambiente ottimale per la differenziazione delle cellule midollari pluripotenti in un tessuto di riparazione.

Nonostante diversi vantaggi, questa tecnica presenta risultati variabili a seconda del paziente su cui viene applicata: i più giovani e quelli con danni cartilaginei di piccola entità sono quelli che presentano i migliori risultati dal punto di vista clinico (Zhang, 2009).

Sono state descritte diverse modifiche alle procedure di stimolazione del midollo osseo al fine di migliorarne i risultati. Hoemann e altri hanno dimostrato, in un modello ovino, che la stabilizzazione del coagulo di sangue con l'aggiunta di chitosina, un polimero trombogenco e adesivo, favorisce il riempimento del difetto e ne migliora l'organizzazione cellulare e la composizione biochimica (Hoemann, 2005). Inoltre, sono stati studiati diversi fattori di crescita per aumentare la qualità del tessuto in formazione con risultati soddisfacenti: fattori di crescita insulino-simili collocati in coaguli di fibrina in un modello equino hanno migliorato quantitativamente e qualitativamente il tessuto di riparazione e ridotto la gravità dell'infiammazione post-operatoria (Fortier, 2002; Nixon, 2005). I fattori di crescita piastrino-derivati sono altri fattori mitogeni per le cellule mesenchimali e diversi studi hanno mostrato risultati promettenti per quanto riguarda la loro abilità a stimolare la formazione di cartilagine ialina e la proliferazione dei condrociti. Recentemente è stata valutata l'aggiunta di acido ialuronico alla procedura di microfrattura in alcuni conigli bianchi della Nuova Zelanda e si è riscontrato un migliore riempimento della lesione con un tessuto che presentava caratteristiche istologiche più simili alla cartilagine ialina (Strauss, 2009). Recentemente è stata proposta una modifica alla tecnica delle microfratture. Questa metodica, la nanofrattura, prevede perforazioni più profonde (9mm) rispetto alle microfratture (3-4 mm), garantendo una stimolazione diretta delle cellule staminali mesenchimali che si trovano in profondità. Presenta diversi vantaggi quali maggior riempimento della lesione, tessuto neformato con carattere maggiormente ialino, maggiori quantità di collagene II e minori di collagene I (Chen, 2011).

4.1.3. Mosaicoplastica.

La *Mosaicoplastica* è stata sviluppata e perfezionata da Hangody in Ungheria all'inizio degli anni '90. I primi esperimenti sugli animali sono stati condotti nel 1991 ed i primi innesti umani sono stati effettuati nel 1992.

Questa tecnica è stata sempre più usata in Europa dal 1995 ed oggi viene ampiamente applicata nel trattamento dei difetti condrali e osteocondrali. In questa tecnica vengono prelevati tasselli osteocondrali di forma cilindrica, di diverse dimensioni da aree non sottoposte a carico e trasferiti nella zona danneggiata in modo da riempire il difetto condrale creando un effetto a mosaico, da cui il nome di mosaicoplastica.

La tecnica originale veniva effettuata mediante artrotomia. Hangody (1998) ha descritto un miniapproccio artrotomico per la mosaicoplastica del ginocchio, in particolare per i difetti più grandi, i difetti rotulei e i difetti sui condili femorali non facilmente accessibili tramite artroscopia. Tuttavia, i recenti sviluppi nella strumentazione e nelle tecniche chirurgiche hanno reso possibile eseguire questa procedura anche in artroscopia in day-hospital.

Il principale vantaggio di questa tecnica è un immediato riempimento del difetto con cartilagine ialina matura che fornisce una superficie di carico stabile, un periodo di riabilitazione relativamente breve, la possibilità di effettuare l'operazione in un unico stadio e permette inoltre di trattare allo stesso modo difetti condrali e osteocondrali. Le lacune tra i tasselli vengono generalmente colmate da fibrocartilagine che fornisce stabilità secondaria ai tasselli stessi. Tuttavia, alcuni autori hanno descritto questi spazi come "spazi morti" che forniscono una stabilità inferiore al trapianto (Gudas, 2003; Hangody, 2003).

Uno dei difetti principali di questa tecnica è la morbilità a livello del sito donatore tanto che, proprio per questo motivo, si raccomanda l'utilizzo di questa metodica solo per difetti compresi tra 1 e 4 cm² (Hangody, 2003).

La cartilagine del sito donatore può differire da quella dell'area da trattare per l'orientamento delle fibre di collagene, le proprietà meccaniche e lo spessore, con una conseguente mancata integrazione laterale tra i tasselli e la cartilagine nativa che permette la penetrazione del liquido sinoviale nello strato subcondrale con formazione di cisti.

In secondo luogo, questa procedura è tecnicamente difficile da utilizzare per i difetti condrali tibiali, in quanto richiede un accesso perpendicolare alla cartilagine. Bentley *et al.* hanno sconsigliato l'uso di questa tecnica anche in difetti rotulei (Bentley, 2003).

4.1.4. Trapianto osteocondrale allogenico.

L'allograpianto osteocondrale è una procedura descritta diversi decenni fa (Gross, 1975) e consiste nel trapianto di un innesto di cartilagine articolare e del suo sottostante osso subcondrale, proveniente da un cadavere, nel sito danneggiato del paziente.

Mentre inizialmente era riservata al trattamento di grandi difetti osteocondrali in seguito a traumi o resezione di tumori maligni è diventata una scelta sempre più popolare per trattare difetti condrali o osteocondrali di carattere sia acuto che degenerativo. Nei due decenni scorsi, numerosi studi clinici hanno dimostrato l'efficacia del trapianto osteocondrale allogenico (Czitrom, 1986; Chu, 1999; Aubin, 2001; Gortz, 2006; Emmerson, 2007; Gross, 2008).

I principali vantaggi nell'utilizzo di questa procedura sono la possibilità di conferire alla superficie dell'innesto una particolare forma, l'immediato trapianto di cartilagine articolare matura in una singola operazione, l'opportunità di poter rimpiazzare grandi difetti e il superamento del maggior limite imposto dalla mosaicoplastica determinato dalla morbidity del tessuto donatore. Inoltre, risulta possibile ricoprire in modo completo la lesione evitando la formazione di spazi che comprometterebbero la stabilità dell'impianto. Le limitazioni di questa tecnica includono invece un numero limitato di innesti disponibili, un costo elevato, il possibile rigetto del trapianto o semplicemente l'incompleta integrazione con il tessuto circostante (Bugbee, 2002).

Inizialmente gli innesti venivano impiantati entro 24 ore dal prelievo. A causa di problemi di sicurezza connessi alla trasmissione di infezioni virali e batteriche, attualmente è richiesto uno screening meticoloso prima dell'impianto (Bedi, 2010); pertanto i trapianti osteocondrali freschi raramente sono impiantati prima di un periodo di screening di circa 7- 10 giorni. Diversi studi hanno esaminato gli impianti osteocondrali fino a 42 giorni dopo il prelievo e hanno dimostrato buoni risultati clinici, anche se la vitalità dei condrociti diminuisce con il tempo (Williams, 2007; McCulloch, 2007).

La conservazione prolungata diminuisce la vitalità dei condrociti, la densità cellulare e il metabolismo dei tessuti, mentre ha solo effetti minimi sulla matrice extracellulare (ECM) e sull'osso.

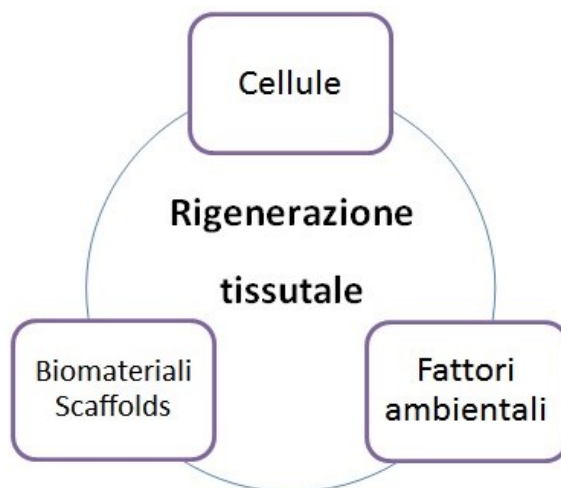
Durante la refrigerazione la vitalità dei condrociti e la densità diminuiscono nel tempo: quasi tutti i condrociti rimangono vitali a quattro giorni se conservati a 4 ° C, e fino al 98% sono vitali a sette giorni (Pearsall, 2004). Intorno alle 3 settimane, la vitalità dei condrociti scende a circa il 70% e a sette settimane al 67% (Pearsall, 2004; Williams, 2003; Pennock, 2006; Pallante, 2009).

L'associazione precisa tra vitalità cellulare e risultati clinici tuttavia rimane sconosciuta (Ball, 2004; Kwan, 1989). Attualmente si raccomandano 42 giorni come periodo massimo di conservazione per un innesto allogenico fresco.

Il terreno e la temperatura ideale di conservazione per il tessuto osteocondrale fresco rimangono controversi (Ranawat, 2008). Tradizionalmente gli innesti venivano prelevati e poi depositati in una soluzione di Ringer a 4° C per poi essere impiantati entro 7 giorni. Recentemente però, si è passati a depositare gli innesti in diversi mezzi di cultura, ottenendo migliori risultati per quanto riguarda la vitalità dei condrociti a distanza di due settimane. Sono disponibili anche innesti congelati, portati alla temperatura di -80°C. Questi riducono al minimo le reazioni di rigetto e le possibili trasmissioni di malattie, ma allo stesso tempo, la cartilagine trattata a basse temperature potrebbe andare incontro a fessurazione e delaminazione con rottura della superficie articolare. Il congelamento provoca infatti la morte dei condrociti e danni alla ECM (Judas, 2007), probabilmente per la scarsa penetrazione del crioconservante nel tessuto, la diversa velocità di congelamento e l'alto contenuto di acqua della matrice extracellulare. Recentemente, sono stati sviluppati trapianti osteocondrali decellularizzati, di dimensioni specifiche e con una lunga shelf-life a temperatura ambiente. Studi clinici sono attualmente in corso per la valutazione dei risultati a breve e medio termine.

4.2. INGEGNERIA TISSUTALE.

L'ingegneria tissutale si sviluppò alla fine del 1980 con l'obiettivo di ricostruire la struttura e la funzione dei tessuti umani. I componenti fondamentali di questo processo sono tre: le cellule, gli scaffolds/matrici e i fattori stimolatori della crescita. Le cellule devono essere in grado di mantenere il fenotipo dei condrociti articolari o stimolare la differenziazione di altri tipi di cellule in condrociti ed accumulare matrice di cartilagine ialina. Una matrice strutturale o scaffold assicura un ambiente tridimensionale alle cellule, facilita la formazione della matrice cartilaginea e migliora la distribuzione dei fattori di crescita a livello locale. Infine, i fattori di crescita stimolano, con meccanismi biologici, chimici o meccanici, un'adeguata crescita cellulare e la sintesi della matrice in vivo o in vitro (Hunziker, 2002; Mikos, 2006).



La "triade" dell'ingegneria tissutale: le cellule sono il principale elemento nella rigenerazione di un tessuto. Scaffold e biomateriali forniscono supporto alle cellule. I fattori ambientali sono le variabili chimiche, fisiche, biologiche e le sostanze che dirigono il comportamento delle cellule. (Da Chiang 2009, modificato).

4.2.1. Le cellule.

L'ingegneria tissutale della cartilagine richiede un gran numero di condrociti per poter creare cartilagine ialina (Mikos, 2006); purtroppo la fonte cellulare costituisce il principale fattore limitante per l'applicazione clinica. Tra i vari tipi di cellule che sono state considerate per l'ingegneria tissutale della cartilagine, i condrociti ottenuti dalla cartilagine ialina sono stati

considerati per molto tempo le cellule di prima scelta (Brittberg, 1994). I condrociti sono infatti le cellule responsabili della produzione della matrice cartilaginea extracellulare (ECM), costituita principalmente da proteoglicani e collagene, che conferisce al tessuto la sua struttura e forza. Queste cellule vengono prevalentemente isolate dalla cartilagine articolare, ma sono state proposte anche altre fonti, come ad esempio la cartilagine nasale (Kafienah, 2002).

Sebbene i condrociti siano stati ampiamente utilizzati per la riparazione della cartilagine, presentano due grandi problemi: la rarità del tessuto del donatore e la loro instabilità in coltura monostrato.

A causa della bassa cellularità della cartilagine infatti, solo un piccolo numero di condrociti autologhi può essere ottenuto direttamente da un individuo. Le cellule possono poi andare incontro a de-differenziazione, caratterizzata da una diminuzione di sintesi dei proteoglicani, da un calo del contenuto di collagene di tipo II e, contemporaneamente, da un aumento di espressione di collagene di tipo I con conseguenze non ottimali dal punto di vista biomeccanico (Kock, 2012). Si è cercato quindi di identificare nuove fonti di condrociti, come ad esempio le cellule pluripotenti indotte (IPC), le cellule mesenchimali stromali (MSC) e le cellule staminali embrionali umane (hESC).

Condrociti autologhi.

L'impianto di condrociti autologhi (ACI) è stato originariamente descritto nei conigli da Grande *et al.* (1989) e successivamente negli esseri umani da Brittberg *et al.* nel 1994. La metodica viene effettuata in artroscopia e utilizza condrociti autologhi che vengono raccolti e posti in coltura monostrato. È una tecnica atta a ripristinare le cellule cartilaginee in difetti condrali a tutto spessore. Il principale vantaggio è la formazione di cartilagine simil-ialina piuttosto che fibrocartilagine a livello del difetto portando a migliori risultati a lungo termine e a una maggiore longevità del tessuto di guarigione. Viene prima effettuata una biopsia di cartilagine articolare sana in artroscopia in una zona dell'articolazione priva di carico; viene poi trattata enzimaticamente in modo da rilasciare i condrociti che vengono successivamente posti in coltura. La tecnica originale prevedeva infine l'iniezione di una sospensione della coltura di condrociti nel difetto condrale, coperto con una flap periostale.

Tuttavia, la procedura presenta una serie di problemi:

- sono necessarie almeno 2 operazioni distanziate da sei a otto settimane: la prima per la biopsia del tessuto, l'altra per l'impianto delle cellule;
- la distribuzione spaziale dei condrociti è spesso non uniforme;
- la mancanza di stabilità meccanica iniziale;
- la sutura del lembo periostale nella cartilagine sana circostante che limita l'utilizzo di questa tecnica al trattamento di piccoli difetti ed esclude il trattamento della cartilagine osteoartrosica;
- la necessità di un'artrotomia per il prelievo di condrociti;
- i condrociti possono andare incontro a ipertrofia;
- limitata disponibilità di condrociti all'aumentare dell'età.

La coltura di condrociti in monostrato per aumentare il numero di cellule si traduce in una diminuzione della capacità di produrre matrice ialina a causa della de-differenziazione cui possono andare incontro (Ahmed, 2009 e 2010).

Nel corso degli anni, ci sono state diverse modifiche della tecnica originale. Si è cercato innanzitutto un sostituto al flap periostale, trovando risultati soddisfacenti con l'uso del collagene (Gooding, 2006; Haddo, 2004; Muellner, 2001; Steinwachs, 2007). Con gli ulteriori progressi tecnologici, i ricercatori hanno avviato l'utilizzo di scaffold o matrici su cui possono essere seminate le cellule. Diversi inconvenienti descritti in ACI sono evitati con l'impianto autologo di condrociti matrice-assistito (MACI). I biomateriali sono risultati essere cruciali per la stabilità temporanea dei trapianti, per semplificare la gestione chirurgica e, aspetto altrettanto importante, per costituire un modello per la crescita spaziale delle cellule.

Il loro fissaggio nel sito dipende dalle proprietà biomeccaniche della protesi, dalla localizzazione e dimensione del difetto ed è garantito da forze di adesione, colla di fibrina o fissazione transossea. In particolare, i polimeri come PLGA (acido poli lattico-co-glicolico) consentono una fissazione stabile anche in difetti di grandi dimensioni senza che sia necessaria la presenza di cartilagine sana attorno al difetto. Questi possono essere fissati direttamente sull'osso subcondrale e hanno un alto potenziale di riparazione anche in articolazioni colpite da OA o artrite. Inoltre, le tecniche di ingegneria della cartilagine articolare con scaffold possono essere effettuate senza flap periostali e, in molti casi, con tecniche artroscopiche; di conseguenza le procedure possono essere eseguite più velocemente e con una minore esposizione del sito chirurgico.

Una ulteriore variante di ACI è rappresentata dalle procedure che utilizzano cartilagine articolare tritata. Studi sperimentali su modello animale e successivi studi clinici hanno dimostrato che cartilagine tritata senza osso o culture cellulari sono in grado di fornire una fonte di cellule per la riparazione cartilaginea (Albrecht, 1983; Lu, 2006). I condrociti di cartilagine tritata migrano dall'innesto, si moltiplicano e formano cartilagine ialino-simile che si integra con il tessuto circostante dell'ospite (Lu, 2006). Sono disponibili prodotti commerciali, come *Denovo NT* (Zimmer, Inc., Warsaw, IN) e *Cartilage Autograft Implantation System* (CAIS, DePuy Mitek Inc., Raynham, MA). *Denovo NT* utilizza frammenti di cartilagine di donatori di organi con età al di sotto dei 13 anni in grado di assicurare un'elevata capacità proliferativa, mentre CAIS utilizza tessuto cartilagineo autologo raccolto intra-operatoriamente e distribuito su uno scaffold di policaprolattone/acido poliglicolico fissato sotto una maglia di polidiossanone. Il trapianto a livello del difetto viene protetto da colla di fibrina. Entrambi i metodi hanno avuto risultati promettenti a breve termine (Farr, 2012).

Mesenchimali.

Le cellule stromali mesenchimali (MSC) sono un sottoinsieme eterogeneo di cellule stromali che possono essere isolate dal midollo osseo, dal tessuto muscolare, dal tessuto adiposo (Guilak, 2010), dalla sinovia e da molti altri tessuti connettivi. Sono caratterizzate dall'espressione di alcune molecole di superficie (CD73, CD105, CD90, ecc) e dalla loro capacità di crescere *in vitro* come cellule fibroblasto-simili. Sono definite cellule stromali anziché cellule staminali, come precedentemente denominate, in quanto le cellule in cui possono differenziarsi sono limitate (Dominici, 2006). Le MCS adulte sono state originariamente isolate dal midollo osseo nel 1999 da Pittenger e collaboratori (Pittenger, 1999), che hanno dimostrato il loro potenziale di differenziazione multilineare o "multi potenza". Studi successivi hanno identificato la presenza di cellule staminali in un certo numero di tessuti adulti, tra cui il tessuto adiposo, il tessuto muscolare, il derma, il periostio, la membrana sinoviale, il liquido sinoviale e la cartilagine articolare. Possono essere espanse in coltura, pur mantenendo la loro multipotenza (Caplan, 2007) e possono differenziarsi in cellule del mesoderma, dando origine a una gamma di tessuti connettivi specializzati compreso il midollo osseo (Arinzeh, 2005; Hong, 2006; Noel, 2002), il tessuto adiposo (Barry, 2004; Helder, 2007), la cartilagine (Caplan, 2007; Noel, 2002; Barry, 2004), il disco

intervertebrale (Richardson, 2007; Trubiani, 2005; Trubiani, 2006), i legamenti (Sonoyama, 2006; Trubiani, 2005; Trubiani, 2006) e il muscolo (Barry, 2004). Le MSC in coltura possono essere indotte a generare condrociti, miociti, adipociti, osteoblasti e tenociti (Pittenger, 1999; Uccelli, 2008).

Bisogna comunque ricordare che cellule staminali mesenchimali ottenute da diverse fonti cellulari esprimono differenti densità e differenti tipi di proteine di superficie (Aicher, 2011), che possono riflettersi nelle differenze notate in alcuni studi tra diverse linee di cellule MSC per quanto riguarda la condrogenesi. Per esempio, un confronto tra cellule stromali derivate da midollo osseo, tessuto adiposo, tessuto muscolare e tessuto sinoviale ottenute dallo stesso individuo ha rivelato che le cellule derivate dal tessuto sinoviale avevano un potenziale di condrogenesi superiore (Sakaguchi, 2005) e producevano nel tempo aggregati cartilaginei di maggiori dimensioni (Shirasawa, 2006) se confrontati con le cellule stromali derivate dal midollo osseo.

L'utilità clinica di questo dato non è chiara, in quanto le MSC derivate dal tessuto sinoviale non sono ancora state utilizzate nell'uomo (Wakitani, 2011) e la composizione cellulare e la presenza di stimoli ambientali adeguati può essere importante quanto l'origine delle cellule.

Le cellule sono ottenute mediante aspirazione del midollo osseo o degradazione enzimatica dei tessuti e quindi messe in coltura. La citometria di flusso può essere utilizzata per selezionare le cellule che esprimono marcatori di superficie noti, per poi essere poste in coltura in condizioni ideali per la differenziazione nella linea cellulare desiderata, in questo caso condrociti (Aicher, 2011).

Recenti studi hanno dimostrato che le MSC possono interagire con le cellule immunitarie, modulando diverse funzioni (Uccelli, 2008). Le proprietà immunomodulatrici delle MSC possono essere sfruttate per il trattamento di condizioni infiammatorie e reumatiche (Djouad, 2009). Le MSC possono migrare verso la lesione dove hanno la capacità di esercitare le proprietà immunosoppressive inibendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie. Possono anche promuovere la riparazione dei tessuti e la sopravvivenza delle cellule danneggiate (Uccelli, 2008).

Le MSC hanno quindi numerose potenziali applicazioni in ingegneria dei tessuti e medicina rigenerativa e possono rappresentare un'opzione interessante per la rigenerazione dell'osso, della cartilagine, dei tendini e dei legamenti. Tuttavia non è ancora stato ben chiarito il tessuto ideale dal quale prelevare le MSC. Attualmente ci sono diversi tipi di cellule staminali mesenchimali che

sono stati proposti come potenziali fonti di cellule per la riparazione della cartilagine: MSC derivate dal midollo osseo, dal tessuto adiposo, dal tessuto sinoviale dal cordone ombelicale/gelatina di Wharton.

La scelta del miglior tipo cellulare per la riparazione della cartilagine dipende dalla disponibilità e dal potenziale di differenziazione condrogenica. A differenza delle cellule derivate dal midollo osseo, adiposo e sinoviale, le cellule staminali mesenchimali derivate dal cordone ombelicale e dalla gelatina di Wharton presentano diversi vantaggi: possono essere facilmente raccolte dai cordoni ombelicali al momento della nascita, presentano alti tassi di proliferazione, sono ipo-immunogeni e non oncogeni.

Nonostante i tanti progressi, non si conoscono ancora i fattori di crescita e le condizioni ottimali di coltura necessari per guidare la differenziazione di cellule staminali mesenchimali verso un fenotipo stabile di condrociti. Non vi è consenso su come le MSC debbano essere isolate, identificate e caratterizzate, e non ci sono linee guida stabilite per il loro uso in applicazioni cliniche. Sono necessarie ulteriori ricerche per aiutare a capire la loro biologia di base, dal momento che gli effetti terapeutici sono suscettibili di essere di breve durata e strettamente correlati alle interazioni con le cellule ospiti (Parekkadan, 2010).

Una migliore comprensione della biologia delle MSC sarà in grado di migliorare le future terapie a base di cellule e strategie di ingegneria tissutale.

Staminali embrionali.

Rispetto alle MSC adulte multipotenti, le cellule staminali embrionali (ESC) hanno caratteristiche di proliferazione illimitata e di differenziazione quasi universale, in quanto possono potenzialmente differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula somatica.

Queste caratteristiche rendono il loro utilizzo molto promettente per la rigenerazione tissutale in organi che, come la cartilagine, richiedono un gran numero di cellule. Ad oggi, studi *in vitro* ed *in vivo* hanno fornito alcune prove di differenziazione condrogenica diretta delle ESC attraverso fattori di crescita.

Per realizzare questo potenziale è necessario stabilire delle procedure che determinino una efficace differenziazione diretta delle cellule pluripotenti nella linea condrogenica. Sono stati riportati diversi protocolli per la differenziazione condrogenica di hESC in varie condizioni, di solito

utilizzando fattori di crescita come BMP-2, BMP-4, TGF- β 1,104 e TGF- β 3,105 o tramite co-coltura con condrociti primari.

La maggior parte degli approcci utilizzano un passaggio intermedio che porta alla formazione di corpi embrionali (EB). Questi contengono cellule provenienti da tutti e tre gli strati germinali embrionali, compresi ectoderma e endoderma, e possono però portare a una differenziazione non-condrogenica delle cellule. Richiedono quindi una selezione cellulare o l'utilizzo della citofluorimetria per isolare i progenitori mesenchimali. Sono state riportate anche procedure in cui vengono utilizzati i passaggi in EB, la co-coltura con altri tipi di cellule, la selezione cellulare o periodi prolungati di coltura in monostrato per ricavare MSC-like dalle hESC, da cui si può poi ottenere una linea condrogenica. Le cellule MSC-simili derivate dalle hESC rappresentano un linea cellulare più primitiva rispetto alle MSC adulte e quindi potrebbero avere un maggiore potenziale di differenziazione.

È importante notare che semplicemente iniettando CSE in un difetto condrale si possono avere effetti collaterali indesiderati. In uno studio condotto da Wakitani *et al.* (2003), le CES sono stati trapiantate nel ginocchio e nello spazio sottocutaneo di topi SCID, per la produzione di cartilagine mediante la differenziazione *in vivo*. Tuttavia si è verificata la formazione di teratomi in entrambe le regioni ed è stato osservata la distruzione dell'articolazione del ginocchio da parte del teratoma. Il tessuto cartilagineo era comunque presente nei teratomi a livello dell'articolazione del ginocchio, il che implica che l'ambiente può alterare la differenziazione delle cellule pluripotenti. Questo studio mette in evidenza la necessità di differenziare CES *in vitro* prima del trapianto *in vivo*. Un metodo per la produzione di condrociti a partire dalle ECS è quello di utilizzare una tecnica di co-coltura mettendo in coltura le ECS indifferenziate su uno scaffold che contiene cellule adulte.

In diversi studi i condrociti sono stati utilizzati per indurre la differenziazione delle CE; in particolare, uno studio ha dimostrato la differenziazione condrogenica promossa da condrociti articolari maturi su uno scaffold biodegradabile.

4.2.2. Biomateriali/scaffolds.

I biomateriali costituiscono una tecnologia di supporto fondamentale a tutte le applicazioni di ingegneria tissutale. Rivestono un ruolo di primo piano nella creazione di scaffolds 3D necessari

per facilitare la crescita dei condrociti e la loro organizzazione, fornendo un supporto meccanico stabile per l'impianto cellulare o per guidare la crescita delle cellule e dei tessuti negli impianti *in vitro* e *in vivo* (Toh, 2011).

È noto che le cellule risiedono, proliferano e si differenziano all'interno di un ambiente tridimensionale. Nella cartilagine articolare i condrociti sono circondati da una abbondante ECM composta da una complessa rete di molecole. Al contrario, i condrociti isolati in ambiente bidimensionale perdono il loro fenotipo differenziato. Il processo di de-differenziazione è accompagnato da uno spostamento verso un fenotipo fibroblasto-simile, con aumento dell'espressione di collagene di tipo I e l'adozione di una forma fusata. Tuttavia, questo processo è reversibile perché i condrociti de-differenziati possono recuperare il loro fenotipo originario quando vengono trasferiti in un ambiente tridimensionale. Questa osservazione conferma che l'ambiente 3D è un fattore fondamentale che riveste un ruolo significativo nel sostenere o ripristinare il fenotipo condrocitico.

Tra i biomateriali si distinguono sostanze conduttive che sostengono la crescita dei condrociti, e sostanze induttive che inducono la differenziazione e il mantenimento del fenotipo cellulare condrogenico.

Lo scaffold ideale deve essere biocompatibile, biodegradabile, permeabile, non citotossico, meccanicamente stabile, in grado di sostenere la crescita dei condrociti, versatile, facilmente reperibile e facile da produrre (Safran, 2008). Inoltre, un'altra caratteristica importante è la porosità, che ottimizza la semina e la differenziazione cellulare e favorisce il passaggio di sostanze nutritive e rifiuti.

Sono stati utilizzati diversi biomateriali sia per la cultura 3D che per l'impianto in articolazione di cellule condrogeniche. Questi biomateriali possono essere classificati in biomateriali naturali, ulteriormente distinti in biomateriali a base proteica e biomateriali a base di polisaccaridi, e biomateriali sintetici e compositi.

Scaffold a base di proteine comprendono collagene, gelatina e fibrina; polimeri di carboidrati includono acido ialuronico, alginato e acidi polilattico/poliglicolici; scaffold sintetici comprendono teflon, fibra di carbonio, dacron e idrossiapatite. I progressi nella chimica e ingegneria dei materiali hanno portato alla creazione di scaffold biodegradabili che permettono l'incorporazione di fattori

bioattivi, peptidi e ligandi, nonché il perfezionamento della velocità di degradazione e delle proprietà meccaniche.

Ad oggi, tra le tipologie di biomateriali più utilizzati per impiantare cellule staminali in pazienti con difetti cartilaginei o artrosi, sono presenti gli idrogel e gli scaffolds solidi a base di polimeri naturali. Gli idrogel sono reti polimeriche costituite da polimeri idrofili reticolati con buona biocompatibilità, elevata permeabilità per l'ossigeno e per le sostanze nutritive, facilità di incapsulamento delle cellule che si traduce in una loro distribuzione uniforme. La fibrina, una proteina coinvolta nella coagulazione del sangue, è stata ampiamente impiegata per incapsulare le cellule (Ho, 2006); viene generalmente utilizzata sotto forma di gel o collanti biocompatibili e biodegradabili. L'acido ialuronico è stato ampiamente adoperato per la sua presenza naturale nella matrice extracellulare e il suo ruolo fondamentale nell'omeostasi cartilaginea (Tognana, 2005). Sono stati ampiamente applicati anche biomateriali a base di collagene per la rigenerazione della cartilagine (Glowacki, 2008), grazie alla forza e alla stabilità di questa proteina della matrice. Possono essere utilizzati sotto forma di gel, membrane, spugne, o *schiuma*. In alternativa, scaffolds tridimensionali solidi a carattere poroso, come la ceramica, possono conferire stabilità meccanica immediatamente dopo l'impianto fornendo impalcature che sostengono la crescita di nuovo tessuto cartilagineo e il riempimento delle lesioni (Guo, 2004; Kandel, 2006). L'integrazione relativamente scarsa dei diversi biomateriali con la cartilagine circostante rimane un problema fondamentale che deve essere risolto per consentire la continuità tra la cartilagine neoformata e quella nativa, la guarigione a lungo termine e un'adeguata competenza biomeccanica.

4.2.3. Fattori di crescita.

L'utilizzo di fattori di crescita è stato proposto a causa degli inconvenienti associati all'uso di condrociti e ad altre fonti cellulari, come la ridotta motilità e la scarsa deposizione della matrice. I fattori di crescita sono un gruppo di polipeptidi biologicamente attivi che possono stimolare la divisione, la crescita e la differenziazione cellulare. Nella cartilagine articolare intervengono durante tutta la vita dell'individuo per regolarne lo sviluppo e l'omeostasi e, poiché la crescita dei condrociti o delle cellule stromali e mesenchimali, è regolata da un'interazione tra stimoli meccanici e chimici, è vantaggioso nell'ingegneria tissutale cartilaginea l'utilizzo di fattori di crescita.

I fattori di crescita sono considerati sostanze condro-induttive, e quelli comunemente associati alla crescita e alla maturazione della cartilagine rientrano in una delle seguenti tre grandi categorie: i Transforming Growth Factor- β (TGF- β), gli Insulin-like Growth Factors (IGFs) e i Fibroblast Growth Factor (FGF) (Williams, 2008; Fortier, 2011). Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP) sono i fattori di crescita più largamente disponibili per l'uso clinico: BMP-4, -6, e -7 hanno dimostrato di promuovere il mantenimento di un fenotipo condrogenico e un aumento della sintesi della matrice cartilaginea (Diekman, 2010).

L'Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) è invece il principale fattore di crescita anabolico della cartilagine articolare e si trova immagazzinato nella ECM legato ai proteoglicani tramite proteine leganti. Con l'aumento dell'attività catabolica, aumenta la proteolisi delle proteine leganti causandone il rilascio (Jones, 1993).

Ad oggi, il Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) è stato ampiamente studiato e identificato in 22 forme diverse. Le cellule espanse in presenza di FGF-2 dimostrano maggiore capacità condrogenica se trasferite in coltura tridimensionale (Buckley, 2012; Diekman, 2010). Il mantenimento di un fenotipo condrocitico è importante per la coltura *in vitro* per prevenire la de-differenziazione, comune nei condrociti coltivati con sistemi bidimensionali e, in aggiunta, per sostenere la deposizione di matrice nel lungo periodo. Nell'utilizzo *in vivo*, ci sono però alcuni svantaggi associati all'utilizzo di bFGF compresa la sua non-specificità. Inoltre, il bFGF da solo non può stimolare la rigenerazione del tessuto cartilagineo dimostrando la necessità di un fattore secondario per sostenere la condrogenesi.

TGF- β è il fattore più comunemente usato *in vitro* (Dickhut, 2010). In particolare, il TGF- β e le sue isoforme (-1, -2 e -3) hanno dimostrato di evocare una risposta condrogenica in cellule progenitrici, come le MSC. Si tratta di un fattore di crescita multifunzionale che modula una serie di attività, come il controllo della proliferazione e differenziazione oltre al mantenimento di un fenotipo condrocitico in cellule differenziate. TGF- β è coinvolto inoltre nell'omeostasi cartilaginea ed è secreto in forma inattiva legato ad un peptide da cui si dissocia prima di diventare attivo e legarsi al suo recettore bersaglio. Gli svantaggi del TGF- β sono i costi relativamente elevati e la potenziale ipertrofia dei condrociti che costituisce un grave problema per la successiva deposizione della matrice. A questo proposito, diversi studi hanno dimostrato che una combinazione di TGF- β con altri fattori di crescita porta ad una maggiore risposta condrogenica

rispetto all'uso del solo TGF- β . A causa della condro-induttanza di TGF- β , la potenziale applicazione terapeutica di questo fattore di crescita nei difetti di riparazione della cartilagine è un argomento che richiede ulteriori indagini.

Altri fattori di crescita che hanno dimostrato una potenziale applicazione in ingegneria tissutale della cartilagine includono i peptidi ormone paratiroideo connessi (PTHrP) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF).

PTHrP è stato utilizzato per le MSC e la coltura di condrociti ed ha determinato un ritardo nella progressione verso l'ipertrofia e l'ossificazione (Guo, 2006). Analogamente a PTHrP, anche PDGF ha dimostrato di migliorare la produzione di matrice cartilaginea da parte dei condrociti e la maturazione endocondrale attraverso l'inibizione dell'attività della fosfatasi alcalina (Kieswetter, 1997). PDGF ha anche dimostrato di stimolare la capacità proliferativa dei condrociti *in vitro* (Brandl, 2010).

Uno dei principali svantaggi nell'utilizzo dei fattori di crescita per la rigenerazione dei tessuti è la possibile formazione di tessuti ectopici o di tumori *in vivo*. Un esempio classico è il BMP-2, approvato dalla FDA per la rigenerazione del tessuto osseo, ha determinato in alcuni casi la formazione di osso ectopico; un altro svantaggio è l'emivita relativamente breve e la loro bassa diffusione. Di conseguenza, sono necessari sistemi di distribuzione che garantiscano il rilascio mirato spazio-temporale dell'agente terapeutico.

Gli scaffolds possono agire come vettori di agenti terapeutici, compresi i fattori di crescita intervenendo direttamente nella modulazione della risposta. Diversi studi hanno sfruttato le proprietà di degradazione degli scaffolds per controllare più precisamente il rilascio dei fattori di crescita in un'area ben determinata, rilascio che può essere ottenuto sottoponendo i biomateriali a stimoli quali pH, temperatura ed attività enzimatica (Lee, 2010; Ulijn, 2007). Una vasta gamma di fattori di crescita è stata impiegata per questo tipo di sistemi provando a incorporare il TGF- β in biomateriali e scaffold per migliorare la loro natura condro-induttiva.

L'integrazione di fattori di crescita su scaffolds è stato ampiamente studiato in TE, sia chimicamente attraverso l'immobilizzazione, sia fisicamente tramite incapsulamento. Il processo è stato ottenuto attraverso la coniugazione covalente dei fattori di crescita sul biomateriale o tramite interazioni secondarie tra il fattore di crescita e il biomateriale. Con l'incorporazione non

covalente, l'assorbimento del fattore di crescita sfrutta l'interazione diretta *charge-to-charge* con il biomateriale (Li, 2009).

L'incorporazione secondaria può permettere l'aggiunta di microparticelle che vengono caricate nel biomateriale con il fattore di crescita desiderato (Buket Basmanav, 2008). Queste sono sempre più utilizzate per la distribuzione dei fattori di crescita quali TGF- β per fornire un maggiore controllo sulla cinetica del rilascio di tali fattori. Micro-particelle sviluppate da PLGA, chitosano, alginato e gelatina hanno dimostrato un grande potenziale per il controllo della distribuzione dei fattori di crescita (Lee, 2004).

Una delle possibilità terapeutiche che sfrutta l'attività dei fattori di crescita è il trattamento con concentrati piastrinici, meglio conosciuti nella forma di plasma arricchito di piastrine o PRP ("platelet-rich plasma"). Il PRP contiene da 3 a 6 volte la concentrazione di piastrine del sangue normale ed è ricco di fattori di crescita contenuti negli alfa granuli presenti nelle piastrine. Tra i "growth factor" presenti nel PRP vi sono PDGF, IGF-1, TGF-B, EGF, bFGF, VEGF ed altre. Introdotto inizialmente in medicina trasfusionale per la cura di patologie ematologiche (quali trombocitopenia, leucemia acuta e severe emorragie a seguito di chirurgia), nel corso degli anni il trattamento con i fattori di crescita è stato impiegato in diversi campi della medicina, in ragione soprattutto della sua versatilità, biocompatibilità e costo ridotto. Recenti studi hanno evidenziato l'efficacia dei fattori di crescita nella condrogenesi e nella prevenzione della patologia degenerativa articolare. Nakagawa *et al* (2007) hanno riportato l'efficacia del PRP autologo *in vitro* per stimolare la proliferazione e la sintesi di collagene di condrociti umani, suggerendo l'impiego di questa metodica nel trattamento dei difetti cartilaginei. In studi su animali Frisbie *et al.* (2007) hanno riportato miglioramenti clinici e istologici in articolazioni artrosiche equine dopo trattamento con PRP autologo intra-articolare. Anitua *et al* (2007) hanno riportato in uno studio clinico che l'impiego di PRP a livello intra-articolare può indurre un incremento della produzione di acido ialuronico e promuovere l'angiogenesi e la proliferazione cellulare .

5. NANOCERIA.

Il termine “*Nanotecnologia*” fu usato per la prima volta da Norio Taniguchi dell'Università di Tokyo nel 1974. Attualmente è un ramo della scienza che si occupa della progettazione, caratterizzazione produzione e applicazione di strutture, dispositivi e sistemi che prevedono il controllo della forma e della misura su scala nanometrica.

Le nanotecnologie nel corso degli anni hanno portato allo sviluppo di “nanomateriali”, materiali che presentano componenti strutturali con almeno una dimensione inferiore ai 100 nm. La fabbricazione e la manipolazione di materiali su scala nanometrica promette nuovi sviluppi per una grande varietà di applicazioni, tra cui la medicina. Nanoparticelle create *ad hoc* possono ad esempio risolvere numerosi problemi di farmaco-efficacia, consentendo una diffusione mirata e il passaggio attraverso barriere biologiche. Altre categorie di nanoparticelle agiscono, invece, direttamente come agente terapeutico, principalmente attraverso un’attività antiossidante. L'effetto antiossidante è fondamentale, dato che qualsiasi patologia, compresi tumori, malattie neurodegenerative o immunodeficienze, determinano uno stress ossidativo a livello cellulare.

Le nanoparticelle di ossido di cerio, note come Nanoceria, sono efficienti spazzini dei radicali liberi e sono considerati come interessante opzione terapeutica.

L’ossido di cerio o ceria, è un composto inorganico del cerio, elemento delle terre rare della serie dei lantanidi. Presenta una struttura cristallina cubica (Patil, 2002) ed è caratterizzato da una elevata stabilità (Kang, 2006), a differenza di altri ossidi delle terre rare quali ossido di zirconio (ZrO_2), biossido di torio (ThO_2) e ossido di bismuto (Bi_2O_3). Questa caratteristica, unitamente alla sua capacità di alternare stati di ossidazione $+3$ e $+4$, rende questo elemento adatto a varie applicazioni in diversi campi: per esempio viene utilizzato come assorbitore di luce ultravioletta, convertitore catalitico per i sistemi di scarico delle automobili, nelle celle solari (Corma, 2004), nel campo dell’ottica (Cuhe, 2009), nei sensori di ossigeno (Yao, 2009; Rangarao, 2003) e in altre applicazioni commerciali e biomediche.

Le proprietà fisiche e chimiche uniche del nanoceria lo rendono un materiale altamente bioattivo che può reagire con le cellule, con micro e macrorganismi, sia come antiossidante, grazie alle sue proprietà di accettore dei radicali liberi, sia come veicolo di farmaci e biosensori (Shcherbakov, 2011).

5.1. APPLICAZIONI BIOMEDICHE.

5.1.1. Attività antiossidante.

Il radicale ossidrilico è uno degli ossidanti più forti ed è in grado di indurre stress ossidativo con conseguenti danni a carico del DNA, delle proteine e dei lipidi, condizioni che possono determinare lesioni a carico di diversi tessuti, sviluppo di tumori e invecchiamento cellulare (Malins, 1996; Walker, 1988). Grazie alla capacità di Nanoceria di alternare stati di ossidazione ⁺³ e ⁺⁴, questo metallo può catalizzare una reazione Fenton-simile con il perossido di idrogeno. Il rapporto di concentrazione di ioni Ce^{3+}/Ce^{4+} in nanoceria è importante per determinare il numero di posti vacanti dell'ossigeno sulla superficie e quindi la capacità di reagire con superossidi e perossido di idrogeno (Celardo, 2011). In virtù di questa capacità, nanoceria è in grado di ridurre la concentrazione di radicali idrossili.

I primi sistemi difensivi dell'organismo contro lo stress ossidativo, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, sono l'enzima superossido dismutasi e la catalasi. Terapie che mimano la loro attività antiossidante sono quindi altamente richieste per il trattamento di malattie che determinano stress ossidativo. Nanoceria presenta attività catalasi - e SOD-mimetica ed effetti citoprotettivi (Heckert, 2008) in preparazioni con alti livelli di Ce^{+} . Oltre alle specie reattive dell'ossigeno (ROS), anche la formazione di specie reattive dell'azoto stimola la produzione mitocondriale di superossido, perossido di idrogeno e perossinitrito provocando danni al DNA e stimolando l'apoptosi cellulare. Studi recenti hanno rivelato che il pre-trattamento con nanoceria di miocardiociti e di cellule progenitrici cardiache determina una significativa inibizione della produzione di H_2O_2 e di ROS indotta dal fumo di sigaretta, deplezione degli enzimi antiossidanti e contenuto intracellulare di glutazione, insieme ad una significativa down-regolazione del fattore di necrosi tumorale α , dell'interleuchina (IL) -1 β , IL-6, e dell'ossido nitrico sintetasi. Questo dimostra come sia una valida opzione terapeutica per il trattamento delle malattie legate al fumo e della cardiomiopatia ischemica nei topi diminuendo i livelli di proteina C-reattiva e delle proteine nitate totali (Niu, 2011; Pagliari, 2012; Niu, 2007). La somministrazione di Nanoceria in modelli animali (ratto), con epatotossicità indotta da Monocrotalina ha portato ad un significativo incremento dell'attività della catalasi epatica e della superossido dismutasi (SOD), dimostrando di essere un efficace agente epatoprotettore (Amin, 2011). In ratti con diabete indotto da streptozotocina

l'utilizzo di una combinazione di nanoceria e selenite sodica ha determinato un significativo miglioramento dei biomarker di diabete tra cui lo stress ossidativo, la compensazione dell'energia (ADP/ATP) e il profilo lipidico (Pourkhalili, 2011). Macrofagi e cellule epiteliali trattati con particelle di nanoceria esercitano un effetto citoprotettivo grazie alle sue proprietà antiossidanti (Xia, 2008).

5.1.2. Attività neuroprotettiva.

Negli ultimi anni, Nanoceria è stata studiata come agente antiossidante con effetti neuroprotettivi inibendo la produzione di ROS e Beta Amiloide ($A\beta$), considerati i principali fattori eziologici e patologici nella promozione di malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer (Butterfield, 2002; Hardy, 2002; Tiwari, 2004).

Studi in vitro (D'Angelo, 2009) hanno confermato le proprietà anti-ossidanti di Nanoceria, dimostrando che questa non agisce solo come semplice agente anti-ossidante, ma sembra regolare anche la trasduzione dei segnali coinvolti nella neuroprotezione, riducendo significativamente il rapporto di nuclei apoptotici (Cimini, 2012). In un altro studio, Nanoceria ha impedito l'insulto ischemico nel midollo spinale di ratti adulti. L'applicazione di una singola dose di Nanoceria in concentrazione nano-molare si è dimostrata biocompatibile e ha fornito un significativo effetto neuroprotettivo sui neuroni del midollo spinale (Das, 2007).

5.1.3. Oculopatie.

Le cellule visive sono continuamente bombardate da fotoni di luce che, insieme all'alto tasso di metabolismo aerobio delle cellule, li espone costantemente a livelli elevati di tossici intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI). Questo aumenta il rischio di malattie da danno ossidativo, tra cui la retinopatia diabetica, la degenerazione maculare e il glaucoma (Yu, 2005; Emerit, 2004; Caldwell, 2003). Chen *J et al* hanno dimostrato che nanoceria è in grado di evitare aumenti delle concentrazioni intracellulari di ROI in colture cellulari primarie di retina di ratto e, *in vivo*, di prevenire la cecità causata dalla degenerazione delle cellule visive indotta dalla luce (Chen, 2006 e 2008). Questi dati indicano che le particelle nanoceria possono essere efficaci nell'inibire la progressione della degenerazione cellulare indotta da ROI, probabilmente coinvolta nella degenerazione maculare, nella retinite pigmentosa e in altre patologie oculari. Pertanto l'uso di

nanoceria come terapia diretta per malattie neurodegenerative potrebbe rappresentare una nuova strategia per la protezione delle cellule visive contro lo stress ossidativo.

5.1.4. Terapia oncologica.

In uno studio *in vitro* condotto su cellule prostatiche neoplastiche, Nanoceria si è dimostrata citotossica nei confronti delle linee cellulari tumorali, mentre non si è osservata alcuna attività tossica nei confronti di linee cellulari sane. Questa selettività del nanoceria può essere sfruttata per la ricerca di opzioni più affidabili per il trattamento dei tumori (Renu, 2012). A differenza di altre nanoparticelle utilizzate in oncologia solo per la somministrazione mirata di proteine o farmaci, Nanoceria agisce anche come agente terapeutico, sia attraverso la sua nota attività antiossidante, sia attraverso una vera e propria azione citotossica nei confronti delle cellule tumorali.

È interessante notare, infatti, che la vitalità e la capacità invasiva delle cellule tumorali tendono a diminuire in presenza di nanoparticelle di ceria, anche a concentrazioni che non sono tossiche per le cellule normali. Le cellule tumorali hanno un pH acido che provoca l'inibizione dell'attività catalasi-simile della nanoceria e l'accumulo di H₂O₂. Questo accumulo distrugge selettivamente le cellule tumorali, ma non le cellule normali, perché a pH fisiologico sia l'attività SOD- che l'attività catalasi-like di nanoceria sono mantenute.

La radioterapia, uno dei metodi più utilizzati per il trattamento delle neoplasie, non è selettiva e provoca danni sia alle cellule neoplastiche sia a quelle normali. Le radiazioni ionizzanti producono infatti una cascata di radicali liberi che danneggia anche le cellule sane in prossimità delle cellule tumorali. In uno studio più recente si è visto che Nanoceria protegge contro le polmoniti radiazione-indotte sia in modelli *in vitro* che *in vivo*. (Colon, 2009).

In un altro studio *in vitro*, Nanoceria ha protetto la linea cellulare mammaria sana dai radicali liberi generati dall'esposizione alle radiazioni, al contrario di quanto è avvenuto invece per le cellule mammarie tumorali (Tarnuzzer, 2005); il trattamento con nanoceria effettuato prima della radioterapia si è dimostrato protettivo nei confronti delle cellule normali.

Un altro aspetto importante in medicina oncologica è il rilevamento affidabile e sensibile dei biomarker tumorali, di fondamentale importanza per la diagnosi e il trattamento delle neoplasie. Nanoceria è in grado di ossidare diversi coloranti a pH acido, come il TMB e il AzBTS: utilizzando

questa capacità, è stato possibile progettare test diagnostici per lo screening dei recettori dei folati (espressi nei tumori) immobilizzando gli anticorpi antirecettori dei folati sulla proteina G coniugata a Nanoceria (Sudimack, 2000).

5.2. NANOCERIA E CARTILAGINE.

Le terapie cellulari, compresa l'ingegneria tissutale, costituiscono una potenziale strategia di riparazione della cartilagine, ancora in fase di studio.

I principali problemi incontrati sono dovuti alla reazione infiammatoria avversa, agli innesti che portano al loro rifiuto, ad una riduzione delle funzionalità o alla scarsa integrazione con i tessuti ospitanti. Per superare questi problemi sono state testate diverse strategie: è stato dimostrato che i preparati coltivati *in vitro* in uno stato parzialmente o completamente maturo e poi impiantati *in vivo* sono in grado di sopportare un ambiente catabolico a livello della regione patologica meglio di un trapianto fresco o di un trapianto non maturo (Francioli, 2011; Lima, 2008). Altri sistemi includono l'applicazione di molecole in grado di combattere l'infiammazione, come il desametasone o cross-linkers esogeni. In alternativa, un approccio *in situ* clinicamente molto promettente consiste nell'inserimento negli impianti di sostanze biocompatibili auto-rigeneranti capaci di allontanare le sostanze reattive, proteggendo la cartilagine dalla risposta infiammatoria. Tale approccio ha il vantaggio di una guarigione più rapida poichè consente la maturazione *in vivo* degli innesti.

Le nanoparticelle di ossido di cerio sono in grado, sia *in vitro* che *in vivo*, di eliminare le sostanze reattive dell'ossigeno (ROS) e le sostanze azotate, di combattere l'infiammazione, di abbassare i livelli di citochine e di assicurare protezione cellulare. L'inibizione di proteine nitate è particolarmente significativa dal momento che queste costituiscono una delle cause più importanti del rigetto degli innesti (Shiraishi, 1995). Nanoceria ha già dimostrato di proteggere diversi tipi di cellule di mammiferi tra cui quelle neurali (Schubert, 2006), retiniche, epatiche (Amin, 2011), epiteliali, cardiache (Niu, 2007), mammarie (Clark, 2011) e cellule epidermiche (Horie, 2011).

Gli effetti di nanoceria in ingegneria tissutale sono stati riportati recentemente in uno studio in cui si è dimostrato che migliorava sia la differenziazione osteoblastica di h-MSC, sia la produzione di collagene (Karakoti, 2010).

È importante sottolineare che nanoceria aiuta a prevenire l'accumulo dei biomarker di stress nitrosativo, come le proteine nitrato, una delle cause principali di rigetto degli innesti.

Ponnurangam *et al* (2014) hanno analizzato l'effetto di Nanoceria come protettore cellulare contro l'esposizione alle citochine in colture di condrociti, valutandone la capacità di combattere l'azione infiammatoria dell'IL-1 α e gli effetti sulla degradazione della matrice.

In conclusione nanoceria agisce positivamente sulla matrice, migliorandone la sintesi e proteggendola dall'insulto enzimatico dell'IL-1 α . Le particelle di Nanoceria (intervallo di concentrazione = 100-1000 mg /mL) incorporate nell'impianto o somministrate attraverso il mezzo di coltura hanno migliorato le proprietà del tessuto.

La presenza di nanoceria durante la coltura *in vitro* dei condrociti può, non solo aumentare la produzione di collagene, ma anche proteggere la matrice extracellulare dalla degradazione causata dall'IL-1 α , tra le citochine maggiormente imputate dell'infiammazione a livello di articolazioni danneggiate, patologiche, o a livello di un sito cartilagineo impiantato, che porta a danni tissutali e alla morte cellulare.

Nanoceria è in grado di migliorare le proprietà meccaniche della cartilagine attraverso una maggiore produzione di collagene e GAG. Lo studio ha dimostrato l'effetto benefico di Nanoceria sulle proprietà biochimiche e meccaniche del tessuto cartilagineo coltivato *in vitro*, con una buona biocompatibilità con il tessuto. Tuttavia, restano ancora da valutare le potenzialità di nanoceria in ingegneria tissutale a livello di cartilagine articolare o nel trattamento di condizioni artritico-simili.

6. IL MODELLO ANIMALE.

Nel 2010, l'American Society for Testing and Materials (ASTM) ha pubblicato la Guida standard per la valutazione in vivo di dispositivi impiantabili destinati a riparare o rigenerare la cartilagine articolare, che includeva le descrizioni e le motivazioni per vari modelli animali. Questa guida introduce e distingue il concetto di “rigenerazione” della cartilagine (la formazione della cartilagine articolare, con proprietà istologiche, biochimiche e meccaniche simili a quelle della cartilagine articolare nativa) dalla “riparazione” della cartilagine (processo di guarigione delle lesioni cartilaginee o loro sostituzione attraverso la proliferazione cellulare e la sintesi di nuova matrice extracellulare) e dalla fibrocartilagine (tessuto cartilagineo disorganizzato con un contenuto anormalmente elevato di collagene di tipo I).

La grandezza critica del difetto è definita come il diametro minimo del difetto che l'animale è incapace di riparare senza un intervento. Per quanto riguarda il condilo femorale, che era la sede primaria raccomandata, ASTM ha suggerito che le dimensioni del difetto non dovrebbero superare il 15% - 20% della superficie articolare, o il 50% -60% della larghezza del condilo, con una profondità variabile da 1 a 10 mm a seconda della destinazione, del modello animale, delle indicazioni e dei controlli utilizzati nello studio.

I modelli animali sono stati per decenni il cardine della ricerca e continuano ad essere necessari per l'approvazione e regolamentazione dell'utilizzo clinico di biomateriali sviluppati su modelli *in vitro*. Nell'uomo il trattamento di lesioni osteocondrali di ampie dimensioni (>2 cm²) sul condilo femorale mediale rappresenta, ancora oggi, una sfida per il chirurgo ortopedico. Nonostante l'impianto di condrociti autologhi costituisca una realtà, sono diversi i limiti della metodica e permangono ancora dubbi sui risultati a distanza.

L'esecuzione di studi *in vivo* su un modello animale rappresenta la fase essenziale per capire sia le problematiche legate al processo di guarigione delle lesioni osteocondrali, sia per verificare gli effetti, a breve e a lungo termine, legati all'impiego di particolari procedure chirurgiche, all'impianto di cellule staminali, di fattori di crescita o di altri scaffold.

La scelta della specie animale rappresenta un momento molto delicato nella definizione del progetto di ricerca perché una scelta inadeguata determina, a fronte di metodiche chirurgiche, istologiche o biomeccaniche di elevato livello specialistico, l'ottenimento di dati che non possono essere traslati in medicina umana, rendendo non comparabili i risultati e inutile la sperimentazione.

Storicamente i modelli animali più comunemente utilizzati nello studio della riparazione cartilaginea sono stati il coniglio, la pecora, la capra, il cavallo e il suino. La metodica chirurgica utilizzata per la riproduzione sperimentale dei difetti condrali non differisce nelle diverse specie se non per le dimensioni della lesione osteocondrale (diametro e profondità), condizionate dalle caratteristiche anatomiche proprie di ciascuna specie. Tutti i modelli citati possono essere considerati adeguati nel valutare la sicurezza e l'efficacia delle strategie di riparazione della cartilagine, mentre differiscono notevolmente i termini e le considerazioni di carattere etico, benessere e gestione dell'animale nel post-operatorio e i costi legati all'acquisto e al mantenimento degli animali.

Roditori.

Il modello murino viene utilizzato prevalentemente nelle prime fasi dei test sui biomateriali. La maggioranza degli studi riguardano modelli di condrogenesi eterotopica mediante impianto di biomateriali sottocutaneo o intramuscolare (Hoemann, 2005; Sato, 2004; Dell'Accio, 2003; Lohmann, 2000), mentre i modelli di difetti articolari sono stati utilizzati in un numero limitato di casi (Dausse, 2003; Oshima, 2005; Lammi, 2001). Tra i vantaggi si possono elencare la facilità di gestione, dal punto di vista logistico ed economico, e la disponibilità di modelli immuno-compromessi utilizzabili per terapie cellulari allogeniche e xenogeniche. Sono tuttavia un modello chirurgico difficile da utilizzare per gli studi sui difetti cartilaginei, in quanto possiedono articolazioni molto piccole e una cartilagine estremamente sottile. L'utilizzo di questo modello animale è quindi limitato a difetti molto piccoli; è estremamente difficile riprodurre nei roditori un modello chirurgico adatto per il confronto con l'uomo.

Coniglio.

Molti studi hanno utilizzato il coniglio come modello per la valutazione della terapia nei difetti cartilaginei. Richiedono una gestione semplice, raggiungono velocemente lo sviluppo scheletrico (9 mesi) e sono relativamente economici. La misura critica del difetto cartilagineo, per evitare la guarigione spontanea, deve essere di 3mm (Trzeciak, 2006, Shao, 2006). Questa dimensione è comunque discutibile a causa di segnalati casi di guarigione spontanea. Difetti più grandi di 4 - 5 mm di diametro sono probabilmente più adatti (Chuma, 2004). Lo spessore della cartilagine femorale a livello del condilo mediale dei conigli è di circa 0,3 mm. In letteratura, la profondità utilizzata più

comunemente nei difetti cartilaginei sperimentali è di 3 mm (Han, 2003; Buma, 2003; Rudert, 2005), in questo modo il 90% della lesione coinvolge l'osso subcondrale.

Da uno studio comparativo sullo spessore articolare della cartilagine del ginocchio di specie animali è risultato che, mentre la componente cartilaginea è simile nei vari studi, le dimensioni del difetto dell'osso subcondrale sono altamente variabili. Questa grande differenza di esposizione dell'osso subcondrale potrebbe portare a un'alta variabilità nei risultati. Le condizioni di carico sono significativamente inferiori rispetto ai grandi animali a causa della maggiore angolazione del ginocchio, del loro peso relativamente leggero (2-4.5 kg) e dell'uso di superfici a carico parziale (come la troclea femorale). Di conseguenza da questa specie derivano valutazioni sulla rigenerazione articolare meno affidabili.

I ricercatori hanno esaminato i difetti cartilaginei in questo modello animale per una media di 16 settimane (range 2-76), non valutando quindi l'efficacia a lungo termine. Il numero medio di conigli utilizzati nei diversi studi è alto (33 con un range compreso tra 6 e 210); la possibilità di utilizzare un gran numero di soggetti fenotipicamente simili è un vantaggio di questo modello animale rispetto ad altri (Rudert, 2002).

Si deve comunque prestare attenzione durante la progettazione dello studio e l'interpretazione dei risultati a causa della potenziale guarigione spontanea e delle particolari condizioni di carico del peso.

Tuttavia, con le dovute considerazioni, il coniglio è un modello utile, soprattutto nella valutazione delle fasi iniziali di una terapia.

Cane.

Gli studi che coinvolgono il cane sono sottoposti ad attento esame da parte dei Comitati Etici in quanto animali da compagnia, elemento che ne limita l'impiego. Lo spessore della cartilagine del condilo femorale mediale è compresa tra 0,9512 e 1,3 mm (An, 1999). I diametri dei difetti utilizzati negli studi hanno un range compreso tra 2 a 10 mm, ma quello di più comune utilizzo è di 4 mm (Breinan, 2001; Cook, 2003; Van Dyk, 1998; Lee, 2003; Nehrer, 1998). Lo spessore della cartilagine permette la creazione di difetti chirurgici che coinvolgono esclusivamente la cartilagine articolare, senza interessamento dell'osso subcondrale. Tuttavia, la maggior parte degli studi ha comunque utilizzato difetti osteocondrali. Il volume medio di questi difetti cartilaginei è notevolmente

inferiore a quello dei difetti umani segnalati. Van Dyk nel 1998 ha utilizzato un difetto estremamente grande (10mm di diametro e 10mm di profondità), producendo un difetto cartilagineo di 55mm³ di volume, comunque considerevolmente più piccolo rispetto alla media delle lesioni nell'uomo. Questo dimostra che il modello canino è più adatto per la creazione di piccoli difetti.

Un vantaggio è invece la possibilità di valutare artroscopicamente l'articolazione del ginocchio, rendendo possibile quindi la successiva visualizzazione macroscopica e l'eventuale biopsia dei difetti senza ricorrere all'eutanasia.

I difetti utilizzati in questo modello animale sono perlopiù localizzati nella troclea femorale (Breinan, 1997 e 2001), nel condilo femorale mediale (Cook, 2003) o in entrambi i condili contemporaneamente (Shortkroff, 1996). Una difficoltà a cui si va incontro utilizzando il modello canino è quella di ottenere soggetti scheletricamente maturi, perché questa specie raggiunge una maturità scheletrica a 12-24 mesi di età.

In conclusione il cane è un modello utilizzabile per la sperimentazione preclinica grazie ad una anatomia e condizioni di carico simili all'uomo, alla possibilità di creare difetti che coinvolgono solo la cartilagine e di valutare successivamente l'articolazione in artroscopia. Inoltre, i cani sono facilmente addestrabili al tapis-roulant e quindi sono adatti per studi sul movimento durante l'attività fisica.

Pecora.

La pecora è un modello comunemente impiegato poiché si tratta di una specie facilmente reperibile, facile da maneggiare e relativamente poco costosa. Inoltre, l'anatomia del ginocchio è simile a quella umana. Un ulteriore vantaggio è la possibilità di eseguire controlli artroscopici che, a causa della presenza di un grande cuscinetto adiposo e del grado di flessione necessario per poter visualizzare i condili femorali, necessita di grande esperienza.

La pecora possiede una cartilagine articolare di spessore variabile. Lu afferma che lo spessore cartilagineo varia da 0,4 a 1 mm, Frisbie riporta uno spessore di 0,45 millimetri (Frisbie, 2006) mentre i testi di riferimento suggeriscono uno spessore medio della cartilagine del condilo femorale di 1,68 millimetri (An, 1999). Il volume del difetto che coinvolge la cartilagine e l'osso subcondrale

hanno quindi un'ampia variabilità individuale e questo potrebbe produrre risultati variabili all'interno dello studio.

Pearce nel 2001 ha utilizzato un grande difetto di 15 mm di diametro che può produrre un difetto cartilagineo di 170 mm³ di volume, volume simile al valore più basso del range nell'uomo.

I difetti cartilaginei di grande dimensione sono associati a difetti di volume totale elevato. Inoltre, questi difetti coinvolgono per un'alta percentuale (> 90%) l'osso subcondrale.

Un altro svantaggio è la caratteristica dell'osso subcondrale che si presenta molto denso e duro: questo spesso impedisce di riprodurre un difetto osseo con l'utilizzo di un punch, a meno che non si utilizzino tecniche di foratura del difetto complicando la scelta di modelli sperimentali, soprattutto per le terapie che richiedono un sanguinamento dell'osso subcondrale.

Le dimensioni medie del difetto cartilagineo nel femore distale sono di 7,4 millimetri di diametro (range compreso tra 2 e 15), mentre la dimensione critica del difetto è stata individuata nei 7 mm. La posizione della lesione sperimentale nel modello ovino ha coinvolto il condilo mediale femorale, entrambi i condili (Siebert, 2003; Tibesku, 2004) e la troclea femorale (Kandel, 2006). In media nei diversi studi sono state utilizzate 18 pecore (range 4 - 40), con una durata media dello studio di 21 settimane (range 2-78).

La maturità scheletrica viene raggiunta ai 2-3 anni di età. In letteratura comunque, le pecore vengono comunemente indicate come adulte senza una età precisa di riferimento.

In conclusione, la pecora è un modello facilmente accessibile per testare i difetti della cartilagine, però presenta alcune limitazioni costituite dalla variabilità dello spessore cartilagineo, dalla frequente presenza di una componente subcondrale nel difetto e dalla tarda maturità scheletrica.

Capra.

La capra è un modello animale comunemente utilizzato in ortopedia. L'articolazione femoro-tibiale permette esami artroscopici nel follow up (Brehm, 2006), la cartilagine ha uno spessore adeguato e un'anatomia articolare simile a quella dell'uomo.

Lo spessore della cartilagine descritto è di 0.8, 1.1, 1.2 e 2 mm di spessore per il condilo femorale mediale. Un vantaggio dello spessore della cartilagine in questa specie è la possibilità di creare difetti parziali o completi a seconda di ciò che si desidera e questo non è ottenibile in modelli animali più piccoli. Gli studi pubblicati sono perlopiù basati su difetti osteocondrali. Il 95% dei difetti

della cartilagine nell'uomo non coinvolgono l'osso sub condrale, di conseguenza la possibilità di riprodurre difetti a spessore parziale è molto importante per il confronto con l'uomo. L'osso subcondrale è più morbido rispetto alle pecore e le comuni tecniche chirurgiche per creare difetti osteocondrali possono essere applicate con successo.

La proporzione tra cartilagine e osso subcondrale nelle capre è più simile alla situazione umana rispetto ai modelli precedentemente citati . Difetti cartilaginei di 150 mm³ possono essere prodotti tramite un difetto di 12 mm di diametro.

Nonostante questo valore sia nel range inferiore dei comuni difetti cartilaginei umani, questi possono consentire una cauta correlazione tra le conclusioni degli studi sulla capra e le aspettative in campo umano. Questa specie è quindi adatta come modello per la creazione di difetti cartilaginei di piccole dimensioni. D'altra parte, un limite degli studi pubblicati, è l'utilizzo di difetti coinvolgenti l'osso sub condrale, situazione che è notevolmente diversa da quella umana.

I diametri dei difetti cartilaginei vanno dai 4,5 ai 12 mm; il più frequentemente riportato è di 6 mm. È stato riportato che i difetti cartilaginei di 3 mm di diametro guariscono spontaneamente, mentre quelli con una dimensione di 6mm di diametro non presentano guarigione a distanza di 6 mesi (Jackson, 2001).

I difetti della cartilagine femorale hanno coinvolto i condili laterale, mediale e la troclea. Il numero medio di animali utilizzati è di 14 (range 6-32) con un'età media di 35 mesi (range 18-72). Le capre sono state comunemente seguite sino alle 26 settimane (range 2-104).

La maturità scheletrica è simile a quella della pecora (2-3 anni di età), così come la gestione e i costi. La capra è un modello animale relativamente robusto e flessibile che può essere usato per gli studi su piccoli difetti della cartilagine. Secondo la nostra esperienza però la capra, perlomeno quella sarda, è un animale di difficile gestione in quanto mal tollera la stabulazione in box e tende a fenomeni di auto-traumatismo sulla ferita chirurgica: per questo non è stata considerata da noi una specie adatta.

Suino.

Il maiale non è comunemente usato come modello per la ricerca sui difetti cartilaginei per le sue grandi dimensioni, la difficile gestione e la stabulazione dell'animale adulto.

Questi problemi possono essere risolti utilizzando maialini nani. Un potenziale vantaggio nell'utilizzo di questa specie è lo spessore della cartilagine. Chiang (2005) e Frisbie (2006) hanno riportato uno spessore cartilagineo di 1,5 mm e Hembry (2001) di 2,0 mm nel condilo femorale mediale. Ciò consente la produzione di difetti a spessore parziale o totale; questa caratteristica è stata utilizzata per studiare le terapie di difetti parziali dello spessore cartilagineo creando un modello più vicino a quello umano rispetto ai modelli precedentemente descritti.

La FDA afferma che i maialini nani raggiungono la maturità scheletrica da 42 a 52 settimane. Una ricerca di Vasara (2006) ha riferito che i difetti cartilaginei di 6 mm guariscono spontaneamente nei maiali immaturi. Harman *et al.* (2006) considerano 6 mm la dimensione critica del difetto nei maiali adulti. È quindi importante che vengano utilizzati gli animali adulti per ridurre al minimo la guarigione spontanea della cartilagine. Le lesioni sono state create nella troclea femorale, nel condilo femorale mediale e in entrambi i condili.

Cavallo.

Il cavallo, tra i modelli animali a disposizione è il più grande, ma anche per questa specie, considerata da compagnia, le questioni etiche rappresentano un fattore limitante.

I cavalli non sono in genere allevati per scopi di ricerca biomedica ed è quindi difficile ottenere, senza notevoli spese, un numero di soggetti adeguato per uno studio omogeneo.

I cavalli che vengono ritirati dalle carriere sportive sono spesso disponibili, ma richiedono uno screening per patologie muscolo-scheletriche pre-esistenti. D'altra parte, poiché il cavallo è un animale longevo e atletico, risulta essere un modello interessante per valutare le terapie in difetti cronici. Inoltre, la possibilità di esercizio postoperatorio consente la valutazione della riparazione in severe condizioni di carico.

Lo spessore della cartilagine del cavallo è approssimativamente di 1.75-2 mm per il condilo femorale mediale che risulta essere simile a quello della cartilagine umana, di 2.2 mm.

Le grandi dimensioni del cavallo permettono il controllo artroscopico a medio-lungo termine; lo spessore della cartilagine permette di creare difetti a spessore parziale o totale che possono essere prodotti con dimensioni e proporzioni che rispecchiano maggiormente la situazione umana (Strauss, 2005; Frisbie, 1999; Bertone, 2005; Litzke, 2004; Barnewitz, 2006). Gli studi sul cavallo hanno storicamente utilizzato difetti cartilaginei notevolmente superiori alla dimensione critica; possono

infatti essere creati difetti cartilaginei di 350 mm³ senza coinvolgimento dell'osso subcondrale. Dei modelli animali trattati, il cavallo è senz'altro il più simile ai difetti cartilaginei dell'uomo e i risultati ottenuti da questo modello possono essere applicati alla pratica clinica umana. Se da un lato fornisce un modello in cui le dimensioni dei difetti possono essere correlate allo scenario clinico umano, dall'altro il carico articolare è comunque elevato poiché, nonostante il confinamento, non può essere totalmente minimizzato come nel paziente umano.

La selezione del sito anatomico in cui creare il difetto è un aspetto critico ed è importante considerando il notevole carico avere aspettative realistiche per i risultati.

La troclea laterale del femore è il sito più comunemente utilizzato per i difetti cartilaginei.

Difetti sono stati creati anche nel condilo laterale dell'articolazione metacarpo-falangea (Barnewitz, 2006) e nell'osso centrale del carpo (Hurtig, 1998). In conclusione, nonostante il cavallo sia sicuramente l'animale più interessante per l'anatomia articolare e la morfologia cartilaginea, è necessario tenere conto del severo carico delle articolazioni.

Nel nostro studio la scelta del modello animale è ricaduta sull'ovino, in quanto l'anatomia del ginocchio è simile a quella umana; si tratta inoltre di una specie facilmente reperibile nel nostro territorio, con bassi costi di acquisto e mantenimento e gestibile senza difficoltà anche nel post-operatorio.

Per effettuare la lesione è stato scelto il condilo femorale mediale poiché il carico dell'arto è distribuito maggiormente nel comparto mediale del ginocchio così come nell'uomo.

7. MATERIALI E METODI

Il lavoro sperimentale ha visto l'utilizzo di 45 ovini, di razza sarda, femmine, di età adulta, di peso medio di 38 kg, clinicamente esenti da patologie muscolo-scheletriche. Gli animali sono stati sottoposti, in regime di anestesia generale, a miniartrotomia dell'articolazione del ginocchio ed a lesione sperimentale.

Sono stati suddivisi in 4 gruppi, destinati a diversi trattamenti:

- Gruppo A: 10 animali, trattati con cellule staminali embrionali (ES-like)
- Gruppo B: 15 animali, trattati con microfratture e *Platelet Rich Plasma* (PRP)
- Gruppo C: 10 animali, trattati con microfratture e *Autologous Conditioned Plasma* (ACP)
- Gruppo D: 10 animali, trattati con Nanoceria.

PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO

Il protocollo anestesio logico ha previsto, per tutti gli animali, una premedicazione con la somministrazione di Fentanil e.v. 5 µg/Kg (Fentanest[®] 0,1 mg/2ml - *Pfizer*) e Diazepam e.v. 0,3 mg/Kg (Valium[®] 10 mg/2ml - *Roche*). Con l'animale in decubito sternale è stata quindi effettuata un'anestesia epidurale a livello sacro-coccigeo, mediante inoculazione di Lidocaina 2 mg/kg (Lidocaina[®] 2%, 20 mg/ml - *Pfizer*) con ago spinale Quincke 22G. Dopo 15 minuti dalla premedicazione è stata effettuata l'induzione dell'anestesia generale con Lidocaina e.v. 1 mg/Kg (Lidocaina[®] 2%, 20 mg/ml, *Pfizer*) e Tiopentale e.v. 5 - 7 mg/Kg (Pentothal Sodium[®] 1 g/50 ml - *MSD Animal Health*) per consentire l'intubazione del soggetto.

L'anestesia generale è stata mantenuta con Sevofluorano (Sevo Flo[®] - *ABBOTT*) con valori di EtSevo prossimi al 1,5%, in O₂ 0,8 l/min, in ventilazione meccanica a controllo volumetrico (Fabius GS – *Dräger*) con frequenza respiratoria 12 atti/minuto e volume tidale adatto a mantenere EtCO₂ a 37 - 42 mmHg (Infinity Delta – *Dräger*). Per tutta la durata dell'intervento chirurgico è stata effettuata una infusione di NaCl 0,9% alla dose di 10 ml/Kg/h.

TECNICA CHIRURGICA

Gli animali sono stati posizionati in decubito dorsale e sottoposti ad artrotomia a carico dell'articolazione del ginocchio per esporre la superficie articolare di carico dei condili femorali.

Dopo accurata disinfezione e preparazione del campo operatorio, l'arto è stato posizionato con il ginocchio in massima flessione per favorire lo scivolamento verso il basso della rotula. Con una lama di bisturi n°11, in corrispondenza del lato mediale del legamento tibio-rotuleo ed in corrispondenza della convessità del condilo femorale mediale, facilmente palpabile per via transcutanea, è stata eseguita un'incisione a tutto spessore della lunghezza di 5 mm. Eseguita l'incisione, è stato posizionato un primo divaricatore autostatico di Gelpi in direzione disto-proximale, mentre un secondo divaricatore è stato posizionato ortogonalmente al primo. Sfruttando l'elasticità dei tessuti e l'azione dei divaricatori di Gelpi, è stato possibile esporre una superficie di condilo femorale pari a circa 1 cm² (Fig.1).



Fig 1. Miniartrotomia

È stato quindi creato un difetto osteocondrale sulla superficie di carico del condilo femorale mediale del ginocchio sinistro. La lesione sperimentale deve presentare una dimensione tale da contrastare efficacemente la guarigione spontanea: la *critical size* per l'ovino è pari a 6 mm di diametro, con una profondità pari a circa 2 mm, di forma cilindrica, a margini netti, localizzata sull'area di carico del condilo femorale.

Per standardizzare la lesione, è stato utilizzato un punch per trapianto osteocondrale del diametro di 6 mm che, poggiato sulla superficie articolare e ruotato delicatamente in senso orario e antiorario, ha delimitato i limiti del difetto. Il tessuto cartilagineo all'interno dell'area è stato asportato tramite fresa con punta cilindrica e rifinito con una curette per osso fino ad una profondità di circa 2 mm. È stata rigorosamente rispettata l'irrigazione continua con NaCl 0,9%

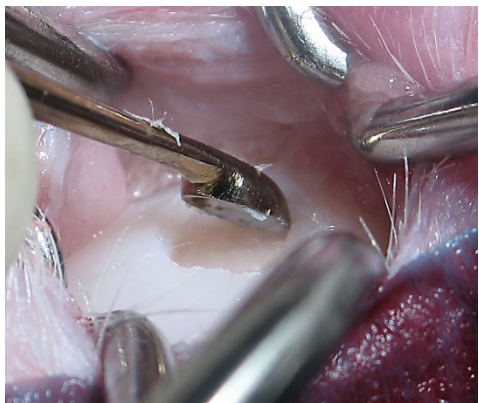
per evitare il riscaldamento della cartilagine nell'area in cui si impiegava la fresa e l'essiccamento di tutta la superficie articolare esposta all'aria (Fig. 2).



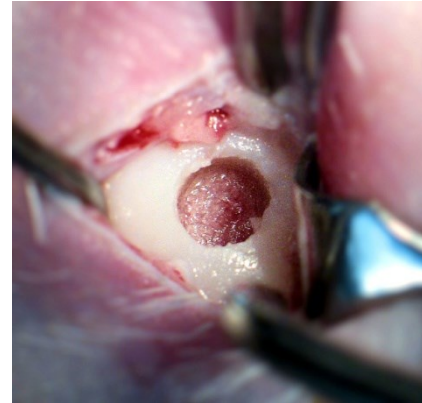
Delimitazione lesione mediante punch.



Fresa.



Courettage con cucchiaio.



Letto lesione con gemizio

Fig 2 . Confezionamento lesione sperimentale

La ricostruzione è avvenuta *lege artis* con la sutura in piani distinti della capsula articolare e della cute in monofilamento riassorbibile sintetico (Monocryl U.S.P 4/0).

TRATTAMENTO POST OPERATORIO

Tutti gli animali hanno ricevuto Amoxicillina IM (40 mg/kg/die) e Ketoprofene IM (2 mg/kg/die) per i primi 5 giorni dopo l'intervento. I soggetti sono stati stabulati in piccoli recinti per i primi 10 giorni post operatori per limitarne il movimento e quindi rimessi al pascolo sino all'eutanasia.

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

Gli interventi sono stati eseguiti nel rispetto della normativa per il benessere e la sperimentazione animale.

Tutti i soggetti sono stati valutati dal punto di vista clinico quotidianamente durante la prima settimana dopo la chirurgia; in seguito alla rimozione dei punti cutanei la valutazione clinica degli animali è avvenuta una volta a settimana sino all'eutanasia, effettuata a 6 e 12 mesi.

GRUPPO "A": CELLULE EMBRIONALI

OBIETTIVO: valutare la capacità condrogenica di cellule staminali derivanti da embrioni di pecora prodotti *in vitro*, inoculate in difetti cartilaginei.

PRODUZIONE DEGLI EMBRIONI IN VITRO E VITRIFICAZIONE

Cento embrioni allo stato di blastocisti sono stati prodotti in seguito alle fasi di maturazione *in vitro*, fertilizzazione, coltura e vitrificazione, come descritto da Dattena *et al.* (Dattena, 2007). Gli oociti raccolti in macello sono stati maturati in TCM199 con 4mg/ml di BSA, 100 mM di cisteamina e 1mg/ml di estradiolo-17 β , 0.1UI/ml di r-FSH e 5mg/ml di LH ipofisaria. Dopo fecondazione *in vitro* con seme di ariete, gli zigoti sono stati coltivati *in vitro* per 6 giorni. Le blastocisti sono state quindi vitrificate in soluzione di glicole etilenico 10% (EG) e DMSO 10% per 5 minuti, poi in EG 20%, DMSO 20% e 0.5M di soluzione di saccarosio per <45s. Gli embrioni sono stati incubati per 24h a 39° in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Sono stati raccolti solo gli embrioni riespansi.

Per verificare che il tessuto rigenerato provenisse dalle cellule staminali impiantate, sono stati utilizzati solo embrioni maschi; per la loro selezione è stata utilizzata la sequenza SRY presente solo nel cromosoma Y. Il sessaggio è stato eseguito mediante una duplex PCR con i primer per i geni SRY (presenti solo nel maschio) e SAT, presente in entrambi i cromosomi.

ISOLAMENTO ES-LIKE, COLTURA, SESSAGGIO E CARATTERIZZAZIONE.

La zona pellucida degli embrioni riespansi è stata rimossa mediante pronasi; gli embrioni sono stati identificati numericamente prima di essere sottoposti a immunochirurgia mediante lisi del trofoblasto per isolare così l' "inner cell mass" (ICM). Ogni ICM è stato disaggregato con una pipetta sottile in vetro in 2-3 ammassi cellulari per poi essere coltivata in pozzetti separati numerati per 5-6 giorni (Dattena, 2005). Per salvaguardare l'ICM, il sessaggio è stato effettuato sulle cellule del trofoblasto liberate durante l'immunochirurgia di ciascun embrione.

Le colonie di cellule embrionali (EC) sono state caratterizzate mediante identificazione di antigeni di superficie per la staminalità, in accordo con Dattena *et al.* (2005). Le colonie sono state lavate in PBS e fissate con metanolo a -20°C per 5 minuti, risciacquate ancora con PBS e lasciate 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione bloccante di PBS con BSA al 2%. I marker di antigeni specifici per i vari stadi embrionali SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4, anticorpi anti-citocheratina,

mesoderma precoce (Fenderson, 1988), miosina embrionale (Cho, 1993) e precursore neuronale specifico (DSHB) (Tole, 1995) sono stati individuati nelle colonie mediante immunocitochimica.

Su 100 embrioni vitrificati che sono stati riscaldati, 80 sono stati riespansi, ne sono stati selezionati 75 di alta qualità e, tra questi ultimi, 40 (53%) sono risultati essere maschi alla PCR. Le ICM sono state disaggregate in due o tre cluster di cellule e circa 200 cluster sono stati seminati per produrre linee cellulari ES-like. Dopo 5-6 giorni di coltura, sono state ottenute 70 colonie (35%) ES-like. Tuttavia, solo 35 (50%) colonie sono state identificate come maschili e utilizzate per gli innesti.

PREPARAZIONE DELL'INNESTO.

Per ciascun innesto sono state isolate e unite 2-3 colonie di ES-like di sesso maschile, dopodiché sono state disaggregate con tripsina 0.05%, EDTA 0.02% e pipettaggio vigoroso. Dopo risospensione in 500 µl di DMEM le cellule disaggregate sono state contate nella camera di Thoma e centrifugate a 5500 rpm per 3 minuti a temperatura ambiente. Circa 500.000-700.000 cellule sono state incorporate in 60 µl di colla di fibrina prima del trasferimento nel difetto cartilagineo.

TRATTAMENTO.

Il difetto cartilagineo sul condilo mediale del ginocchio sinistro ha ricevuto una miscela contenente fibrinogeno e circa 500.000-700.000 cellule ES-like, polimerizzata *in situ* con trombina Ca-attivata (ES) (Fig. 3). Due difetti identici sui condili mediale e laterale del ginocchio destro sono serviti come controlli: il difetto mediale non è stato trattato (*empty defect*, ED), mentre il difetto nel condilo laterale è stato riempito solo con colla di fibrinogeno (G).

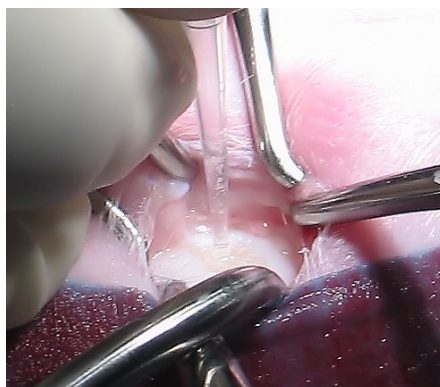


Fig.3. Somministrazione ES-like con colla di fibrina.

GRUPPO “B”: MICROFRATTURE + PRP.

OBIETTIVO: valutare l'effetto del *Platelet Rich Plasma* (PRP) in combinazione con le microfratture nel trattamento dei difetti condrali. L'ipotesi dello studio è che il PRP possa migliorare la risposta riparativa di difetti condrali in associazione a una tecnica di stimolazione midollare, le microfratture.

PREPARAZIONE PRP.

Il PRP è stato preparato prelevando 60 ml di sangue autologo da ogni animale prima dell'induzione dell'anestesia. Il sangue è stato centrifugato a 2400 rpm per 3 min, il precipitato è stato separato e il surnatante centrifugato a 3000 rpm per 12 min. Il precipitato è stato quindi raccolto ottenendo 6-8 ml di PRP liquido che è stato utilizzato per l'iniezione intra-articolare nel terzo gruppo. Il PRP gel è stato preparato aggiungendo, a 6 ml di PRP liquido, 2 ml di una soluzione di gluconato di calcio (1 g/10 ml) e 2 ml di colla di fibrina (costituita da una combinazione di fibrinogeno e trombina).

In un precedente studio pilota, la procedura di centrifugazione del sangue delle pecore è stata ottimizzata per ottenere la massima concentrazione delle piastrine. Sulla base di questo studio, abbiamo scelto la metodica con il miglior rapporto tra quantità e concentrazione piastrinica. A conferma di questo risultato, 1 settimana prima dell'intervento chirurgico, sono stati prelevati da cinque animali 60 ml di sangue autologo per la preparazione del PRP, secondo il metodo descritto, ed è stato eseguito il conteggio delle piastrine. Un campione di 5 ml di sangue intero è stato poi raccolto dagli stessi animali ed è stata eseguita un'analisi della conta piastrinica. Ciascun campione è stato testato utilizzando un analizzatore ematologico digitale (Advia 120 Hematology Analyzer; GMI Inc., Ramsey, MN) e la concentrazione media delle piastrine (SD) è stata valutata in PRP e sangue intero. Per confrontare la concentrazione media piastrinica tra PRP e sangue intero è stato usato un test non parametrico (Mann-Whitney U-test). L'analisi dei dati ha mostrato una concentrazione di piastrine nel PRP 4 volte superiore rispetto al sangue intero con una differenza altamente significativa ($P < 0,0001$).

TRATTAMENTO.

Dopo 12 mesi dalla creazione della lesione, è stata eseguita una seconda chirurgia. Previa preparazione del campo operatorio, si è effettuata una miniartrotomia e identificata la lesione del primo intervento, il difetto è stato curettato per ristabilire il diametro originale. Si è avuto cura di rimuovere lo strato calcificato della cartilagine lasciando intatto l'osso subcondrale. Sono state eseguite quindi 5 perforazioni della profondità di 5mm mediante l'utilizzo di fili di Kirshner da 1.5mm.

Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi (cinque animali per ogni gruppo), a seconda della tecnica di riparazione. Nel gruppo 1 le microfratture non sono state supportate da altro trattamento (Fig.4). Nel gruppo 2, è stato posto sulla lesione il PRP gel, perfettamente adattato alla dimensione del difetto e sigillato lungo i confini con colla di fibrina (Tissucol, Baxter bio-chirurgia, Baxter International Inc., Deerfield, IL) (Fig.5). Nel gruppo 3, sono stati iniettati in articolazione 5 ml di PRP liquido, dopo aver provveduto alla sutura della ferita chirurgica (Fig.6).



Fig.4 Microfratture

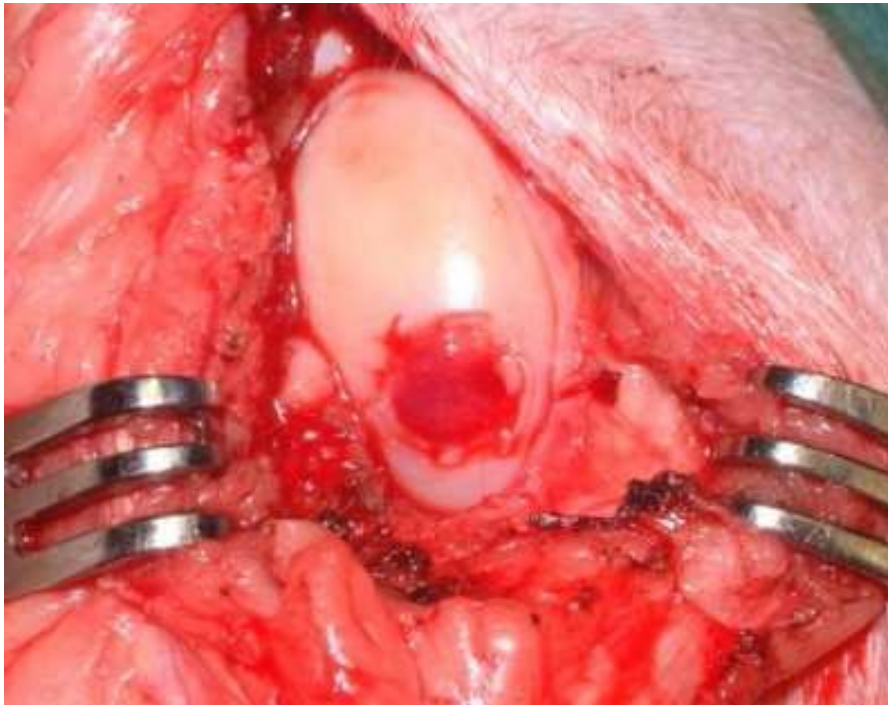


Fig.5 Microfratture + PRP gel



Fig.6 Microfratture + PRP liquido

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

GRUPPO “C”: MICROFRATTURE + ACP.

OBIETTIVO: valutare l'effetto dell'applicazione locale dell'*Autologous Conditioned Plasma* (ACP) nel trattamento delle lesioni condrali a tutto spessore del ginocchio. L'Autologous conditioned plasma (ACP) è un prodotto emoderivato che contiene un'elevata concentrazione di piastrine e che può avere un potenziale effetto nel trattamento delle lesioni condrali mediante il rilascio *in situ* di fattori di crescita piastrino-derivati.

PREPARAZIONE ACP.

L'ACP è stato preparato con un apposito kit sterile con doppia siringa (Arthrex). Sono stati prelevati 10 ml di sangue da ciascun animale e immediatamente centrifugati a 1300 rpm per 5 minuti. Il surnatante, costituito da circa 3 ml di ACP liquido, è stato raccolto e utilizzato per le iniezioni intra-articolari.

TRATTAMENTO.

Dopo il confezionamento della lesione, sono state eseguite 5 perforazioni con filo di Kirshner da 1,5 mm, martellato nell'osso subcondrale. La profondità dei fori è stata standardizzata contrassegnando il filo a 5 mm dalla sua punta.

Gli animali sono stati divisi in due gruppi: 5 animali hanno ricevuto, dopo il trattamento chirurgico, 5 iniezioni intra-articolari nell'arto operato (la prima 24 h dopo la chirurgia e le altre ogni 7 gg per 4 settimane); nel secondo gruppo (5 animali) sono state eseguite solamente le microfratture.

GRUPPO “D”: NANOCERIA.

OBIETTIVO: valutare l’influenza dell’effetto anti-infiammatorio di Nanoceria nella riparazione spontanea di difetti cartilaginei indotti sperimentalmente.

TRATTAMENTO.

Dopo il confezionamento delle lesioni sui condili femorali mediali di entrambe le articolazioni e la ricostruzione per piani, si è proceduto ad iniettare nell’articolazione destra Nanoceria (Ossido di Cerio in 0,5 ml di soluzione fisiologica alla concentrazione di 480 µg/ml). L’articolazione controlaterale (sinistra) dello stesso animale ha ricevuto 0,5 ml di soluzione fisiologica 0,9%.

In questo gruppo non è stata effettuata la terapia antiinfiammatoria per evitare possibili interferenze con l’attività di Nanoceria.

VALUTAZIONI.

I campioni di tutti i gruppi sono stati sottoposti ad analisi macroscopiche, biomeccaniche, istologiche, immuno-istochimiche ed ultrastrutturali per la valutazione del rigenerato e della sua integrazione con i tessuti vicini.

ANALISI BIOMECCANICHE.

Abbiamo effettuato test comparativi biomeccanici tra cartilagine intatta e tessuto rigenerato utilizzando un indentatore elettromeccanico, l'Artscan 200. L'apparecchio è costituito da un'asta di misurazione munita di manipolo; la parte terminale dell'asta presenta una superficie piatta e inclinata che termina con una dentellatura cilindrica. Durante l'esecuzione del test, la parte terminale dell'Artscan è stata applicata sull'area di cartilagine articolare da esaminare, così da permettere al sensore cilindrico di ricevere il segnale di deformazione costante della cartilagine. La resistenza alla deformazione del tessuto viene rilevata con un sistema di trasduttori ed elaborata in un grafico attraverso un software (Fig. 7)

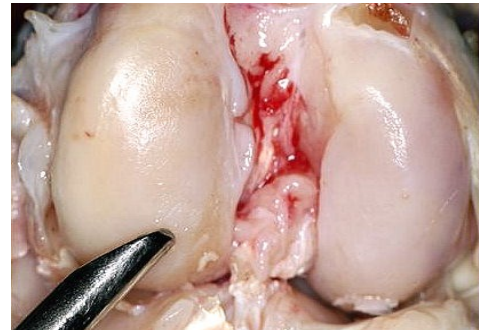
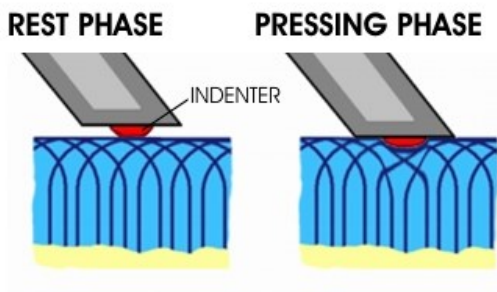


Fig .7 A. Fase di riposo e fase di pressione : anche minime variazioni possono essere misurate oggettivamente.

Fig.7 B Applicazione dell'indentatore sulla superficie cartilaginea

VALUTAZIONE MACROSCOPICA.

Il tessuto di riparazione è stato esaminato da due osservatori in cieco. Nel gruppo A è stato utilizzato un sistema semiquantitativo con punteggio massimo 9 (Tab.1), nei gruppi B e C lo score di valutazione della International Cartilage Repair Society (ICRS) (Tab.2), mentre nel gruppo D è stato introdotto un sistema semiquantitativo che ha preso in considerazione oltre alla valutazione dell'aspetto superficiale della lesione, anche quella del difetto in sezione trasversa. Dopo l'espianto i condili sono stati rifilati con una sega a nastro ai margini della lesione e successivamente, dopo un periodo di decalcificazione variabile dai 7 ai 10 gg, sono stati divisi in due parti simmetriche lungo l'asse più corto.

Con tale metodica l'indagine macroscopica risulta essere più completa in quanto le sezioni vengono ottenute a partire dal centro della lesione verso la periferia coinvolgendo entrambi i lati della lesione stessa; questo ci ha permesso di valutare aspetti che sarebbero altrimenti passati inosservati, come la presenza di cisti, aree di necrosi o di sanguinamento all'interno del tessuto di riparazione (Tab.3).

Categories	Score
Surface of texture of repair tissue	
Normal: smooth, white	3
>75% normal	2
50-75% normal	1
<50% normal	0
Percent area of defect filled	
100%	3
>75%	2
50-75%	1
<50%	0
Graft-recipient tissue integration	
100% of perimeter	3
>75%	2
50-75%	1
<50%	0

Tab.1 Score semiquantitativo per la valutazione macroscopica del tessuto riparativo (gruppo A).

Categories	Score
Degree of defect repair	
In level with surrounding cartilage	4
75% repair of defect depth	3
50% repair of defect depth	2
25% repair of defect depth	1
0% repair of defect depth	0
Integration to border zone	
Complete integration with surrounding cartilage	4
Demarcating border <1mm	3
3/4 of graft integrated, 1/4 with a notable border >1 mm width	2
1/2 of graft integrated with surrounding cartilage, 1/2 with a notable border >1mm	1
From no contact to 1/4 of graft integrated with surrounding cartilage	0
Macroscopic appearance	
Intact smooth surface	4
Fibrillated surface	3
Small, scattered fissures or cracks	2
Several, small or few but large fissures	1
Total degeneration of grafted area	0
Overall repair assessment	
Grade I: normal	12
Grade II: nearly normal	11-8
Grade III: abnormal	7-4
Grade IV: severely abnormal	3-1

Tab 2. Score di valutazione della riparazione cartilaginea (ICRS)

Variable		Comment	Score
Percent of area filled		100%	3
		>75%	2
		50-75%	1
		<50%	0
Surface	Tissue aspect	100% normal (smooth, white, equal to host cartilage)	3
		>75%	2
		50-75%	1
		<50%	0
	Regularity	regular, intact	5
		fibrillation (opacity, roughness)	4
		clefts	3
		eburneation	2
		small cavities	1
		great cavities	0
Graft-recipient tissue integration		100% of perimeter	3
		>75%	2
		50-75%	1
		<50%	0
Section aspect	Depth	at host cartilage level	3
		at host subchondral bone level	2
		just underneath bone plate surface	1
		deepened in the subchondral bone	0
	Tissue aspect	similar to bone and cartilage	3
		similar to fibrous tissue	2
		similar to granulation tissue	1
		only bone (eburneation)	0
	Subchondral cysts	none	3
		mild	2
		moderate	1
		severe	0
	Periarticular remodelling	none or no pertinent	3
		mild	2
		moderate	1
		severe	0
Best score: 26; worst score: 0			

Tab. 3 Score semiquantitativo per la valutazione macroscopica del tessuto riparativo (gruppo D).

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

VALUTAZIONE MICROSCOPICA.

Campioni ampi 17 mm e profondi 10-15 mm sono stati prelevati dai condili femorali in corrispondenza di ciascun difetto. Il campione comprendeva la cartilagine articolare per 3-4 mm oltre il bordo del difetto e in profondità includeva il tessuto osseo sottostante.

Ciascun campione è stato fissato in formalina al 10% per 36 ore. Successivamente i blocchetti così ottenuti sono stati trasferiti in una soluzione decalcificante (acido citrico e acido formico 1:1) per 7-10 giorni, lavati in acqua corrente per 8 ore, disidratati e fissati in paraffina. I blocchi sono stati quindi orientati in modo da fornire sezioni sagittali dello spessore di 5µm del difetto chirurgico. Le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina per valutare la morfologia del tessuto e Azan-Mallory e Safranin-O per evidenziare rispettivamente il collagene e i proteoglicani nella matrice cartilaginea. I vetrini del gruppo A sono stati valutati da due osservatori in cieco impiegando il sistema di valutazione di Caplan modificato (Tab. 4); la media delle due valutazioni è stata impiegata per calcolare lo score di guarigione. Sono state eseguite le prove immunostochimiche per valutare la deposizione nella zona intercapsulare del collagene di tipo II: tali prove hanno previsto l'utilizzo dell'anticorpo *Collagen type II* (anti-Collagen type II ClICI clone, Developmental Studies Hybridoma Bank, IOWA University). Le sezioni sono state colorate con ematossilina per il contrasto e valutate al microscopio ottico per determinare la distribuzione del collagene II. Nei gruppi B e C ogni sezione è stata valutata da tre autori diversi e ha ottenuto un punteggio secondo una versione modificata del sistema di classificazione sviluppato da O'Driscoll *et al* (Tab. 5); su ogni campione, è stata ottenuta la media del punteggio ottenuto dai tre osservatori, ed è stata poi calcolata la media delle tre osservazioni.

RILEVAZIONE DELLE CELLULE ES-LIKE NEL TESSUTO DI RIPARAZIONE.

Per trovare le cellule ES-like nel tessuto in riparazione dei campioni del gruppo A è stata utilizzata la regione OY 11.1 del cromosoma Y di *Ovis aries* e la sua presenza è stata valutata in ciascun campione mediante ibridazione *in situ* (ISH).

ANALISI STATISTICHE.

Le analisi statistiche si sono basate sui dati della valutazione macroscopica e istologica utilizzando metodi diversi a seconda del gruppo interessato. Nel gruppo "A", poiché ogni animale ha ricevuto tre trattamenti (ES-like, ED, G), ogni pecora ha costituito il suo stesso controllo.

L'analisi della varianza è stata utilizzata per valutare l'effetto del tempo dalla chirurgia, l'efficacia del trattamento e l'interazione di questi due fattori nel processo di riparazione. Le variabili analizzate sono state: il punteggio di valutazione macroscopica, il punteggio istologico e immunoistologico totale di guarigione del difetto e il punteggio immunoistologico e istologico per ogni singola categoria. Il livello di significatività è $P < 0,05$.

È stata valutata la significatività dei confronti a coppie tra ogni combinazione di trattamento e periodo utilizzando la procedura di comparazione multipla di Tukey-Kramer. Le analisi sono state condotte utilizzando la procedura GLM di SAS 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Nel gruppo B e nel gruppo C i dati sono stati analizzati utilizzando il software statistico SPSS 10.1 (SPSS Inc.). Le variabili analizzate sono state: punteggio di valutazione macroscopica, rigidità della cartilagine e punteggio istologico. Ogni variabile è stata espressa come valore medio per ciascun gruppo. Il confronto tra i gruppi per ogni risultato è stato effettuato con il test Kruskal-Wallis. È stata poi eseguita un'analisi con il Test di Tukey per confronti multipli a coppie. Per ogni confronto sono stati calcolati Intervalli di Confidenza (CI) del 95% delle differenze tra le medie. La significatività è stata fissata a $P < 0,05$.

Analysis		Qualifications	Score
Filling of defect		complete	2
		partial	1
		none	0
Cartilage	regular vs irregular	regular	2
		irregular	1
	Cell type	chondroblasts-cytes	4
		both chondroblasts & fibroblasts	3
		fibroblasts	2
		fibroblasts & endothelial cells	1
		empty	0
	Tissue type	mature hyaline cartilage	5
		immature hyaline cartilage	4
		fibrocartilage	3
fibrous tissue		2	
granulation tissue		1	
Continuity tangential layer proliferation and subchondral ossification	presence	1	
	absence	0	
Bone	Ossification	lamellar bone	3
		woven bone	2
		subchondral ossification	1
		absence	0
	Cell Type	osteogenic cells	5
		chondroblasts/cytes	4
		both chondroblasts & fibroblasts	3
		fibroblasts	2
		fibroblasts and endothelial cells	1
		empty	0
Edges of defect	Continuity of articular cartilage edge and filling material	two edges	2
		one edge	1
		none	0
	Tidemark	presence (complete)	2
	presence (discontinuous)	1	
	premature/absence	0	
Vascularity	Amount	none	3
		low	2
		medium	1
		high	0
	Distribution	absence	5
		zone I (above level of tidemark)	4
		zone II (upper half of defect below tidemark)	3
		zone III (lower half of defect below tidemark)	2
	entire	1	
Degeneration	Degree of articular deterioration	none	4
		grade I (mild)	3
		grade II (moderate)	2
		grade III (severe)	1
	Subchondral bone sclerosis	none or not pertinent	4
		grade I (mild)	3
		grade II (moderate)	2
		grade III (severe)	1
	Periarticular remodeling or lipping	none	4
		grade I (mild)	3
		grade II (moderate)	2
		grade III (severe)	1
Subchondral bone cysts	none	4	
	grade I (mild)	3	
	grade II (moderate)	2	
	grade III (severe)	1	
Matrix staining	Collagen staining with Azan-Mallory	grade I (marked intensity)	3
		grade II (moderate intensity)	2
		grade III (mild intensity)	1
		premature	0
	Proteoglycan staining with Safranin-O	grade I (marked intensity)	4
		grade II (moderate intensity)	3
		grade III (mild intensity)	2
		grade IV (initial production)	1
		premature/negative	0
			grade I (marked intensity)
Collagen type II immunostaining	grade II (moderate intensity)	2	
	grade III (mild intensity)	1	
	premature/negative	0	
		grade I (marked intensity)	3

Tab. 4. Sistema di valutazione istologica secondo Caplan modificato

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

Variable	Comment	Score
Tissue Morphology (Ti)	Mostly hyaline cartilage	4
	Mostly fibrocartilage	3
	Mostly non-cartilage	2
	Exclusively non-cartilage	1
Matrix staining (Matx)	None	1
	Slight	2
	Moderate	3
	Strong	4
Structural integrity (Stru)	Severe disintegration	1
	Cysts or disruption	2
	No organization of chondrocytes	3
	Beginning of columnar organization of chondrocytes	4
	Normal, similar to healthy mature cartilage	5
Chondrocyte clustering in implant (Clus)	25e100% of the cells clustered	1
	<25% of the cells clustered	2
	No clusters	3
Intactness of the calcified layer, formation of tidemark (Tide)	<25% of the calcified layer intact	1
	25-49% of the calcified layer intact	2
	50-75% of the calcified layer intact	3
	76-90% of the calcified layer intact	4
	Complete intactness of the calcified cartilage layer	5
Subchondral bone formation (Bform)	No formation	1
	Slight	2
	Strong	3
Histological appraisal of surface architecture (SurfH)	Severe fibrillation or disruption	1
	Moderate fibrillation or irregularity	2
	Slight fibrillation or irregularity	3
	Normal	4
Histological appraisal defect filling (FilH)	<25%	1
	26-50%	2
	51-75%	3
	76-90%	4
	91-110%	5
Lateral integration of implanted material (LatI)	Not bonded	1
	Bonded at one hand/partially both ends	2
	Bonded at both sides	3
Basal integration of implanted material (BasI)	<50%	1
	50-70%	2
	70-90%	3
	91-100%	4
Inflammation (InfH)	No inflammation	1
	Slight inflammation	3
	Strong inflammation	5
Maximum total score		45

Tab. 5. Sistema di valutazione istologica secondo O'Driscoll modificato

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

8. RISULTATI.

GRUPPO "A": CELLULE EMBRIONALI.

Controllo post operatorio.

In prima giornata post operatoria tutti gli animali mostravano una lieve zoppia (1° grado) a carico degli arti pelvici che è andata attenuandosi progressivamente sino a sparire in terza giornata.

Caratterizzazione delle cellule ES-like.

Cellule ES-like sono cresciute nelle colonie epiteliodi distintive espandendosi a formare monostrati. Il sesto giorno della cultura, i monostrati si sono aggregati in strutture cistiche chiamate colonie primarie, caratterizzate da cellule con grandi nuclei chiari, più nucleoli prominenti e poco citoplasma. Colonie marcate con anticorpi monoclonali (mAb) si sono colorate con la stessa intensità per SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4, mentre le cellule della granulosa delle pecore, che serviva come controllo negativo, non hanno mostrato alcun segnale. Come previsto, non è stata ottenuta nessuna colorazione con gli anticorpi monoclonali anti-citocheratina-18, Fe-C6, F1-652 o FORSE-1, confermando lo stato indifferenziato delle colonie ES-like.

Analisi biomeccanica.

A 6 mesi il tessuto neformato non aveva ancora completamente colmato il difetto, per cui la sua superficie si trovava al di sotto del livello della cartilagine sana adiacente; questo ha causato problemi tecnici nel determinare la misurazione della rigidità del tessuto. Questa differenza di altezza non ha consentito quindi un pieno contatto tra l'identatore e la superficie da analizzare. Tuttavia la rigidità di compressione del tessuto di riparazione è stata più elevata nei campioni trattati con colla di fibrina (G). A 12 mesi non sono stati riscontrate differenze significative tra le lesioni trattate con ES e le lesioni di controllo; tuttavia un campione trattato con ES ha mostrato il punteggio più alto.

Valutazione macroscopica.

Lo score per la valutazione macroscopica dei campioni (ES-like, ED e G) a 6 e 12 mesi dopo la chirurgia non mostrava differenze significative, anche se gli innesti ES-like hanno evidenziato una migliore rigenerazione macroscopica. È stato riscontrato un miglioramento del tessuto di

guarigione tra i 6 e i 12 mesi in tutti i campioni. Inoltre, in tutto il periodo, non è stato osservato nessun segno di neoplasia o infiammazione.

A 6 mesi i campioni presentavano un tessuto rigenerato di aspetto liscio ed opalescente simile alla cartilagine, con estese fissurazioni superficiali. I difetti erano completamente riempiti e i bordi presentavano una buona integrazione con il tessuto ospite, migliore nelle ES rispetto alle ED.

A 12 mesi il tessuto rigenerato, simile alla cartilagine, riempiva completamente i difetti mostrando continuità con il tessuto sano circostante. Nonostante non fosse presente una differenza statistica significativa, tutti gli innesti ES hanno raggiunto un punteggio migliore rispetto ai loro controlli e uno di essi sembrava essere quasi completamente guarito, con un aspetto simile alla cartilagine ialina. (Fig. 8).

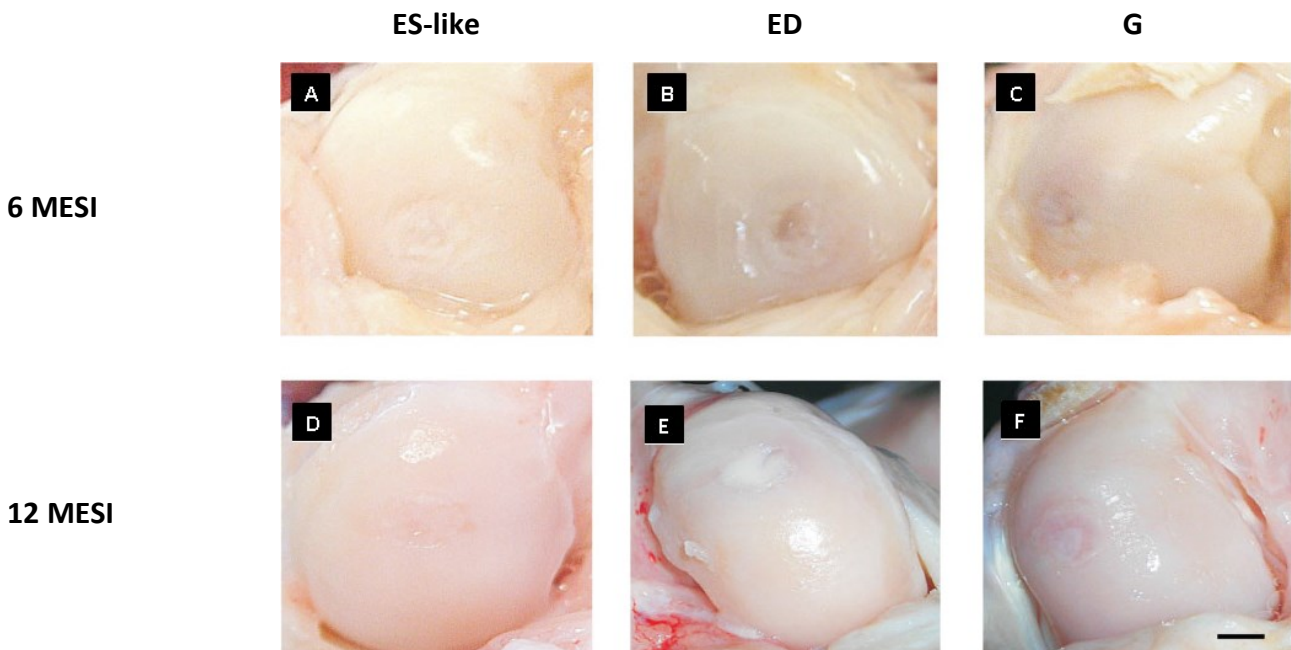


Fig.8 Aspetto macroscopico a 6 e 12 mesi nei diversi gruppi.

Valutazione istologica e immunohistochimica.

L'analisi dei punteggi istologici di ogni categoria non ha mostrato differenze statistiche tra i campioni trattati e i controlli sia a 6 che a 12 mesi, con risultati simili a quelli della valutazione macroscopica. È stata confermata l'assenza di infiammazione o neoplasia.

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

A 6 mesi i campioni presentavano fibrocartilagine nella parte superficiale e nel tessuto osseo, con focolai di ossificazione subcondrale alla base del difetto nel gruppo ED. In alcuni campioni ES si sono osservate rotture della cartilagine e piccole cisti subcondrali; in ED erano invece osservabili rotture più profonde localizzate ai bordi della lesione, con degenerazione della matrice circostante. Negli ES si è inoltre osservata una cospicua presenza di proteoglicani, in particolare nella zona profonda della fibrocartilagine, mentre in ED si è osservata un'iniziale produzione all'interno di nuclei di ossificazione subcondrale. La colorazione per il collagene di tipo II era positiva su tutto il tessuto rigenerato, con presenza di aree negative nelle parti centrali e profonde.

I gruppi ES e ED hanno presentato punteggi simili a 6 mesi, comunque più alti di quelli dei campioni G. I campioni ES hanno mostrato un punteggio più alto per la colorazione della matrice, meno degenerazione e una maggiore produzione di tessuto osseo. In tutti i campioni era presente una buona integrazione con il tessuto ospite (Fig.9).

A 12 mesi tutti i difetti risultavano completamente riempiti. Nei campioni ES si è osservata la presenza di cartilagine ialina immatura e osso lamellare, mentre nei campioni ED la presenza di cartilagine ialina immatura intervallata da aree di fibrocartilagine e tessuto osseo, con fessurazioni che coinvolgevano l'intero spessore del tessuto. La colorazione per i proteoglicani era forte in ES e leggera in ED, mentre il collagene di tipo II era intenso in entrambi i campioni con alcune aree negative al centro dei campioni ED (Fig.10).

Sia nei campioni ES che ED è stata osservata una buona integrazione con il tessuto ospite circostante che non si è invece osservata nei campioni G.

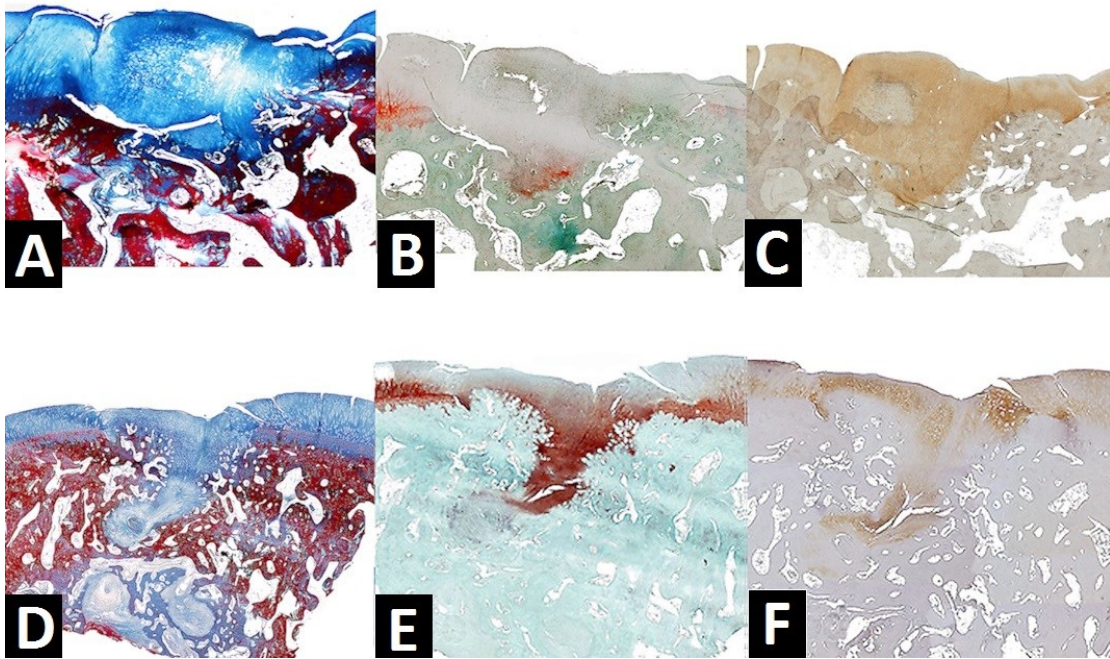


Fig. 9 Aspetto istologico dei campioni a 6 mesi. A-C) Campioni ED. D-F) Campioni ES-like. A - D): sezioni istologiche, colorazione Azan-Mallory. ingrandimento 2X; bar: 1 mm. B-E) Colorazione. Safranina-O F-C) Immunoistochimica per collagene tipo II.

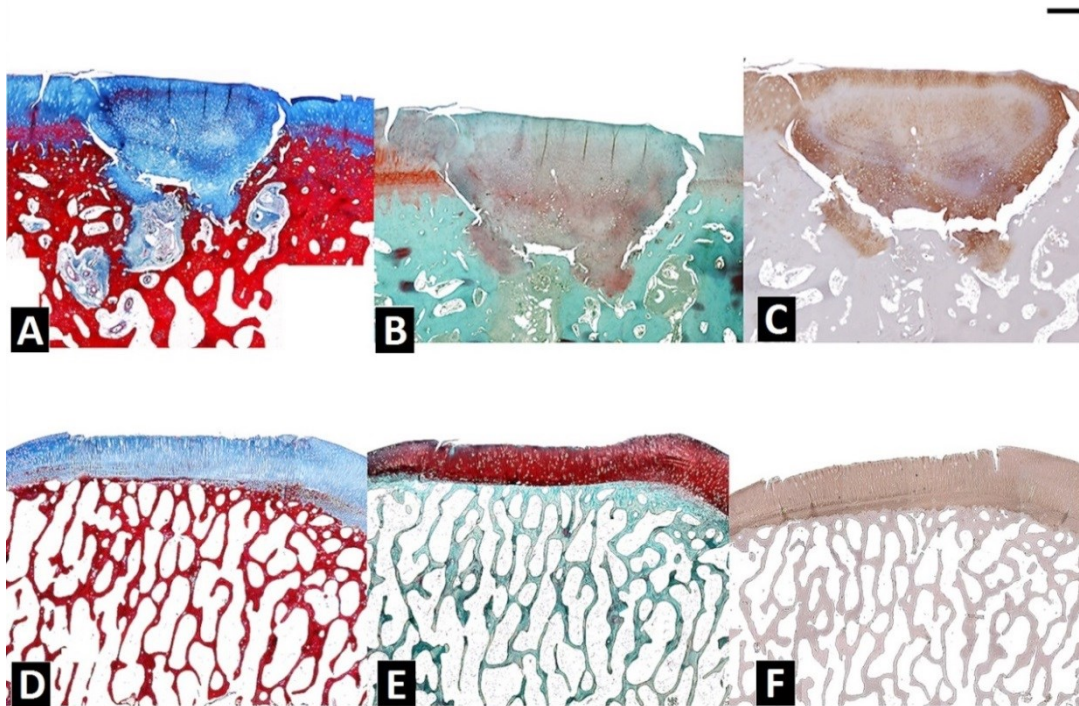


Fig. 10 Aspetto istologico dei campioni a 12 mesi. A-C) Campioni ED. D-F) Campioni ES-like. A - D): sezioni istologiche, colorazione Azan-Mallory. ingrandimento 2X; bar: 1 mm. B-E) Colorazione. Safranina-O F-C) Immunoistochimica per collagene tipo II.

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

Ibridazione *in situ* (ISH).

L' ibridazione *in situ* ha mostrato segnali positivi intranucleari solo nei campioni trattati con le cellule ES-like. Il segnale era distribuito solo nella porzione di tessuto neoformato e tale risultato era costante in tutti i campioni, mentre i controlli sono risultati sempre negativi. Inoltre, l'ISH ha dimostrato che le cellule, nella parte superiore del tessuto di riparazione, avevano una morfologia simile a quella dei fibroblasti, mentre nella parte profonda del difetto erano più simili ai condroblasti.

GRUPPO “B”: MICROFRATTURE + PRP.

Controllo post operatorio.

In prima giornata post operatoria tutti gli animali mostravano una lieve zoppia (1° grado) a carico degli arti pelvici che è andata attenuandosi progressivamente sino a sparire in terza giornata.

Valutazione macroscopica.

La valutazione macroscopica ha dimostrato che, nei soggetti trattati con le sole microfratture, il tessuto di riparazione ha parzialmente coperto il difetto. Il tessuto di riparazione era molto più sottile rispetto alla cartilagine sana circostante e questo era più evidente nelle zone attorno alle microfratture. In alcune aree era ancora presente esposizione dell'osso subcondrale (Fig. 11-A).

Nel gruppo di soggetti trattato con PRP gel + microfratture, l'area del difetto era completamente coperta da tessuto di riparazione che ha mostrato una buona integrazione con la cartilagine sana circostante. Il tessuto di riparazione ha evidenziato spessore, aspetto e colore simili a quelli della cartilagine normale. Non si sono osservate fibrillazione e/o fissurazione del tessuto riparato (Fig. 11-B).

Nel gruppo trattato con PRP liquido + microfratture, il tessuto riparato ha coperto quasi completamente il difetto. I fori delle microfratture non erano evidenti, tuttavia, il tessuto neoformato era sottile, irregolare e incongruente a livello della zona centrale del difetto. Era comunque evidente una buona integrazione con la cartilagine sana circostante (Fig. 11-C).

L'analisi macroscopica ha rivelato una differenza significativa tra i gruppi ($P = 0,0001$). L'analisi post-hoc ha mostrato che il punteggio ICRS del gruppo 2 era significativamente superiore rispetto a quello degli altri gruppi e il punteggio del gruppo 1 era significativamente inferiore a quello degli altri gruppi. Il punteggio ICRS dei gruppi 1 e 3 era significativamente inferiore a quello della cartilagine normale (Tab.6).

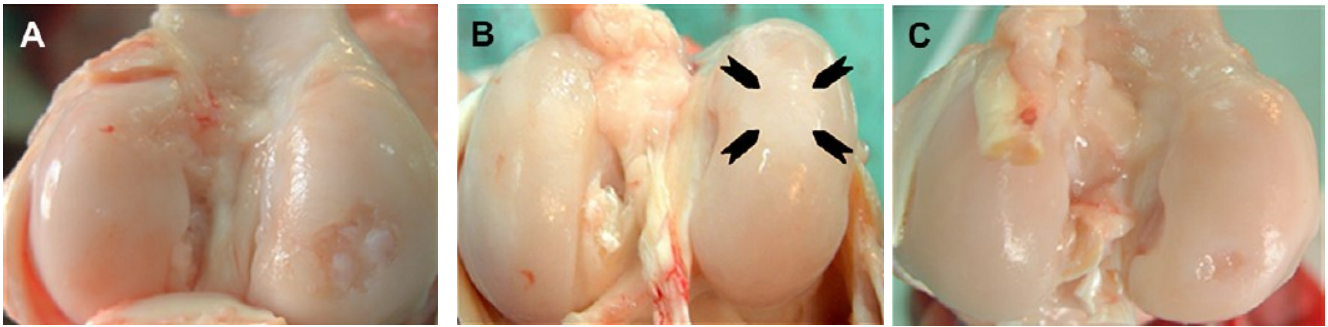


Fig.11 Aspetto macroscopico di tre campioni del gruppo B.

A. Microfratture: il tessuto di riparazione è molto più sottile della cartilagine sana circostante e ciò è più evidente nelle zone sopra e attorno alle microfratture; B. Microfratture + PRP gel: il tessuto di riparazione (frecche) mostra spessore, aspetto e colore simili alla cartilagine sana. C. Microfratture + PRP liquido : il tessuto riparato copre quasi completamente il difetto, ma è sottile, poco regolare e inconsistente, soprattutto nella parte interna del difetto.

Score ICRS (Media \pm SD)			Differenze tra medie		P value	95% CI	
Gruppo 1 (N=5)	Gruppo 2 (N=5)	Gruppo 3 (N=5)	Gruppi	Valore		Limite superiore	Limite inferiore
3.6 \pm 1.34	11 \pm 1	5.8 \pm 1.09	1 – 2	- 7.4*	0.000	- 9.2095	- 5.5905
			1 – 3	- 2.2*	0.015	- 4.0095	- 0.3905
			2 – 3	5.2*	0.000	3.3905	7.0095

*Valori significativamente rilevanti per $P < 0.05$

Tab. 6 . Risultati della valutazione macroscopica.

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

Valutazione biomeccanica.

La valutazione biomeccanica ha mostrato una differenza significativa tra i gruppi ($P = 0.007$). L'analisi post-hoc ha evidenziato che la rigidità media del tessuto neoformato nel gruppo 2 era maggiore di quella degli altri due gruppi, sebbene le differenze tra i tre gruppi non fossero significative. Solo la rigidità della cartilagine del gruppo 2 si avvicinava a quella dei controlli. Al contrario, i gruppi 1 e 3 mostravano una rigidità media significativamente inferiore rispetto alla cartilagine normale (Tab.7).

Rigidità (N) (Media \pm SD)			Differenze tra medie		P value	95% CI	
Gruppo 1 (N=5)	Gruppo 2 (N=5)	Gruppo 3 (N=5)	Gruppi	Valore		Limite superiore	Limite inferiore
2.92 \pm 0.81	4.98 \pm 1.54	3.60 \pm 0.85	1 – 2	- 2.06	0.068	- 4.2429	0.1229
			1 – 3	- 0.674	0.813	-2.8569	1.5089
			2 – 3	1.386	0.302	-0.7969	3.5689

*Valori significativamente rilevanti per $P < 0.05$

Tab. 7. Risultati della valutazione biomeccanica

Valutazione istologica.

La valutazione istologica ha dimostrato che nel gruppo trattato con microfratture il tessuto riparativo era costituito da un sottile strato di tessuto non-cartilagineo. In alcune zone, dove erano stati eseguiti i fori delle microfratture, è stata riscontrata un'ottima quantità di cellule arrotondate simili ai condrociti, incorporate in una matrice fibrosa e mal organizzata. In queste zone si è osservata un'intensa colorazione safranina-O. Il tidemark era quasi completamente assente in tutta l'area del difetto. La cartilagine sana circostante il difetto ha mostrato segni di sofferenza con una scarsa colorazione safranina-O, una proliferazione cellulare intensa e gruppi di cellule simili ai condrociti nelle zone di transizione e radiale (Fig. 12).

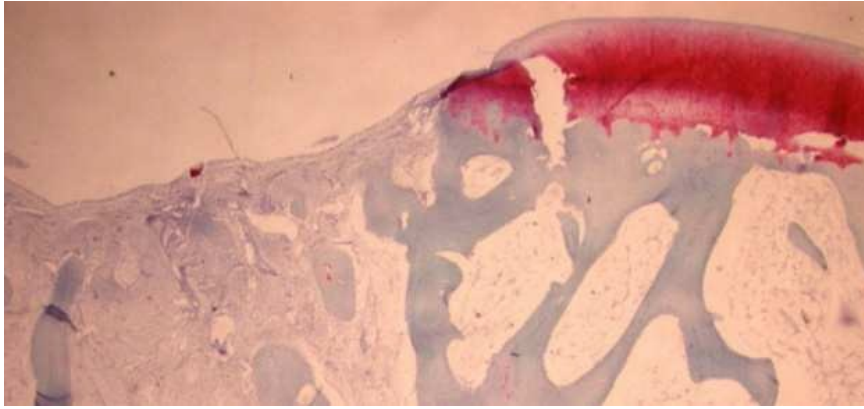


Fig . 12

Nel gruppo trattato con microfratture + PRP gel il tessuto di riparazione copriva quasi completamente il difetto. Il suo spessore era simile a quello della cartilagine sana circostante e conteneva una grande quantità di piccole cellule arrotondate. Il tessuto ha mostrato un'intensa colorazione con safranina-O e una parziale integrazione con la cartilagine sana circostante nella zona radiale, sebbene fosse evidente una chiara transizione tra queste nelle zone superficiali. In molte aree delle zone di transizione e radiale erano presenti numerosi gruppi di cellule condrociti-simili con alcune fissurazioni, più estese a livello della zona radiale. In queste aree, la colorazione con safranina-O era scarsa. Il tidemark era presente in alcune zone anche se non totalmente ripristinato. La cartilagine sana circostante ha mostrato un'intensa proliferazione cellulare con formazione di cluster di cellule. (Fig. 13).

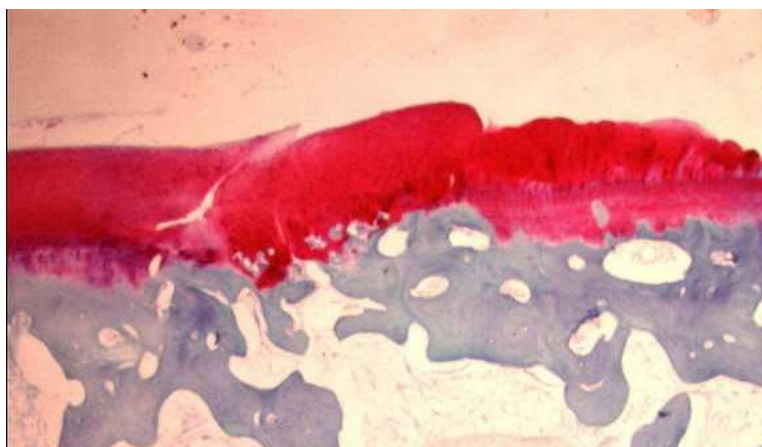


Fig. 13.

Nel gruppo trattato con microfratture + PRP liquido, si è riscontrato un sottile strato di tessuto di riparazione che copriva quasi completamente il difetto, anche se era più sottile della cartilagine normale circostante con una chiara demarcazione rispetto al tessuto sano. Il tessuto neoformato ha mostrato una buona colorazione con safranina-O, una grande quantità di cellule, ben organizzate in colonne, simili ai condrociti e rari cluster nella zona di transizione e radiale. Tuttavia, in alcuni settori, era presente un tessuto fibrocartilagineo con colorazione safranina-O scarsa. Il tidemark era quasi completamente assente nel difetto. La cartilagine sana circostante ha mostrato una proliferazione cellulare intensa con formazione di cluster (Fig. 14).

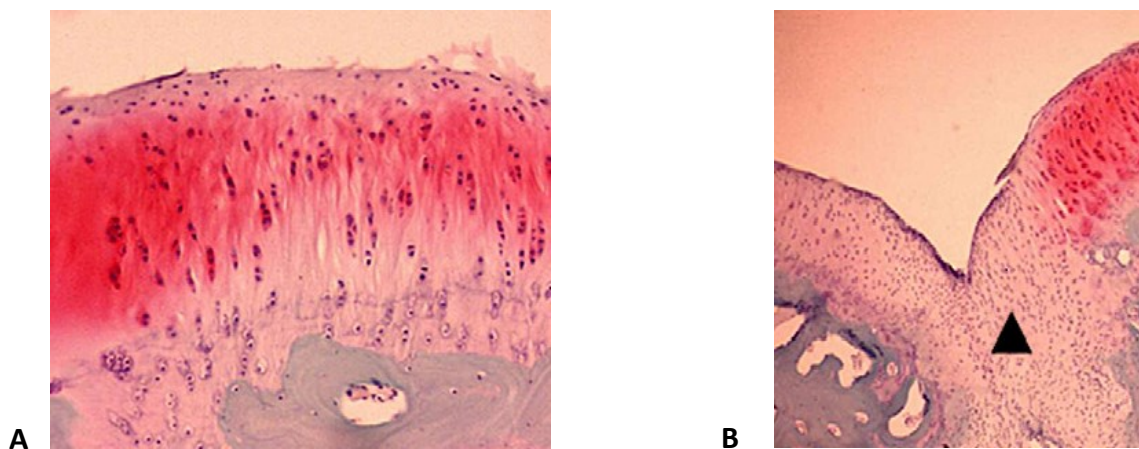


Fig. 14. A. Tessuto neoformato con cellule organizzate in colonne.
B. zona con scarsa colorazione alla Safranina – O (freccia).

Il punteggio di valutazione istologica ha mostrato una differenza significativa tra i gruppi per le seguenti variabili: colorazione matrice (mATX) ($P=0,001$), integrità strutturale (Stru) ($P=0,001$), architettura di superficie (SurfH) ($P=0,006$), riempimento dei difetti (FillH) ($P=0,0001$), integrazione basale (Basl) ($P=0,0001$) e punteggio totale ($P=0,0001$). L'analisi post-hoc ha rivelato che i gruppi PRP (gruppo 2 e 3) avevano un'incidenza significativamente maggiore per il punteggio medio rispetto al gruppo 1 per tutte le variabili considerate. Per le variabili FillH e Basl, i punteggi medi del gruppo 2 sono stati significativamente superiori rispetto a quelli del gruppo 3 (Tab. 8).

Variables	Mean score \pm SD			Differences between means		P value	95% CI	
	Group 1 (N=5)	Group 2 (N=5)	Group 3 (N=5)	Groups	Value		Lower limit	Upper limit
TI	2.3 \pm 0.67	2.8 \pm 0.71	2.4 \pm 0.90	1-2	-0.5333	0.278	-1.3701	0.3034
				1-3	-0.1211	0.921	-0.8845	0.6424
				2-3	0.4123	0.353	-0.3083	1.1329
MATX	1.6 \pm 0.84	2.9 \pm 0.90	2.5 \pm 0.69	1-2	-1.3167*	0.001	-2.1475	-0.4859
				1-3	-0.9263*	0.014	-1.6844	-0.1683
				2-3	0.3904	0.387	-0.3251	1.1058
STRU	1.6 \pm 0.51	2.7 \pm 0.62	2.8 \pm 0.95	1-2	-1.1500*	0.004	-1.9655	-0.3345
				1-3	-1.2421*	0.001	-1.9862	-0.4980
				2-3	-0.0921	0.945	-0.7944	0.6102
CLUS	1.1 \pm 0.31	1.2 \pm 0.45	1.2 \pm 0.45	1-2	-0.1500	0.689	-0.5928	0.2928
				1-3	-0.1632	0.591	-0.5672	0.2409
				2-3	-0.0132	0.996	-0.3945	0.3682
TIDE	1.5 \pm 0.84	2 \pm 0.95	1.5 \pm 0.77	1-2	-0.5000	0.362	-1.3841	0.3841
				1-3	-0.0263	0.997	-0.8330	0.7803
				2-3	0.4737	0.294	-0.2877	1.2350
BFORM	2 \pm 0.66	2.1 \pm 0.83	1.6 \pm 0.88	1-2	-0.1667	0.885	-1.0266	0.6933
				1-3	0.3158	0.593	-0.4689	1.1005
				2-3	0.4825	0.263	-0.2581	1.2230
SURFH	1.1 \pm 0.31	1.9 \pm 0.9	1.8 \pm 0.56	1-2	-0.8167*	0.014	-1.4859	-0.1475
				1-3	-0.7947*	0.008	-1.4053	-0.1841
				2-3	0.0219	0.995	-0.5544	0.5982
FILH	1.6 \pm 0.51	4 \pm 0.85	2.6 \pm 0.76	1-2	-2.4000*	0.000	-3.1730	-1.6270
				1-3	-1.0316*	0.003	-1.7369	-0.3263
				2-3	1.3684*	0.000	0.7028	2.0341
LATL	1.2 \pm 0.42	1.5 \pm 0.51	1.7 \pm 0.87	1-2	-0.3833	0.407	-1.1060	0.3394
				1-3	-0.5368	0.130	-1.1963	0.1226
				2-3	-0.1535	0.820	-0.7759	0.4689
BASL	1.6 \pm 0.51	3.2 \pm 0.62	2.4 \pm 0.90	1-2	-1.6500*	0.000	-2.4334	-0.8666
				1-3	-0.8737*	0.014	-1.5885	-0.1589
				2-3	0.7763*	0.021	0.1017	1.4510
INFH	1.8 \pm 1.03	1.1 \pm 0.57	1.6 \pm 0.95	1-2	0.6333	0.228	-0.2897	1.5563
				1-3	0.1684	0.878	-0.6737	1.0106
				2-3	-0.4649	0.338	-1.2598	0.3299
Total	17.4 \pm 3.23	25.8 \pm 5.07	22.6 \pm 4.64	1-2	-8.4333*	0.000	-13.1232	-3.7434
				1-3	-5.2316*	0.014	-9.5108	-0.9524
				2-3	3.2018	0.143	-0.8371	7.2406

*Valori significativamente rilevanti per $P < 0.05$

Tab. 8 . Risultati della valutazione istologica

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

GRUPPO “C”: MICROFRATTURE + ACP.

Controllo post operatorio.

In prima giornata post operatoria tutti gli animali mostravano una lieve zoppia (1° grado) a carico degli arti pelvici che è andata attenuandosi progressivamente sino a sparire in terza giornata.

Valutazione macroscopica.

La valutazione macroscopica a 6 mesi (Fig 15-A) nel gruppo trattato con ACP + microfratture ha mostrato un completo riempimento dei difetti da parte del tessuto di riparazione, sebbene fossero presenti fissurazioni sulla superficie. Era comunque evidente una parziale integrazione del tessuto neoformato con la cartilagine circostante. Nel gruppo trattato con le sole microfratture, il riempimento dei difetti è stato consistente, anche se non ha mai superato il 50% della profondità del difetto; sono stati osservati in tutti i campioni fissurazioni penetranti estese (Fig. 15-B). Ai 12 mesi (Fig. 16-A) i campioni del gruppo trattato con ACP e microfratture hanno mostrato un ulteriore miglioramento dell'aspetto macroscopico, con una superficie piuttosto liscia e allo stesso livello della cartilagine circostante; tuttavia era ancora evidente una leggera delimitazione lungo i confini. Nel gruppo trattato con le microfratture, non sono state osservate evidenti alterazioni macroscopiche confrontate con le precedenti osservazioni a 6 mesi (Fig. 16-B).

Il punteggio dell'analisi macroscopica ha mostrato che la media del punteggio nel gruppo 1 era significativamente maggiore rispetto a quella del gruppo 2, sia a 6 che a 12 mesi (Tab.9).

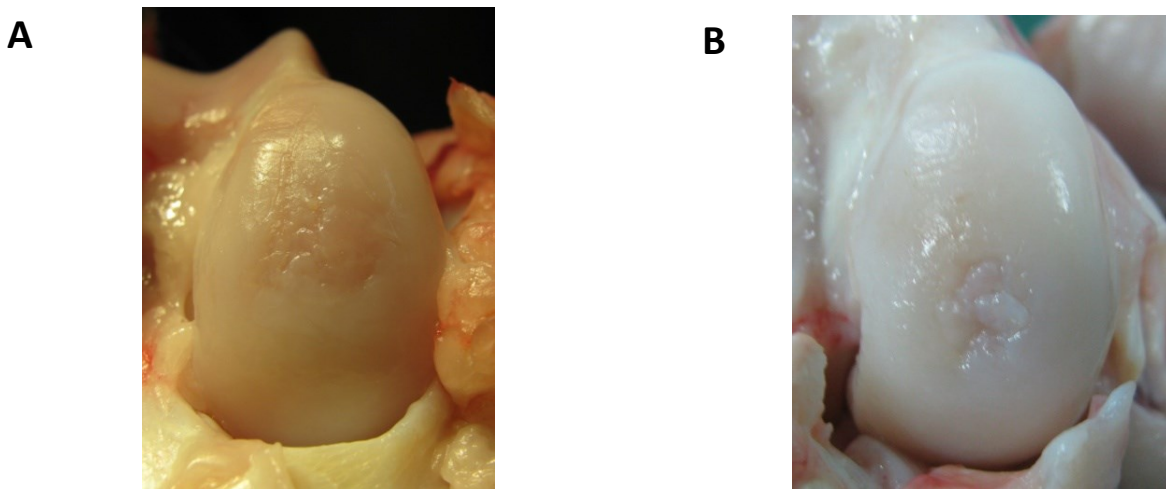


Fig. 15 Aspetto macroscopico a 6 mesi. . A. Campione trattato con ACP + microfratture. B. Campione trattato con microfratture

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

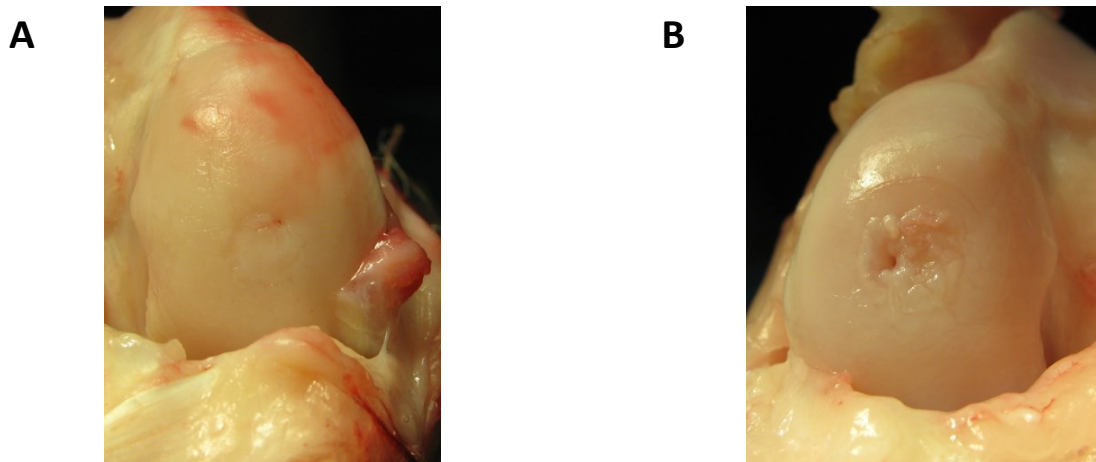


Fig. 16 Aspetto macroscopico a 12 mesi. . A. Campione trattato con ACP + microfratture. B.Campione trattato con microfratture

Periodo	Score ICRS (Media \pm SD)		P value	95% CI	
	Gruppo 1 (N=5)	Gruppo 2 (N=5)		Limite superiore	Limite inferiore
6 mesi	7.33 \pm 1.34	4.87 \pm 2.06	0.001*	- 3.78	- 1.15
12 mesi	7.93 \pm 1.67	4.27 \pm 1.53	<0.001	- 4.86	- 2.47

*Differenze statisticamente rilevanti.

Tab. 9.. Risultati della valutazione macroscopica.

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

Valutazione biomeccanica.

La valutazione biomeccanica ha mostrato una differenza significativa tra i gruppi in ogni periodo di tempo ($P < 0.0001$). L'analisi post-hoc (Tab. 12) a 6 e 12 mesi, ha mostrato che il gruppo 1 presentava una rigidità media significativamente maggiore rispetto al gruppo 2, mentre il confronto con il gruppo di controllo non ha mostrato una differenza significativa. I valori del gruppo 2 sono rimasti significativamente inferiori a quelli dei controlli a 6 e 12 mesi. Il confronto tra diversi periodi di tempo all'interno dei gruppi ha mostrato una differenza significativa in entrambi i gruppi ($P=0.003$ per il gruppo 1 e $P < 0.0001$ per il gruppo 2). Il test post hoc ha mostrato che nel gruppo 1 la differenza della rigidità media tra 6 e 12 mesi non è stata significativa ($P=0,989$). Nel gruppo 2 e la rigidità media a 6 mesi è stata significativamente maggiore di quella a 12 mesi ($P = 0.024$).

Periodo	Rigidità (N) (Media \pm SD)			Differenze tra medie		95% CI	
	Gruppo 1 (N=5)	Gruppo 2 (N=5)	Gruppo di controllo (N=10)	Gruppi	P Value	Limite superiore	Limite inferiore
6 mesi	5.17 \pm 1.18	3.54 \pm 0.33	5.09 \pm 0.24	1-2 1-controllo 2-controllo	< 0.0001* 0.910 < 0.0001*	1.08 -0.39 -2.02	2.17 -0.55 -1.07
12 mesi	5.12 \pm 0.28	3.01 \pm 0.61	5.29 \pm 0.30	1-2 1-controllo 2-controllo	< 0.0001* 0.397 < 0.0001*	1.76 - 0.47 - 2.58	2.46 0.14 - 1.97

*Differenze statisticamente rilevanti.

Tab. 12. Risultati della valutazione macroscopica.

Valutazione istologica.

La valutazione istologica a 6 mesi nel gruppo 1 (MF + ACP) (Fig. 17-A) ha mostrato che la zona del difetto era quasi completamente colma di tessuto fibrocartilagineo con una buona integrazione laterale, anche se sono state osservate alcune fissurazioni a livello dell'interfaccia con la cartilagine sana circostante. Il tessuto di riparazione era più sottile della cartilagine normale ed è stata osservata proliferazione ossea a livello della base del difetto. Si sono osservate un gran numero di cellule arrotondate parzialmente organizzate in colonne con alcuni cluster. Era evidente una lieve e omogenea colorazione Safranina-O a livello della matrice. La formazione del *tidemark* è stata osservata occasionalmente. Nel gruppo 2 (MF) (Fig. 17-B) il tessuto di riparazione era ancora poco organizzato e con fissurazioni penetranti. Erano evidenti un gran numero di gruppi di cellule, con una leggera colorazione safranina-O della matrice. La formazione del *tidemark* era ancora scarsa.

A 12 mesi, nel gruppo 1 (Fig. 17-C) non sono stati osservati cambiamenti evidenti rispetto ai campioni dei 6 mesi. L'integrazione laterale era buona anche se era ancora presente una netta demarcazione con la cartilagine circostante con intensa colorazione safranina-O del tessuto di riparazione lungo i margini. Non è stata evidenziata in alcun campione una completa formazione del *tidemark*. Nel gruppo 2 (Fig. 17-D) era evidente un deterioramento della qualità del tessuto rispetto ai campioni dei 6 mesi. È stato osservato un collasso centrale del tessuto di riparazione, con una chiara demarcazione con la cartilagine circostante, presenza di cluster di cellule disorganizzate e lieve colorazione safranina-O della matrice. La formazione del *tidemark* era scarsa.

La valutazione del punteggio istologico a 6 mesi ha mostrato nel gruppo 1 punteggi significativamente maggiori rispetto al gruppo 2 per tutte le variabili, incluso il punteggio totale, fatta eccezione per la formazione di osso subcondrale, la formazione del *tidemark* e l'integrazione basale, che non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi. L'infiammazione ha mostrato il punteggio più basso in tutte le osservazioni di entrambi i gruppi (Tab.10). A 12 mesi il gruppo 1 ha mostrato punteggi significativamente maggiori rispetto al gruppo 2 per tutte le variabili, tra cui il punteggio totale, tranne che per la colorazione della matrice e la formazione di *tidemark*, che non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi (Tab. 11).

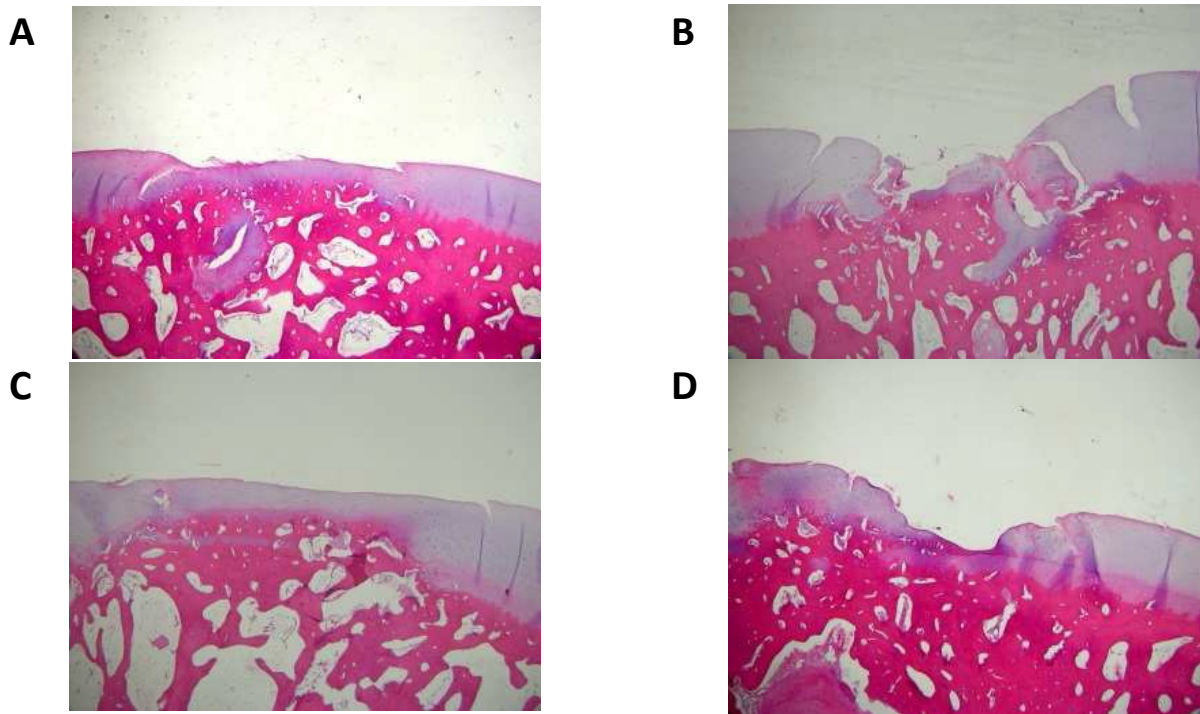


Fig 17. Valutazione istologica dei due gruppi a 6 mesi (A e B) e a 12 mesi (C e D)

Il confronto tra i diversi periodi di tempo all'interno dei gruppi ha mostrato una differenza significativa in entrambi i gruppi ($P < 0.001$ per il gruppo 1 e $P = 0.01$ per il gruppo 2). L'analisi post hoc ha mostrato che nel gruppo 1 la differenza tra i due gruppi non è stata significativa ($P = 0,068$). Nel gruppo 2 il punteggio totale medio a 6 mesi era significativamente superiore rispetto a quello a 12 mesi ($P = 0,018$).

Variable	Mean Score \pm SD		P Value	95% Confidence Interval	
	Group 1 (n = 5)	Group 2 (n = 5)		Lower Limit	Upper Limit
Tissue morphology	3.95 \pm 0.22	2.93 \pm 1.03	<.0001*	-1.35	-0.68
Matrix staining	2.44 \pm 0.78	1.67 \pm 0.72	<.0001*	-1023	-0.31
Structural integrity	3.39 \pm 0.99	2.13 \pm 1.41	<.0001*	-1.93	-0.58
Chondrocyte clustering	2.07 \pm 0.26	1.07 \pm 0.26	<.0001*	-1.16	-0.85
Formation of tidemark	2.05 \pm 1.07	1.87 \pm 1.19	.586	-0.85	0.48
Subchondral bone formation	2.49 \pm 0.51	2.67 \pm 0.49	.242	-0.12	0.48
Surface architecture	1.80 \pm 0.56	1.27 \pm 0.46	.002*	-0.86	-0.21
Defect filling	2.85 \pm 1.19	1.40 \pm 0.51	<.0001*	-2.09	-0.81
Lateral integration	2.17 \pm 0.49	1.73 \pm 0.46	.004*	-0.73	-0.14
Basal integration	2.22 \pm 0.85	2.60 \pm 0.51	.111	-0.09	0.85
Inflammation	1	1	—†		
Total	26.44 \pm 3.56	20.33 \pm 2.38	<.0001*	-8.10	-4.11

*Differenze statisticamente rilevanti.

† Non abbiamo calcolato *t* perché SD è pari a 0 in entrambi i gruppi.

Tab.10 . Risultati della valutazione microscopica a 6 mesi.

Variable	Mean Score \pm SD		P Value	95% Confidence Interval	
	Group 1 (n = 5)	Group 2 (n = 5)		Lower Limit	Upper Limit
Tissue morphology	3.50 \pm 0.87	2.30 \pm 0.67	<.0001*	-1.78	-0.62
Matrix staining	2.11 \pm 0.76	1.60 \pm 0.84	.054	-1.04	0.01
Structural integrity	2.93 \pm 1.01	1.60 \pm 0.52	<.0001*	-1.98	-0.68
Chondrocyte clustering	1.80 \pm 0.48	1.10 \pm 0.32	<.0001*	-1.01	-0.38
Formation of tidemark	2.02 \pm 1.11	1.50 \pm 0.85	.166	-1.25	0.22
Subchondral bone formation	2.95 \pm 0.22	2.00 \pm 0.67	<.0001*	-1.16	-0.73
Surface architecture	2.10 \pm 0.77	1.10 \pm 0.32	<.0001*	-1.50	-0.50
Defect filling	3.57 \pm 1.27	1.60 \pm 0.52	<.0001*	-2.78	-1.15
Lateral integration	2.75 \pm 0.44	1.20 \pm 0.42	<.0001*	-1.85	-1.25
Basal integration	3.50 \pm 0.79	1.60 \pm 0.52	<.0001*	-2.42	-1.38
Inflammation	1	1.80 \pm 1.03	<.0001*	0.54	1.06
Total	28.23 \pm 4.41	17.40 \pm 3.24	<.0001*	-13.75	-7.92

*Differenze statisticamente rilevanti.

Tab 11. Risultati della valutazione microscopica a 12 mesi.

GRUPPO “D”: NANOCERIA.

Il gruppo D è ancora in corso di valutazione e siamo in grado di riportare esclusivamente i dati macroscopici dei risultati a 6 mesi che, come tali, sono da considerarsi preliminari e incompleti.

Controllo post operatorio.

In prima giornata post operatoria tutti gli animali mostravano una lieve zoppia (1° grado) a carico degli arti pelvici che è andata attenuandosi progressivamente sino a sparire in terza giornata.

Valutazione biomeccanica.

Non è stato possibile rilevare dati attendibili per la difficoltà di contatto dell'identatore con il tessuto neoformato, in quanto la sua superficie si trovava al di sotto del livello della cartilagine sana adiacente.

Valutazione macroscopica.

I due gruppi, trattato e controllo, hanno presentato delle piccole differenze nel tipo di rigenerazione con scores piuttosto ravvicinati ed un leggero vantaggio del gruppo trattato rispetto a quello non trattato, tranne che per il soggetto n. 3 che non presentava obiettivamente differenze. Ad ogni modo, aggregando i dati (Tab. 13) e ottenendo le medie, il gruppo Nanoceria presentava uno score medio di 19,2 punti (74% dello score totale) e una DS di 2,7 contro un 15,6 (60% dello score totale) con una DS di 4,4 del gruppo controllo. In pratica, il gruppo controllo ha manifestato una variabilità maggiore nell'avanzamento del processo riparativo rispetto al gruppo trattato in cui si osservava invece una migliore e più omogenea rigenerazione nei soggetti esaminati. In entrambi i gruppi le lesioni hanno iniziato il processo di rigenerazione di un tessuto che spesso ricopriva interamente l'osso subcondrale, ma macroscopicamente non è stato possibile stabilire se si trattasse di cartilagine neoformata o di tessuto fibroso (Fig. 18). In nessun caso è stato osservato un completo riempimento della lesione o un tentativo di riportarsi a livello della cartilagine sana (tranne che nel soggetto 5 dove sono presenti proliferazioni di tessuto che si sollevano dal fondo della lesione quasi fino al livello della superficie articolare sana). Spesso il tessuto neoformato si presentava fibrillato con fissurazioni e rotture;

		Sheep		1		2		3		4		5		
		Condile		dx	sn	dx	sn	dx	sn	dx	sn	dx	sn	
		half lesion		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Percent of area filled		100%	3						3	3		3		
		>75%	2			2	2	2			2		2	
		50-75%	1	1										
		<50%	0		0									
Surface	Tissue aspect	100% normal (smooth, white, equal to host cartilage)	3	3						3				
		>75%	2					2	2		2	2		
		50-75%	1		1	1	1						1	
		<50%	0											
	Regularity	regular, intact	5											
		fibrillation (opacity, roughness)	4	4				4		4		4		
		clefts	3						3		3		3	
		eburnation	2				2							
		small cavities	1			1								
		great cavities	0		0									
Graft-recipient tissue integration		100% of perimeter	3							3				
		>75%	2			2			2		2	2		
		50-75%	1	1	1			1					1	
		<50%	0				0							
Section aspect	Depth	at host cartilage level	3											
		at host subchondral bone level	2	2			2	2	2	2	2	2	2	
		just underneath bone plate surface	1			1								
		deepened in the subchondral bone	0		0									
	Tissue aspect	similar to bone and cartilage	3			3					3		3	
		similar to fibrous tissue	2	2				2	2		2			
		similar to granulation tissue	1		1		1						1	
		only bone (eburnation)	0											
	Subchondral cysts	none	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	
		mild	2			2								
		moderate	1											
		severe	0											
	Periarticular remodelling	none or no pertinent	3	3	3	3	3	3	3		3	3	3	
		mild	2											
		moderate	1											
		severe	0											
Best score: 26; worst score: 0			totale	19	9	15	14	19	20	21	19	22	16	

Tab 13. Risultati della valutazione macroscopica del gruppo D a 6 mesi.

Dott. Andrea Pes

La riparazione della cartilagine. Studio comparato su modello animale.

Scuola di Dottorato di Ricerca in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale.

Ciclo XXVI.

Università degli studi di Sassari.

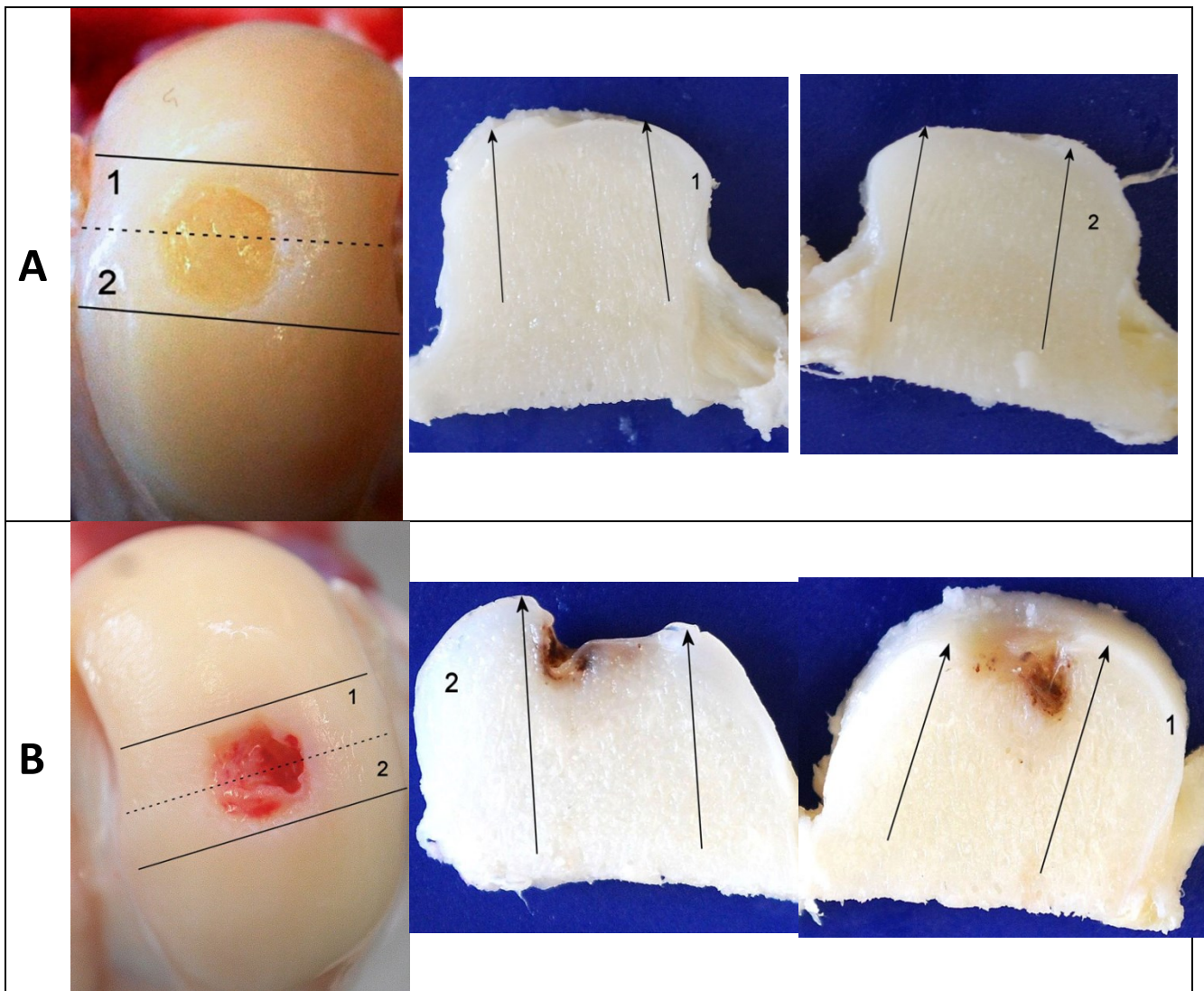


Fig.18 Aspetto macroscopico delle lesioni della pecora 1.

A . Condilo destro (trattato con Nanocer). La lesione appare ricoperta di tessuto di neoformazione di colore bianco imputabile a cartilagine neo formata. I margini della lesione originaria sono ancora distinguibili. La superficie neoformata appare uniforme, ma non completamente liscia. Sembra che il tessuto neoformato su un margine si stia portando a livello della cartilagine integra. Non vi sono segni di lesioni o rimaneggiamento osseo e l'osso subcondrale appare ricoperto da un sottile strato di tessuto neoformato di colore bianco.

B. Condilo sinistro (controllo). La lesione appare ancora evidente con esposizione dell'osso subcondrale che non è stato ancora ricoperto. Appare ancora in atto un intenso processo infiammatorio con la presenza di tessuto di granulazione e di una intensa vascolarizzazione sul fondo della lesione. Appare una profonda cavità su un margine della lesione che interessa in maniera rilevante l'osso subcondrale che risulta solo parzialmente ricoperto da tessuto neoformato.

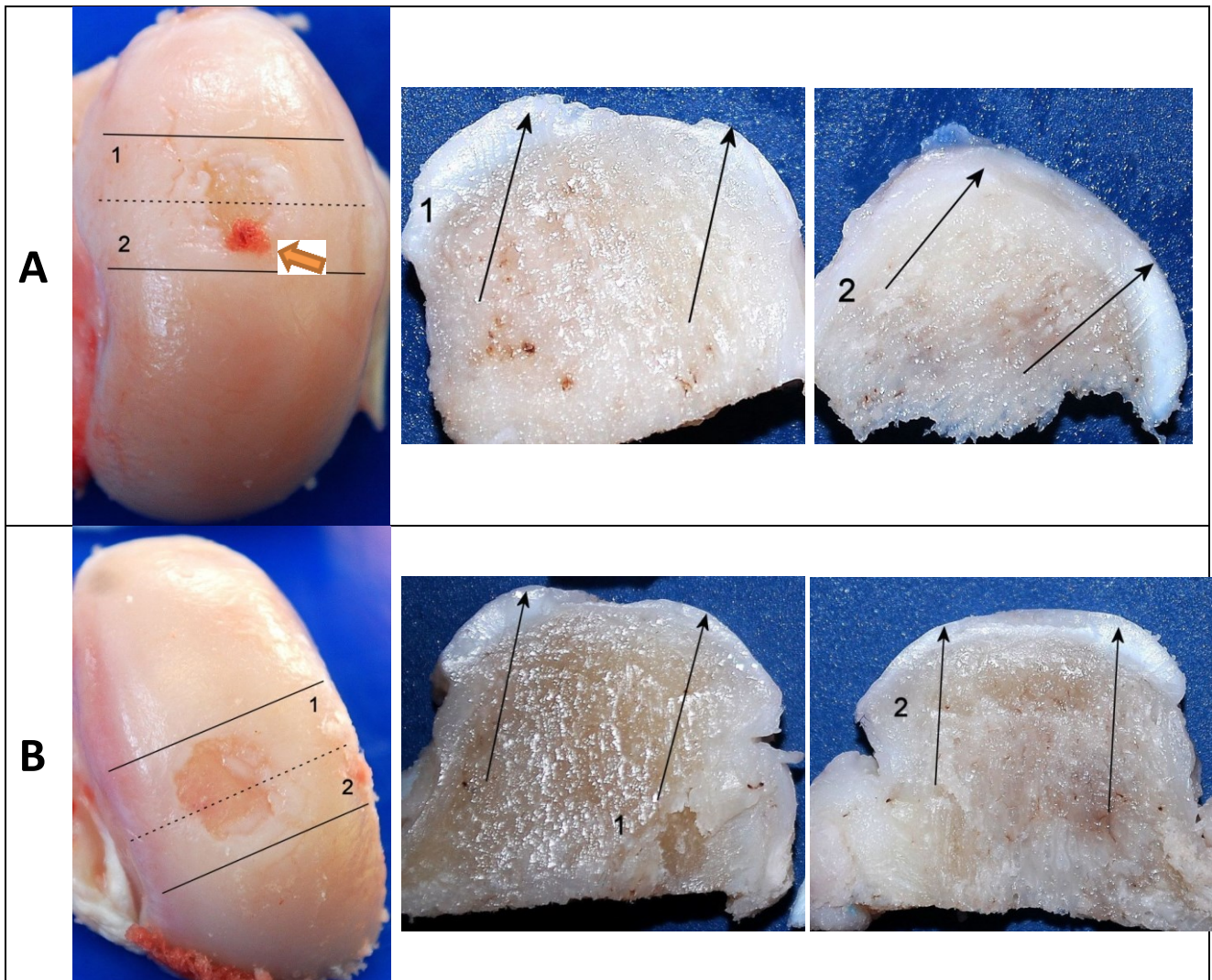


Fig.18 Aspetto macroscopico delle lesioni della pecora 4.

A . Condilo destro (trattato con Nanoceria). Segni di avanzato stadio rigenerativo e riempitivo della lesione tranne che in un piccolo punto centrale che evidenzia ancora il permanere di tessuto vascolarizzato (freccia verde). Il tessuto neoformato si forma sia a partire dal fondo sia a partire dai margini con buoni segni di integrazione. Permangono delle fessure e delle fibrillazioni. L'osso subcondrale appare integro e omogeneo, non si osservano cavità o lesioni di altra natura, il tessuto neoformato appare più sottile rispetto alla cartilagine sana.

B. Condilo sinistro (controllo). Lesione rivestita da tessuto neoformato di colore bianco. I margini appaiono irregolari con fessure e con una fase di rigenerazione periferica avviata, in particolare su un lato. L'osso subcondrale non appare interessato da processi riparativi ed è rivestito da un sottile strato di tessuto neoformato.

Valutazione istologica.

Sono in corso le valutazioni istologiche dei soggetti sacrificati a 6 mesi.

9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

L'obiettivo primario delle procedure di riparazione della cartilagine articolare dovrebbe essere il riempimento dei difetti e il ripristino della superficie articolare con il miglior tessuto di riparazione possibile. Lo sviluppo di un tessuto avente proprietà biomeccaniche a lunga durata, simili a quelle della cartilagine ialina, accompagnato da una piena integrazione con la cartilagine articolare circostante e l'osso subcondrale sottostante, si traduce in movimento libero dal dolore e previene la degenerazione artrosica.

Le lesioni articolari si distinguono in condrali e miste a seconda che coinvolgano esclusivamente la cartilagine articolare o che siano associate ad alterazioni dell'osso subcondrale.

Dal punto di vista dell'eziopatogenesi si differenziano in forme post-traumatiche, caratterizzate da un interessamento della trabecolatura dell'osso subcondrale (microfratture) e in forme degenerative, più gravi, che coinvolgono tutti i costituenti dell'articolazione. In questo caso, la cartilagine diventa meno elastica, perde le sue caratteristiche biologiche, e va incontro a una progressiva degenerazione strutturale. Questo elemento giustifica la continua ricerca di metodi che possano ripristinare una condizione funzionale o quantomeno ritardare la progressione della patologia.

Nonostante nell'uomo l'impianto di condrociti autologhi e di cellule staminali mesenchimali costituisca ormai una importante opzione terapeutica, sono diversi i limiti delle metodiche e i dubbi sui risultati a distanza. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare diverse metodiche di rigenerazione cartilaginea, prendendo in considerazione l'utilizzo di cellule staminali embrionali, l'utilizzo di fattori di crescita associati alle microfratture (PRP e ACP) e l'utilizzo di nanoparticelle ad attività antiossidante (Nanoceria) per modificare il microambiente articolare. Altre opzioni, quali l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali e la REAC terapia sono in corso di valutazione ma i tempi di *follow up* sono ancora troppo brevi per consentire considerazioni attendibili sulla possibile efficacia terapeutica delle opzioni o per effettuare confronti con altre tecniche.

Una delle difficoltà di questo lavoro è stata quella di cercare di ridurre al massimo le variabili che potessero condizionare i risultati, rappresentate non solo dalla tipologia dell'intervento o dell'operatore, ma anche dalle dinamiche della stabulazione certamente adattabili al gruppo ma, a

volte, non al singolo soggetto. Un'altra difficoltà è rappresentata dalla complessità della risposta biologica, condizionata dalle caratteristiche individuali, non sempre controllabili.

In ogni modo il campionamento ed i risultati consentono di elaborare delle conclusioni che possono rappresentare un momento di riflessione importante ed un supporto nella terapia per questa complessa patologia.

Le cellule staminali, come fonte di cellule per la rigenerazione della cartilagine articolare, sono considerate un fattore critico perché il tessuto della cartilagine articolare ha un basso turnover cellulare e non guarisce spontaneamente. Le cellule staminali adulte sono state isolate da vari tessuti, come il midollo osseo, il tessuto adiposo, il tessuto sinoviale, i muscoli e il periostio; tuttavia, tendono a differire nel loro potenziale condrogenico. Le cellule staminali totipotenti hanno invece una capacità proliferativa illimitata. La condrogenesi da staminali embrionali (ES) è attualmente un campo ancora soggetto a indagini, sia *in vitro* che *in vivo*.

Nell'esperimento del gruppo A abbiamo esaminato il processo di riparazione della cartilagine articolare nelle pecore dopo trapianto di cellule ES-like isolate dalle masse cellulari interne (ICMS), derivate da embrioni prodotti in vitro (IVP).

I campioni trattati con innesti ES-like hanno ottenuto il miglior punteggio per entrambi i periodi, mostrando un miglior processo di guarigione sia macroscopico che istologico. Tutte le colonie testate si sono fortemente colorate per gli anticorpi contro SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4, confermando la condizione indifferenziata delle cellule prima del trapianto. Non sono state rilevate differenze macroscopiche significative tra ES-like, ED e G in entrambi i periodi considerati. Tuttavia, una lieve tendenza verso punteggi più alti è stata rilevata in innesti ES-like, già a partire dai 6 mesi. Un campione ES-like a 12 mesi ha raggiunto il punteggio più alto possibile, indicando che il tessuto riparato era simile alla superficie articolare circostante per colore, superficie e lucentezza. Non è stato osservato nessun segno di osteoartrosi o infiammazione riconducibili al rifiuto dell'innesto. A causa della loro fase iniziale di sviluppo, le cellule ES sono considerate "*immune privileged*", cioè non riconoscibili dalle difese immunitarie del ricevente. Tuttavia, gli studi sull'uomo e sui ratti suggeriscono che, anche in uno stato indifferenziato, esprimono bassi livelli di antigeni di classe I del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), livello che aumenta moderatamente quando le cellule si differenziano (Swijnenburg, 2005; Dressel, 2008). Le cellule staminali in via di sviluppo possono essere quindi a rischio di rigetto immunitario se introdotte *in vivo* attraverso barriere di

istocompatibilità (Swijnenburg, 2005). Questo potrebbe essere spiegato col fatto che la cartilagine rappresenta il tessuto ideale per il trapianto perché i condrociti, essendo incorporati all'interno della matrice, sono protetti dalla risposta immunitaria; inoltre, la zona calcificata sembra funzionare come un'efficiente barriera contro l'invasione delle cellule immunitarie dell'ospite.

Anche se il nostro interesse non era quello di studiare lo sviluppo di teratomi dopo il trapianto delle cellule ES, alcune considerazioni meritano menzione. L'assenza di neoplasie nelle articolazioni o di modificazioni cellulari potrebbe essere legata al trapianto in un sito immuno-privilegiato e alla mancanza di un trattamento immunosoppressivo (Swijnenburg, 2005; Dressel, 2008). Tuttavia diversi altri fattori potrebbero aver contribuito a questo risultato, come ad esempio le caratteristiche delle cellule ES utilizzate, la specie e il sesso degli animali. Risultati simili sono stati ottenuti da Wakitani *et al.* (2004) con impianti di cellule ES in difetti osteocondrali; mentre in seguito all'iniezione delle cellule in cavità articolare si è osservato lo sviluppo di neoplasie (Wakitani, 2003). Questi ultimi autori hanno concluso che il diverso microambiente in cui le cellule ES vengono impiantate ne influenza fortemente il comportamento. L'importanza del microambiente sulla differenziazione delle cellule staminali è spesso riportata da numerosi autori (Wakitani, 2004; Frosch, 2006; Atala, 2007; Bajada, 2008): si ipotizza che, in condizioni sperimentali, le fonti nutrizionali e le sollecitazioni meccaniche legate al sito degli impianti potrebbero avere influenzato positivamente il comportamento delle cellule, sia in termini di insorgenza di tumori che nell'attività condrogenica. Esiste infatti un rischio ridotto di malignità per le proprietà anti-angiogeniche dei condrociti normali.

La valutazione istologica non ha rivelato differenze statistiche tra i gruppi di trattamento. Le ES-like hanno dimostrato una risposta riparativa più veloce e più organizzata già dai 6 mesi post-chirurgia. Questi dati suggeriscono che le cellule ES-like stimolano il processo riparativo in termini di una migliore organizzazione e produzione tissutale, in conformità con quanto affermato da Wilke *et al.* (2007). Tuttavia, anche il gruppo ED ha ottenuto un buon punteggio, molto vicino a ES. Le spiegazioni per questa similitudine includono: lo spessore e le dimensioni di difetti, i tempi di valutazione e il numero di cellule trapiantate. I difetti a tutto spessore hanno permesso un'invasione di tessuto di granulazione dalla spongiosa lungo le pareti; questo ha portato all'invasione e alla colonizzazione di vasi e di cellule mesenchimali immature con potenziale

osteogenico e condrogenico, rendendo possibile un processo di riparazione simile in entrambi i gruppi.

Secondo quanto riportato in letteratura, grandi difetti cartilaginei, come quello impiegato in questo studio, normalmente si riempiono di fibrocartilagine (Buckwalter e Mankin, 1998). I difetti del condilo femorale delle pecore del gruppo A contenevano invece anche cartilagine ialina, come suggerito da Akens (2001). La necessità di un congruo periodo di tempo tra la chirurgia e la valutazione è un ulteriore elemento da valutare con grande attenzione, anche se la maggior parte degli autori riportano i risultati a 6 e 12 mesi (Vasara, 2004; Erggelet, 2007; Mrugala, 2008). Si ritiene che 12 mesi non siano sufficienti per valutare il processo di guarigione completo in difetti della cartilagine articolare. In questo modello sperimentale il numero limitato di embrioni disponibili ha necessariamente limitato l'uso a circa 700.000 cellule per ciascun difetto, numero relativamente piccolo in confronto a studi su altre specie animali (Wakitani, 1989, 1994, 2003; Wilke, 2007; Nakajima, 2008). Nonostante il numero relativamente piccolo di cellule ES, sembra comunque interessante sottolineare che i processi di riparazione nei condili trattati con ES hanno raggiunto un punteggio più alto e, in un caso, il difetto è apparso quasi completamente guarito. A nostro avviso, il numero di cellule necessarie per il trapianto può variare notevolmente in relazione alla fonte delle cellule staminali. Infatti le cellule ES-like, totipotenti, dimostrano una maggiore efficienza nel differenziarsi verso una linea cellulare specifica rispetto a cellule staminali mesenchimali multipotenti.

I difetti articolari trattati con colla di fibrina (G) hanno mostrato un tentativo di guarigione inferiore. Questo risultato può essere dovuto al sito scelto per la somministrazione, rappresentato dal condilo laterale, che ha un carico minore durante la locomozione rispetto ai condili mediali. La compressione delle superfici articolari e il movimento inducono il flusso bidirezionale di soluti necessari per la nutrizione della cartilagine, stimolando in tal modo un graduale e sequenziale accumulo di tessuto di granulazione osteogenico. Tutti questi fenomeni possono essere ridotti nel condilo laterale. Tuttavia, nelle nostre condizioni sperimentali, il diverso ambiente biomeccanico assegnato ai campioni G è stato il risultato di un compromesso tra la variabilità degli animali e la necessità di ottenere condizioni biomeccaniche identiche per tutti i difetti condilari per i diversi trattamenti.

Negli innesti ES, il tessuto predominante a livello dei difetti a 6 mesi era fibrocartilagine, sostituita da cartilagine ialina immatura a 12 mesi. Ciò nonostante, gli innesti ES hanno mostrato, rispetto ai campioni ED e G, un'architettura più organizzata che, in un caso, era paragonabile alla normale cartilagine ialina in termini di distribuzione delle cellule e orientamento delle fibre di collagene. A 6 mesi dopo la chirurgia il collagene tipo II era prevalentemente osservabile verso la base del difetto, mentre a 12 mesi era presente anche a livello superficiale, confermando quindi la rigenerazione della cartilagine ialina in tutti i gruppi di trattamento. I livelli dei proteoglicani della matrice sono aumentati a 12 mesi, anche se non si è verificata una completa riparazione della matrice. È stata rilevata intorno ai difetti una debole colorazione, in accordo con Hurtig *et al.* (1987), che ha suggerito che il basso livello di proteoglicani intorno ai difetti potrebbe essere spiegato dalla presenza di cartilagine ipocellulare nel perimetro dei difetti, più lenta a sostituire la propria matrice.

Un parametro fondamentale del trapianto è la zona di transizione tra il trapianto e il tessuto ospite con un divario tra questi che è probabilmente responsabile dell'inizio della degenerazione della cartilagine (Waselau, 2005). Nei campioni istologici di questo studio, la continuità tra la cartilagine dell'ospite e il tessuto neoformato era presente in tutti i campioni, anche se imperfetta nella maggior parte di questi. Secondo alcuni autori (Hunziker e Kapfinger, 1998; Caplan, 1997) la persistenza di questa discontinuità potrebbe essere attribuita alle proprietà anti-adesione dei proteoglicani all'interno della matrice. Utilizzando l'IHS, oltre a dimostrare che il tessuto di riparazione dei campioni ES derivava dalle cellule maschili trapiantate, è stato possibile seguire la distribuzione e l'evoluzione morfologica delle cellule trapiantate. A 6 mesi le cellule ES-like hanno mostrato un aspetto condroblasto-simile ed erano distribuite in tutto il difetto, mentre alla base di questo si è osservata una formazione di tessuto osseo proveniente da cellule ospiti. A 12 mesi il numero di cellule embrionali è diminuito e sono state rilevate solo in alcuni condrociti a livello della cartilagine ialina. Ciò è in accordo con Caplan *et al.* (1997), che ha mostrato come, nell'istogenesi della cartilagine articolare, il tessuto derivante dal mesenchima, nella fase di sviluppo della cartilagine, mantiene i condrociti in superficie, mentre i condrociti centrali passano alla fase ipertrofica prima di essere sostituiti da osso, vasi e da una seconda ondata di progenitori, che si differenziano in osteoblasti. Così, per rigenerare un difetto a tutto spessore, la massa di cellule progenitrici deve essere impiantata in tutto il difetto, per consentire sia l'avanzamento sulla

superficie articolare, sia alla base del difetto. Per questo motivo, nel nostro esperimento probabilmente le cellule ES-like utilizzate non sono state sufficienti a riempire completamente il difetto. In conclusione, questo studio dimostra che le cellule ES-like, trapiantate in difetti cartilaginei in condili femorali di pecore, sono in grado di rigenerare cartilagine ialina articolare senza formare teratomi. Tuttavia, si potrebbero avere risultati più chiari con un maggior numero di animali trapiantati e cellule trasferite, insieme ad un più ampio intervallo post-operatorio.

Accanto alle più recenti terapie a base di cellule staminali (mesenchimali e embrionali), tuttora in fase di studio e di definizione, ma ancora lontane dall'applicazione clinica, nel trattamento dei difetti focali della cartilagine articolare sia acuti che cronici vengono utilizzati approcci conservativi, che mirano esclusivamente a ridurre il dolore. Le opzioni chirurgiche per lesioni condrali includono per esempio procedure di stimolazione ossea, come le microfratture. Tali misure stabiliscono una comunicazione tra il difetto cartilagineo e il midollo osseo, permettendo alle MSC di migrare dall'osso subcondrale sottostante verso il difetto.

Una revisione sistematica della letteratura sull'efficacia clinica delle microfratture ha mostrato un buon miglioramento dal punto di vista clinico, seppure a breve termine, oltre ad una variabilità elevata per quanto riguarda il grado di riempimento del difetto cartilagineo. Un follow-up più lungo ha mostrato un declino funzionale e un alto tasso di fallimento.

Diversi studi sperimentali *in vitro* hanno dimostrato come le BMSCs abbiano un alto potenziale di differenziazione condrogenica. Tuttavia, studi *in vivo*, hanno dimostrato che le BMSCs, sia sospese che impiantate su scaffolds, hanno indotto la guarigione di difetti cartilaginei mediante la formazione di tessuto fibrocartilagineo. Per questa ragione, molti ricercatori hanno concentrato i loro sforzi per migliorare le qualità meccaniche e biochimiche del tessuto di riparazione ottenuto dopo le microfratture.

Alcuni autori hanno dimostrato che scaffolds biocompatibili, biologici o sintetici, potrebbero migliorare la differenziazione condrogenica delle BMSCs derivate dalle microfratture (Kang, 2008; Wegener, 2009). Studi *in vitro* hanno dimostrato che la condrogenesi può essere stimolata anche da alcuni fattori di crescita, come i TGF β 8,9,13,16,17, i BMP 2, 4, 6, e 7, e gli FGF 2; altri autori hanno combinato l'uso di scaffolds e fattori di crescita per migliorare la cartilagine di riparazione dopo le microfratture.

I fattori di crescita (GF) possono avere potenziali effetti terapeutici sulle lesioni condrali attraverso numerosi meccanismi, tra cui il reclutamento delle cellule condrogeniche (chemiotassi), la stimolazione della proliferazione delle cellule condrogeniche (mitogenesi), la sintesi della matrice cartilaginea e la secrezione di acido ialuronico. Una delle fonti più rilevanti dei suddetti fattori di crescita è rappresentata dalle piastrine.

I GF rilasciati al momento dell'attivazione piastrinica includono fattori di crescita piastrino-derivati (PDGF- $\alpha\alpha$, PDGF- $\beta\beta$, e isomeri PDGF- $\alpha\beta$), fattori di crescita trasformanti (TGF- β , TGF β 1 e isomeri TGF/ β 1), fattore di angiogenesi piastrino-derivato (PDAF), fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), fattore di crescita epidermico (EGF), fattore di crescita endoteliale piastrino-derivato (PDEGF), fattore di crescita epiteliale delle cellule (ECGF) e il fattore di crescita insulino-simile (IGF-I).

L'ipotesi principale di questo studio è che l'uso intrarticolare di PRP dopo le microfratture possa migliorare il tasso di formazione e la qualità del tessuto di riparazione rispetto alla sola procedura delle microfratture. L'uso di PRP, infatti, presenta diversi vantaggi: innanzitutto, la preparazione è semplice, veloce, economica e può rappresentare una valida opzione terapeutica da impiegare senza alcuna approfondita pianificazione preoperatoria. Inoltre, può essere utilizzato come unico trattamento senza che siano necessarie cellule in coltura, in quanto agisce sulle cellule che arrivano al difetto dalle microfratture. Infine, non necessita di alcuno scaffold supplementare che, oltre ai costi, implica un rischio potenziale di reazione infiammatoria e una tecnica chirurgica più complessa non sempre adatta per una procedura mini-invasiva.

La preparazione più conosciuta di concentrati piastrinici (PC) è il plasma ricco di piastrine (PRP), definito come un componente autologo del sangue con concentrazioni di piastrine al di sopra dei valori basali. Il PRP viene preparato tramite la raccolta di un campione di sangue autologo con anticoagulante e utilizzando una centrifuga o un filtro per separare i globuli rossi da leucociti e piastrine. Con un'ulteriore concentrazione, il plasma viene diviso in porzioni povere di piastrine e ricche di piastrine. La sua combinazione con cloruro di calcio e/o con trombina, immediatamente prima dell'iniezione, avvia l'attivazione piastrinica, la formazione di coaguli, e il rilascio di GF nel sito. L'ACP differisce dalla PRP per alcuni aspetti procedurali: in primo luogo, la quantità di prelievo di sangue (10 ml) è molto inferiore a quella suggerita per molte preparazioni PRP (circa 50 mL); in

secondo luogo, la preparazione di ACP richiede solo 1 centrifugazione del sangue, con minore rischio di contaminazione.

I potenziali benefici dei PC nella riparazione della cartilagine sono ben documentati in letteratura. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il PRP migliora la proliferazione e la differenziazione condrogenica di MSC, così come la proliferazione e l'attività anabolizzante di colture di condrociti. Studi *in vivo* hanno confermato un significativo effetto positivo di PC sulla riparazione e formazione della cartilagine.

Akeda *et al* (2006), in uno studio sperimentale su modello suino, hanno dimostrato che condrociti, coltivati in un mezzo contenente 10% di PRP autologo, hanno subito un piccolo ma significativo aumento dell'attività metabolica e proliferativa. Drengk *et al.* (2009) hanno mostrato che il PRP ha avuto un effetto primario su condrociti che hanno mantenuto un fenotipo stabile; tuttavia hanno rivelato un piccolo ma consistente effetto positivo sulla proliferazione e sulla differenziazione condrogenica delle BMSCs. Frisbie *et al* (2007) hanno somministrato siero autologo condizionato (ACS) in cavalli con OA indotta sperimentalmente, ottenendo un significativo miglioramento clinico della zoppia, diminuzione dell'iperplasia della membrana sinoviale, minore gravità della fibrillazione della cartilagine ed emorragia della membrana sinoviale e un aumento nel liquido sinoviale della concentrazione di IL-1, antagonista del recettore. Saito *et al.* (2009) hanno documentato gli effetti preventivi contro la progressione di OA con la somministrazione di microsfele di gelatina idrogel contenenti PRP in un modello di coniglio.

Infine, studi clinici hanno confermato l'efficacia dei PC sulle lesioni della cartilagine articolare. Baltzer *et al* (2009) hanno valutato 310 pazienti con artrosi del ginocchio in uno studio prospettico, randomizzato e controllato, confrontando l'esito clinico di iniezioni intra-articolari di ACS, acido ialuronico e soluzione fisiologica (placebo), e hanno osservato risultati notevolmente migliori per il gruppo trattato con ACS a 2 anni di follow-up. Filardo *et al* (2011) hanno trattato con iniezioni intra-articolari di PRP 90 pazienti affetti da una condizione degenerativa cronica del ginocchio: il risultato clinico è rimasto stabile dalla fine della terapia per 6 mesi di follow-up, mentre è progressivamente peggiorato fino a 24 mesi dopo il trattamento, anche se ancora significativamente migliore rispetto alla valutazione di riferimento iniziale.

Secondo questi studi, i concentrati piastrinici potrebbero quindi promuovere efficacemente la riparazione della cartilagine migliorando i risultati ottenuti con le singole microfratture.

L'ipotesi principale di questo studio è che l'uso intrarticolare di PRP e ACP dopo le microfratture possa migliorare il tasso di formazione e la qualità del tessuto di riparazione rispetto alla sola procedura delle microfratture.

I risultati del gruppo B hanno dimostrato che l'uso combinato di PRP e microfratture ha determinato la formazione di un tessuto di riparazione più competente dal punto di vista meccanico e istologicamente differenziato. Inoltre, nel confronto dei due differenti preparati di PRP, abbiamo osservato che il gel solido applicato sul difetto condrale è risultato più efficace della soluzione liquida iniettata in articolazione, determinando risultati meccanici e istologici migliori, pur senza una differenza significativa, fatta eccezione per il riempimento dei difetti e per l'integrazione col tessuto dell'ospite. L'uso di colla di fibrina è stato precedentemente segnalato come vettore per condrociti e BMSCs (Ting, 1998; Xu, 2004).

Nel presente studio, non abbiamo usato la colla di fibrina come impalcatura per la semina delle cellule, ma questa è stata mescolata al PRP per migliorare la capacità adesiva e la consistenza del gel e per ridurre il rischio di dispersione del PRP in articolazione.

I risultati biomeccanici hanno dimostrato che il tessuto di riparazione ottenuto nel gruppo trattato con PRP-gel non era significativamente diverso dalla cartilagine normale e si presentava più rigido rispetto a quello osservato nel gruppo trattato con PRP liquido e nel gruppo di controllo. Tuttavia l'analisi istologica ha rivelato che nessuno dei trattamenti sperimentali ha determinato la formazione di cartilagine ialina. Il tessuto osservato nel gruppo trattato con PRP-gel era migliore di quello osservato nel gruppo PRP liquido; tuttavia, vi era una grande quantità di cellule in cluster e piccole, ma profonde fissurazioni e istologicamente non è stata confermata l'integrazione con la cartilagine sana circostante osservata all'esame macroscopico. Questi risultati potrebbero rappresentare un fattore prognostico negativo per la sopravvivenza a lungo termine. La presenza di zone poco colorate con la colorazione safranina-O era indicativa di una limitata attività metabolica cellulare e di una scarsa qualità della matrice extra-cellulare. La risposta riparativa osservata nel gruppo trattato con PRP liquido era migliore di quella osservata nel gruppo di controllo, tuttavia le differenze tra i due gruppi non sono state significative per quanto riguarda la valutazione biomeccanica.

Uno dei limiti della preparazione PRP è che il metodo non è standardizzato. Nei diversi studi sull'uso di PRP per la riparazione tissutale sono segnalate differenze per quanto riguarda la

centrifugazione, la quantità di sangue raccolto e la quantità di PRP ottenuta; inoltre è stata osservata una grande variabilità di concentrazione dei GF (Leitner, 2006). Non è ancora chiaro se gli effetti del PRP sulla proliferazione e differenziazione cellulare siano dose-dipendenti.

Nel gruppo B, abbiamo realizzato un modello sperimentale di difetto condrale cronico, senza instabilità articolare. Al momento del trattamento riparativo è stato eseguito il courettage della lesione, simulando ciò che di solito si effettua durante una procedura di microfrattura, in modo da creare un modello di lesione cronica generalmente osservata nella pratica clinica durante il trattamento di questo tipo di lesioni.

Ciò nonostante, non abbiamo quantificato i markers di degradazione della cartilagine e la risposta infiammatoria associata al danno condrale cronico e non sappiamo se la risposta riparativa può essere influenzata dai tempi della lesione. Lo studio presenta ulteriori limiti. Innanzitutto non è stata effettuata una valutazione istologica al tempo zero (prima del secondo intervento) per valutare l'eventuale risposta riparativa spontanea alla lesione condrale. In secondo luogo, il follow-up è stato troppo breve per valutare i risultati di un trattamento che ha mostrato un deterioramento costante nel tempo. In terzo luogo, non abbiamo a disposizione una prova diretta dell'effetto condrogenico del PRP, in quanto lo scopo dello studio era limitato a valutare la risposta riparativa dopo il trattamento con le microfratture con e senza PRP. Infine, non abbiamo verificato la ritenzione del PRP gel nel difetto quindi, non sappiamo se un eventuale allontanamento del gel dalla lesione abbia giocato un ruolo nel limitare l'efficacia di questo trattamento.

In ogni caso, l'utilizzo del PRP combinato con microfratture per il trattamento di difetti focali cronici ha un tessuto di riparazione che mostra migliori risultati macroscopici, meccanici e istologici rispetto a quelli osservati nei soggetti trattati con PRP liquido. Comunque, nessuno dei trattamenti sperimentali ha prodotto cartilagine ialina.

Come più volte affermato, la terapia infiltrativa con concentrati piastrinici è stata utilizzata con successo per il trattamento dell'osteoartrosi del ginocchio. Tuttavia, pochi studi hanno indagato l'effetto di iniezioni intra-articolari ripetute di concentrati piastrinici sulla riparazione della cartilagine articolare dopo microfratture. Lo scopo dell'esperimento sul gruppo C è stato appunto quello di valutare gli aspetti biomeccanici e istologici del tessuto di riparazione dopo microfratture

con e senza iniezioni ripetute di ACP. La nostra ipotesi era che l'ACP potesse migliorare la risposta riparativa dopo microfratture a confronto con la sola tecnica delle microfratture.

I risultati del nostro studio hanno mostrato che i riscontri macroscopici e i reperti istologici del tessuto di riparazione nel gruppo trattato con ACP erano significativamente migliori rispetto a quelli osservati nel gruppo trattato con le sole microfratture, ad ogni intervallo di tempo. L'analisi dell'effetto del tempo sulla riparazione dei tessuti all'interno dei gruppi ha mostrato che, nel gruppo trattato con ACP, la riparazione è progredita fino a 6 mesi arrivando ad uno stato stazionario, senza variazioni significative a 12 mesi. Il gruppo delle microfratture ha mostrato una maggiore risposta riparativa oltre i 6 mesi: successivamente è stato osservato un deterioramento della qualità del tessuto di riparazione; entrambi i trattamenti non sono stati in grado di ripristinare la normale cartilagine ialina.

Studi con modelli sperimentali simili al nostro hanno dimostrato un miglioramento istologico del tessuto di riparazione utilizzando la combinazione di microfratture con scaffolds sintetici, liberi o aggiunti a colture di condrociti, ma anche in questi lavori, nessuno ha riportato una formazione di cartilagine ialina.

I risultati della valutazione biomeccanica hanno mostrato che l'uso di ACP ha migliorato le caratteristiche meccaniche del tessuto di riparazione, che ha raggiunto una rigidità media simile a quella della cartilagine normale a 6 mesi per poi mantenere il risultato a 12 mesi di follow-up. Anzi, nel gruppo delle microfratture, la rigidità è aumentata progressivamente fino ai 6 mesi, per poi diminuire col tempo. Questi dati possono avere un'importante rilevanza clinica perché una qualità biomeccanica inferiore del tessuto di riparazione della cartilagine contribuisce al degrado del tessuto prima del tempo; questo può essere un fattore implicato nel declino funzionale e nel crescente tasso di fallimento osservato in medicina umana. Le discrepanze tra risultati istologici e biomeccanici osservati nel nostro studio possono spiegare la mancanza di associazione tra la qualità istologica del tessuto di riparazione e i punteggi dei risultati funzionali riportati negli studi umani. Il miglior comportamento meccanico osservato nel gruppo trattato con ACP potrebbe dipendere dal volume di riempimento della cartilagine in riparazione, che era significativamente maggiore nel gruppo trattato con ACP in ciascun intervallo di tempo. Potenziali errori di valutazione di questi dati potrebbero essere legati alla forte formazione ossea subcondrale a 6 e 12 mesi, osservato nel gruppo trattato con ACP. Secondo quest'ipotesi, una crescita eccessiva

dell'osso ha contribuito al riempimento del difetto, anche se la riparazione cartilaginea era più sottile rispetto al tessuto originario, producendo così valori medi di rigidità elevati sui test meccanici.

Sebbene questo fenomeno sia già stato segnalato dopo procedure di microfratture con rimozione della cartilagine calcificata, sarebbero necessarie ulteriori indagini per valutare questo problema. In accordo con i risultati del nostro studio, può essere ipotizzato che iniezioni intra-articolari ripetute di ACP possano migliorare la risposta riparativa di difetti focali a tutto spessore della cartilagine articolare dopo le microfratture, rispetto a procedure di microfratture isolate, e possano anche aumentare la durata della riparazione tissutale nel tempo.

A differenza del gruppo B, in cui il PRP è stato somministrato una sola volta al termine della procedura chirurgica e non è stato ripetuto nel tempo, la somministrazione ripetuta di ACP nel gruppo C potrebbe avere un'importante rilevanza clinica, in quanto non richiede alcun intervento chirurgico aggiuntivo. Inoltre, se ripetute nel tempo, le iniezioni di ACP potrebbero garantire una risposta riparativa e prevenire ulteriori modifiche degenerative nel tessuto di riparazione.

Tuttavia, iniezioni intra-articolari multiple implicano un aumento potenziale del rischio di infezione. La scelta di effettuare 5 iniezioni è basata sull'evidenza scientifica che la fibrocartilagine non è evidente nei difetti fino alla quarta settimana post chirurgia. Quindi trattamenti ripetuti con ACP durante il primo mese indurrebbero la formazione e la differenziazione tissutale precoce.

Difficile generalizzare e confrontare risultati sull'efficacia dei diversi concentrati piastrinici. Anche se l'ACP utilizzata in questo studio ha mostrato una concentrazione piastrinica inferiore a quella suggerita come ottimale, non è ancora chiaro se gli effetti dei PC sulla proliferazione e differenziazione cellulare siano dose-dipendenti e correlati alle piastrine o alla concentrazione dei GF.

Le problematiche da approfondire, soprattutto per una possibile proposizione in medicina umana, riguardano l'efficacia dei trattamenti proposti su difetti più grandi o modifiche degenerative estese della cartilagine articolare, così come osservato in ginocchia artrosiche, non valutate né valutabili nel presente studio. In secondo luogo, è bene prevedere, nel prossimo futuro, analisi su altre strutture articolari, quali il rivestimento sinoviale, legamenti, menischi e cartilagine nativa per indagare gli effetti negativi dei trattamenti su tessuti sani. In terzo luogo, per quanto possibile, analizzare il contenuto di GF nei diversi protocolli utilizzati. Questo è un problema rilevante, in

quanto la correlazione tra la concentrazione piastrinica e il rilascio in situ di GF non è chiaramente prevedibile.

I risultati del gruppo "D" osservati sono riferibili esclusivamente ad osservazioni macroscopiche e, come tali, sono da considerarsi preliminari e incompleti. Infatti, l'esame istopatologico e immunoistochimico, oltre a dare una visione di insieme completa sullo stadio di riparazione del tessuto, spesso svela aspetti e dettagli non osservabili macroscopicamente, determinando un allontanamento o un ravvicinamento degli scores tra i vari campioni osservati. I risultati a 6 mesi testimoniano come il processo di riparazione sia ancora in corso, non ben definito e con piccole differenze nel tipo di rigenerazione avendo scores piuttosto ravvicinati. In prima battuta è evidente un leggero vantaggio del gruppo trattato rispetto a quello non trattato, con una variabilità maggiore nell'avanzamento del processo riparativo del gruppo controllo rispetto al gruppo trattato. In quest'ultimo invece si osservava una rigenerazione migliore e più omogenea nei soggetti esaminati. Si è anche evidenziata una maggiore vascolarizzazione nei soggetti non trattati ma, anche tale dato, va confermato dall'osservazione istologica.

In conclusione possiamo dire che i risultati ottenuti, sebbene non definitivi, offrono delle buone aspettative per il futuro. Sarà infatti necessario estendere le osservazioni a periodi più lunghi, poichè è ormai chiaro che il processo di riparazione della cartilagine necessita di periodi che superano i 12 mesi di follow up, aumentare la casistica e limitare al massimo le variabili per valutare in maniera più completa l'esito dei processi riparativi.

BIBLIOGRAFIA

- Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. (2009) Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis and cartilage* , 17(6), 705-713.
- Ahmed N, Gan L, Nagy A, Zheng J, Wang C, Kandel R A. (2009) Cartilage tissue formation using redifferentiated passaged chondrocytes in vitro. *Tissue Eng*, 665-673. Part(3).
- Ahmed N, Taylor D W, Wunder J, Nagy A, Gross A E, Kandel R A. ((2010)) Passaged human chondrocytes accumulate extracellular matrix when induced by bovine chondrocytes. *J Tissue Eng Regenerative Med*, 4(3):233-241.
- Aicher WK, Buhring HJ, Hart M, Rolauffs B, Badke A, Klein G. (2011) Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells e potential and pitfalls. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(4-5) : 342-351.
- Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ, Masuda K. (2006). Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *OsteoArthritis and cartilage*, 14(12), 1272-1280.
- Akens MK, Von Rechenberg B, Bittmann P, Nadler D, Zlinszky K, Auer JA. (2001). Long term in-vivo studies of a photo-oxidized bovine osteochondral transplant in sheep. *BMC musculoskeletal disorders*, 2(1), 9.
- Albrecht FH. (1983) Closure of joint cartilage defects using cartilage fragments and fibrin glue. *Fortschr Med*, 101(37): 1650-1652.
- Amatori A.M. Impianto di cellule staminali embrionali in lesion cartilaginee sui condili femorali di pecora : osservazioni istopatologiche, immunoistochimiche e in ibridazione in situ. Dipartimento di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Sassari. A.A. 2012-2013
- Amin KA, Hassan M S, Awad S T, Hashem K S. (2011) The Protective Effects of Cerium Oxide Nanoparticles against Hepatic Oxidative Damage Induced by Monocrotaline. *Int. J. Nanomed*, 6, 143-149.
- An YH, Freidman RJ. (1999) *Animal Models in Orthopaedic Research*. CRC Press LLC.
- Anitua E, Sánchez M, Nurden AT et al. (2007) Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford)* , 46:1769-1772
- Anraku Y, Mizuta H, Sei A, et al. (2009) Analyses of early events during chondrogenic repair in rat full-thickness articular cartilage defects. *J Bone Miner Metab*,27(3):272–286.
- Anraku Y, Mizuta H, Sei A, et al. (2008) The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage*,16(8):961–964.
- Arinzeh TL. (2005) Mesenchymal stem cells for bone repair: preclinical studies and potential orthopedic applications. *Foot Ankle Clin*,10(4):651–65, VIII.
- Aroen LS, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L (2004) Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med*, 32, 211–215.

- Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, Matsukawa M, Hamanisi C. (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes: involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res*, 50(1): 19-23.
- Atala A. (2007). Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med* 1: 83–96.
- Athanasiou K A, Darling E M, Hu J C. (2009) Articular cartilage tissue engineering. Athanasiou KA, editor. In: *Synthesis lectures on tissue engineering*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool.
- Aubin P P, Cheah H K, Davis A M, Gross A E. (2001) Long-term followup of fresh femoral osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop Relat Res*,(391 Suppl):S318-327.
- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(4), 169-183.
- Ball S T, Amiel D, Williams SK, Tontz W, Chen A C, Sah R L, Bugbee W D. (2004) The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. *Clin Orthop Relat Res*,418:246–252.
- Baltzer AW, Moser C, Jansen SA, Krauspe R. (2009) Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*;17:152-160.
- Barnewitz D, Endres M, Kruger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, et al. (2006) Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials*, 27: 2882-2889.
- Barry F P, Murphy J M. (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and bio-logical characterization. *Int J Biochem Cell Biol*,36(4):568–584.
- Bedi A, Feeley B T, Williams R J. (2010) Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am*,92(4):994-1009.
- Bentley G, Biant L C, Carrington R W J, Akmal M, Goldberg A, Williams A M, Pringle J.(2003) A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 85(2), 223-230.
- Bertone A L, Bramlage L R, McIlwraith C W, Malemud C L. (2005) Comparison of proteoglycan and collagen in articular cartilage of horses with naturally developing osteochondrosis and healing osteochondral fragments of experimentally induced fractures. *Am J Vet Res*,66: 1881-1890.
- Bhosale A M, Richardson J B. (2008) Articular cartilage : structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, 87: 77-95
- Blake DR, Winyard PG, Marok R. (1994) The contribution of hypoxia-reperfusion injury to inflammatory synovitis. *Ann NY Acad Sci* , 723: 308-317,.
- Bos PK, Van Melle M L, Van Osch G J V M. (2010) Articular cartilage repair and the evolving role of regenerative medicine. *Open Access Surg* , 3 109-22.

- Bouwmeester P, Kuijjer R, Homminga GN, Bulstra SK, Geesink R. (2002) A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery. *J Orthop Res*,20:267-273.
- Brandl A, Angele P, Roll C, Prantl L, Kujat R, Kinner B. (2010) Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. *J. Orthop. Res.*, 28, 354–360.
- Brehm W, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trub T, Jakob RP, et al. (2006) Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffoldfree cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term. *Osteoarthritis Cartilage*,14:1214-1426.
- Breinan HA, Minas T, Hsu H, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M. (2001) Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res*,19:482-489.
- Breinan HA, Minas T, Hsu H, Nehrer S, Sledge B, Spector M. (1997) Effects of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg*,79:1439-1451.
- Brittberg, M. et al. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889–895
- Buckley C T, Kelly D J. (2012) Expansion in the presence of FGF-2 enhances the functional development of cartilaginous tissues engineered using infrapatellar fat pad derived MSCs. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 11, 102–111.
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. (2005) Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*,54:465-480.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. (1997). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures*, 47, 477-486.
- Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB (1990) Articular cartilage: composition, structure, response to injury, and methods to facilitating repair. In Whit EJ (ed) *Articular Cartilage and Knee Joint Function. Basic Science and Arthroscopy*. New York, NY: Raven Press, 19–56.
- Bugbee WD. (2002) Fresh osteochondral allografts. *J Knee Surg.*,15: 191-195.
- Buket Basmanav F, Kose GT, Hasirci V. (2008) Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 4195–4204.
- Buma P, Pieper JS, vanTienen T, van Susante JC, van der Kraan PM, Veerkamp JH, et al. (2003) Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects: a study in rabbits. *Biomaterials*,24:3255-3263.
- Butterfield DA. (2002) Amyloid B-Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease Brain. A Review. *Free Radical Res.*, 36, 1307-1313.
- Cahill BR (1995) Osteochondritis dissecans of the knee: treatment of juvenile and adult forms. *J Am Acad Orthop Surg*, 3, 237–247.

- Caldwell R B, Bartoli M, Behzadian M A, El-Remessy A E, Al- Shabrawey M, Platt D H, Caldwell R W. (2003) Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetic Retinopathy: Pathophysiological Mechanisms and Treatment Perspectives. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 19, 442-455.
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. (1997) Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res.*,342:254–269.
- Caplan AI. (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 213(2):341–347.
- Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. (2011) Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*, Apr,3(4):1411-20.
- Celardo I, Traversa E, Ghibelli L. (2011) Cerium Oxide Nanoparticles: a Promise for Applications in Therapy. *J. Exp. Therap. Onco*, 9, 47-51.
- Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S, Zhang J. (2013) Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* Jul,154(1):156-66
- Chen H, Chevrier A, Hoemann C D, Sun J, Ouyang W, Buschmann M D. (2011). Characterization of subchondral bone repair for marrow-stimulated chondral defects and its relationship to articular cartilage resurfacing. *The American journal of sports medicine*, 39(8), 1731-1740.
- Chen H, Hoemann C D, Sun J, Chevrier A, McKee M D, Shive M S, Buschmann M D. (2011). Depth of subchondral perforation influences the outcome of bone marrow stimulation cartilage repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(8), 1178-1184.
- Chen J, Patil S, Seal S, Mcginnis J F. (2006) Rare Earth Nanoparticles Prevent Retinal Degeneration Induced by Intracellular Peroxides. *Nat. Nanotech.*, 1, 142-150.
- Chen J, Patil S, Seal S., Mcginnis J F. (2008) Nanocerium Particles Prevent ROI-Induced Blindness. *Adv. Exp. Medi. Biol.* , 613, 53-59.
- Chiang H, Kuo T, Tsai C, Lin M, She B, Huang Y, et al. (2005) Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res*,23:584-593.
- Cho W, Webster SG, Blau H. (1993) Evidence for myoblast-extrinsic regulation of slow myosin heavy chain during muscle fiber formation in embryonic development. *J Cell Biol* 121: 795–810.
- Chu CR, Convery FR, Akeson WH, Meyers M, Amiel D. (1999) Articular cartilage transplantation. Clinical results in the knee. *Clin Orthop Relat Res.*,360:159–68.
- Chuma H, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y. (2004) One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 12:834-842.
- Cimini A, D'angelo B, Das S, Gentile R, Benedetti R, Singh V, Monaco A, Santucci S, Seal S. (2012) Antibody-Conjugated Pegylated Cerium Oxide Nanoparticles For Specific Targeting Of Ab Aggregates Modulate Neuronal Survival Pathways. *Acta Biomaterialia*, 8, 2056-2067.

- Cizewski Culotta V. (2000) Superoxide dismutase, oxidative stress and cell metabolism. *Curr Top Cell Reg*, 36: 117-132.
- Clair BL, Johnson AR, Howard T. (2009) Cartilage repair: current and emerging options in treatment. *Foot Ankle Spec.*,2(4):179–88.
- Clark A, Zhu A P, Sun K, Petty H R. (2011) Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis. *J. Nanopart. Res.*, 13, (10), 5547-5555.
- Colon J, Herrera L, Smith J, Patil S, Komanski C, Kupelian P, Seal S, Jenkins DW and Baker CH. (2009) Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine*, 5: 225-231.
- Cook J L, Hung C T, Kuroki K, Stoker A M, Cook C R, Pfeiffer F M, Stannard J P. (2014) Animal models of cartilage repair. *Bone and Joint Research*, 3(4), 89-94.
- Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC. (2003) Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs. *J Bone Joint Surg Am*,85:116-123.
- Corma A, Atienzar P, García H, Chane-Ching J. (2004) Hierarchically Mesostructured Doped CeO₂ with Potential for Solar-Cell Use. *Nat. Mater.*, 3, 394-397.
- Cuche A, Masenelli B, Ledoux G, Amans D, Dujardin C, Sonnefraud Y, Mélinon P, Huant S. (2009) Fluorescent Oxide Nanoparticles Adapted To Active Tips For Near-Field Optics. *Nanotechnology*, 20(1), 015603.
- Curl KJ, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, 13, 456–460.
- Czitrom AA, Keating S, Gross AE. (1990) The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg Am.*,72(4):574–81.
- D'Angelo B, Santucci S, Benedetti E, Di Loreto S, Phani R. A, Falone S et al. (2009) Cerium Oxide Nanoparticles Trigger Neuronal Survival in a Human Alzheimer Disease Model By Modulating BDNF Pathway. *Curr Nanosci*, 5:167-176.
- Das M, Patil S, Bhargava N, Kang J, Riedel L M, Seal S, Hickman J J. (2007) Auto-catalytic Nanoparticles Offer Neuroprotection to Adult Rat Spinal Cord Neurons. *Biomaterials*, 28, 1918-1925.
- Dattena M, Chessa B, Lacerenza D, et al. (2005) Isolation, culture and characterization of embryonic cell lines from vitrified sheep blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 73(suppl 1): 31–39.
- Dattena M, Mara L, Al`i A, et al. (2007) Lambing rate of vitrified blastocysts is improved by embryo culture with BSA and hyaluronan. *Mol Reprod Dev*, 74(suppl 1): 42–47.
- Dattena M, Pilichi S, Rocca S, Mara L, Casu S, Masala G, Manunta L, Manunta A, Sanna Passino E, Pool RR, Cappai P. (2009). Sheep embryonic stem-like cells transplanted in full-thickness cartilage defects. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 3(3), 175-187.
- Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, et al. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage* (2003),11:16-28.

- Davies KJA: Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61: 1-31, 1995.
- Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. *Exp Cell Res* (2003),287:16-27.
- Dell'Accio F, Vanlauwe J, Bellemans J, Neys J, De Bari C, Luyten FP. (2003) Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res*,21:123-131.
- Demange M, Gomoll A H. (2012) The use of osteochondral allografts in the management of cartilage defects. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 5(3), 229-235.
- Dickhut A, Dexheimer V, Martin, K, Lauinger R, Heisel C, Richter W. (2010) Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells by local transforming growth factor-beta delivery in a biphasic resorbable carrier. *Tissue Eng. A* 16, 453–464.
- Diekman B O, Estes B T, Guilak F. (2010) The effects of BMP6 overexpression on adipose stem cell chondrogenesis: Interactions with dexamethasone and exogenous growth factors. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 93A, 994–1003.
- Dimock AN, Siciliano PD, McIlwraith CW. (2000) Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. *Equine Vet J* 32(5): 439-443.
- Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C. (2009) Mesenchymal stemcells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*,5:392–9.
- Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*,8(4): 315-317.
- Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH. (2009) Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*;189:317e26.
- Dressel R, Schindehütte J, Kuhlmann T, Elsner L, Novota P, Baier PC, Mansouri A. (2008). The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS one*, 3(7), e2622.
- Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F. (2004) Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress. *Biomed. Pharmacother* , 58, 39-46.
- Emmerson BC, Gortz S, Jamali A A, Chung C, Amiel D, Bugbee WD. (2007) Fresh osteochondral allografting in the treatment of osteochondritis dissecans of the femoral condyle. *AmJ Sports Med.*, 35(6) : 907–914.
- Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps, C. (2007). Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials*, 28(36), 5570-5580
- Farr J, Cole BJ, Sherman S, Karas V. (2012) Particulated articular cartilage: CAIS and DeNovo NT. *J Knee Surg*,25(1):23-29.

- Farr J, Cole B, Dhawan A, Kercher J, & Sherman S. (2011). Clinical cartilage restoration: evolution and overview. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(10), 2696-2705.
- Fenderson BA, Eddy EM, Hakomori S. (1988) The blood group I antigen defined by monoclonal antibody C6 is a marker of early mesoderm during murine embryogenesis. *Differentiation* , 38: 124–133
- Fielding RA, Meydani M. (1997) Exercise, free radical generation and aging. *Aging Clin Exp Res* 9: 12-18.
- Filardo G, Kon E, Buda R, et al. (2011) Platelet-rich plasma intraarticular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*;19:528-535.
- Fisher MC, Ferrari D, Li Y, Shepard JB, Patterson SE, et al. (2012) The Potential of Human Embryonic Stem Cells for Articular Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment. *Rheumatol Curr Res* , S3:004.
- Fortier L A, Barker J U, Strauss E J, McCarrel T M, Cole B J (2011). The role of growth factors in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(10), 2706-2715.
- Fortier LA, Nixon AJ, Lust G. (2002) Phenotypic expression of equine articular chondrocytes grown in three-dimensional cultures supplemented with supraphysiologic concentrations of insulin-like growth factor-1. *Am J Vet Res*. Feb,63(2):301-5.
- Fortier L A, Barker J U, Strauss E J, McCarrel T M, Cole B J. (2011). The role of growth factors in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(10), 2706-2715.
- Francioli S, Cavallo C, Grigolo B, Martin I, Barbero A. (2011) Engineered cartilage maturation regulates cytokine production and interleukin-1 beta response. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 469, (10), 2773-2784.
- Franke O, Durst K, Maier V, et al. (2007) Mechanical properties of hyaline and repair cartilage studied by nanoindentation. *Acta Biomater.*,3(6): 873–881.
- Frenkel SR, Bradica G, Brekke J H, Goldman S M, Ileska K, Issack P, Kronengold R T. (2005). Regeneration of articular cartilage—evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. *Osteoarthritis and cartilage*, 13(9), 798-807.
- Frisbie DD, Kawcak CE, Werpny NM et al (2007) Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* , 68:290-296
- Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. (2006) A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human preclinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol*,19:142-146.
- Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, et al. (1999) Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg*, 28:242-255.

- Frosch KH, Drengk A, Krause P, Viereck V, Miosge N, Werner C, Stürmer KM. (2006). Stem cell-coated titanium implants for the partial joint resurfacing of the knee. *Biomaterials*, 27(12), 2542-2549.
- Getgood A, Bhullar T P S, Rushton N. (2009). Current concepts in articular cartilage repair. *Orthopaedics and Trauma*, 23(3), 189-200.
- Glowacki J, Mizuno S. (2008) Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.*,89(5):338–344.
- Gobbi, A. (2009). L'impiego delle cellule mesenchimali autologhe e del gel piastrinico per il trattamento delle lesioni cartilaginee. *Archivio di Ortopedia e Reumatologia*, 120(3-4), 29-31.
- Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, Kercher J, Minas T. (2010) Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.*,92(14):2470–2490
- Gortz S, Bugbee WD. (2006) Allografts in articular cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.*,88(6):1374–84.
- Gortz S, Bugbee WD. (2006) Fresh osteochondral allografts: graft processing and clinical applications. *J Knee Surg.*,19(3):231–40.
- Görtz S, De Young A, Bugbee WD. (2009) Fresh osteochondral allograft transplantation for bipolar cartilage lesions of the knee. In: American academy of orthopaedic surgeons. Las Vegas, NV. p. Paper No 513.
- Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. (1989) The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res*,7(2):208-218.
- Gross AE, Kim W, Las Heras F, Backstein D, Safir O, Pritzker KP. (2008) Fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects: long-term followup. *Clin Orthop Relat Res.*,466(8):1863–70.
- Gross AE, Silverstein EA, Falk J, Falk R, Langer F. (1975) The allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res.*,108:7–14.
- Gudas KRJ, Monastyreckiene E, Valanciute A, Trumpickas V (2003) Osteochondral transplantation for the treatment of femoral condyle defects. *Medicina (Kaunas.)*, 39, 469–475.
- Guilak F, Estes BT, Diekman BO, Moutos FT, Gimple JM. (2010) 2010 Nicolas Andry Award: multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*,468:2530–40.
- Guo X, Wang C, Duan C, et al. (2004) Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng.*,10(11–12):1830–1840.
- Guo J, Chung U I, Yang D, Karsenty G, Bringham F R, Kronenberg H M. (2006) PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. *Dev. Biol.*, 292, 116–128.

- Haleem A M, Chu C R. (2010). Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 20(2), 76-89.
- Han CW, Chu CR, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J, et al. (2003) Analysis of rabbit articular cartilage repair after chondrocyte implantation using optical coherence tomography. *Osteoarthritis Cartilage*,11: 111-121.
- Hancock J T, Desikan R, Neill S J. (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* , 29(2): 345-350,.
- Hangody L, Fules P (2003) Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A, 25–32.
- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M (1998) Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopaedics*, 21, 751–756.
- Hardy J, Selkoe D. (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics, *Science*, 297, 5580, 353-356.
- Harkness L, Taipaleenmaki H, Mahmood A, Frandsen U, Saamanen AM, et al. (2009) Isolation and differentiation of chondrocytic cells derived from human embryonic stem cells using dlk1/FA1 as a novel surface marker. *Stem Cell Rev* , 5: 353-368.
- Harman BD, Weeden SH, Lichota DK, Brindley GW. (2006) Osteochondral autograft transplantation in the porcine knee. *Am J Sports Med*, 34:913-918.
- Heckert E, Karakoti A, Seal S. (2008) The Role of Cerium Redox State in the SOD Mimetic Activity of Nanoceria. *Biomaterials*, 29, 2705-2709.
- Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PI. (2007) Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng*,13:1799–808.
- Hembry RM, Dyce J, Driesang I, Hunziker EB, Fosang AJ, Tyler J, et al. (2001) Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage: a preliminary report. *J Bone Joint Surgery*,83:826-838.
- Heng BC, Cao T, Lee EH (2004) Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells* , 22: 1152-1167.
- Hirst S M, Karakoti A S, Tyler R D, Sriranganathan N, Seal S, Reilly C M, (2009) Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*, 5, (24), 2848-2856.
- Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*,18:730-734.
- Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. (2006) The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng*,12(6):1587–1595.
- Hoben G M, Willard V P, Athanasiou K A. (2009) Fibrochondrogenesis of hESCs: growth factor combinations and cocultures. *Stem Cells Dev* , 18: 283-292.

- Hoemann CD, Sun J, Legare A, McKee MD, Buschmann MD. (2005) Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosanbased- cell delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage*,318-329.
- Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. (2005) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am.* , Dec,87(12):2671-86.
- Hong L, Colpan A, Peptan IA. (2006) Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 12(10):2747–53.
- Hooiveld M J, Roosendaal G, Van den Berg H M, Lafeber F P, Bijlsma J W. (2001) Joint bleeding increases oxidative stress in articular cartilage and causes chondrocyte apoptosis. 47th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, p. 455.
- Horie M, Nishio K, Kato H, Fujita K, Endoh S, Nakamura A, Miyauchi A, Kinugasa S, Yamamoto K, Niki E, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H. (2011) Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: Induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *J. Biochem.* , 150, (4), 461-471.
- Hubbard M J S. (1996) Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle A five-year study. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 78(2), 217-219.
- Hunziker EB, Rosenberg LC. (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am.* ,78(5):721–733.
- Hunziker EB. (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* ,10(6):432–463.
- Hunziker EB, Kapfinger E, Müller ME. (1998). Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 80(1), 144-150.
- Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. (1998) Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. *Can J Vet Res*, 52: 137-146.
- Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Ye Z, et al. (2008) In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 105: 20641-20646.
- Inui A, Iwakura T , Reddi A H. (2012) Human Stem Cells and Articular Cartilage Regeneration. *Cells*, 1, 994-1009.
- Iwamoto M, Ohta Y, Larmour C, Enomoto-Iwamoto M. (2013). Toward regeneration of articular cartilage. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 99(3), 192-202.
- Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. (2009). Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 17(6), 561-577.

- Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. (2001) Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model: a preliminary study. *J Bone Joint Surg* , 83:53-64.
- Johnson B, Jung UY (1999) Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Rel Res*, 367S, S156–S162.
- Johnson-Nurse C, Dandy DJ (1985) Fracture separation of articular cartilage in the adult knee. *J Bone Joint Surg*, 67B, 42–43.
- Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Stoddart MJ. (2013). Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater*, 25, 248-267.
- Jones J I, Gockerman A, Busby W H Jr., Camacho-Hubner C, Clemmons D R. (1993) Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: Potentiation of the effects of IGF-I. *J. Cell Biol.*, 121, 679–687.
- Buckwalter J A. (1997) Chondral and osteochondral injuries: mechanisms of injury and repair responses. *Operative Techniques in Orthopaedics*, Volume 7, Issue 4, October, Pages 263-269.
- Judas F, Rosa S, Teixeira L, Lopes C, Ferreira Mendes A. (2007) Chondrocyte viability in fresh and frozen large human osteochondral allografts: effect of cryoprotective agents. *Transplant Proc.* , 39(8):2531–4.
- Junqueira L C, Carneiro J. “Compendio di istologia”, Piccini, Padova (2006)
- Kafienah W et al. (2002) Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng.* , 8, 817–826
- Kamruddin M, Ajikumar P K, Nithya R, Tyagi A K, Raj B. (2004) Synthesis of Nanocrystalline Ceria by Thermal Decomposition and Soft-chemistry Methods. *Scripta Materialia* , 50, 417-422.
- Kandel R A, Grynepas M, Pilliar R, Lee J, Wang J, Waldman S, et al. (2006) Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model. *Biomaterials*, 27: 4120-4131.
- Kang H, Kang Y, Koo H, Ju S, Kim D, Hong S, Sohn J, Jung K, Park S. (2006) Nano-sized ceria particles prepared by spray pyrolysis using polymeric precursor solution. *Mater. Sci. Eng.*, 127, 99-104.
- Kang SW, Bada LP, Kang CS, Lee JS, Kim CH, Park JH, Kim BS. (2008) Articular cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid. *Biotechnol Lett*;30:435e9.
- Karakoti A S, Singh S, Dowding J M, Seal S, Self W T. (2010) Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem Soc Rev.* , Nov,39(11):4422-32
- Karakoti A S, Monteiro-Riviere N A, Aggarwal R, Davis J P, Narayan R J, Self W T, McGinnis J, Seal S. (2008) Nanoceria as Antioxidant: Synthesis and Biomedical Applications. *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society* , Mar, Vol. 60 Issue 3, p33

- Karakoti A S, Tsigkou O, Yue S, Lee P D, Stevens M M, Jones J R, Seal S. (2010) Rare earth oxides as nanoadditives in 3-d nanocomposite scaffolds for bone regeneration. *J. Mater. Chem.*, 20, (40), 8912-8919.
- Khan W S, Johnson D S, Hardingham T E. (2010) The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *The Knee*, 17 (6) : 369-374.
- Kieswetter K, Schwartz Z, Alderete M, Dean D D, Boyan B D. (1997) Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. *Endocrine*. Jun,6(3):257-64.
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. (2004) Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am.*, 86:455-64
- Kock L, van Donkelaar C C, Ito K. (2012) Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and tissue research*, 347(3), 613-627.
- Kwan M K, Wayne J S, Woo SL, Field F P, Hoover J, Meyers M. (1989) Histological and biomechanical assessment of articular cartilage from stored osteochondral shell allografts. *J Orthop Res.*,7(5):637-44.
- Lammi P E, Lammi M J, Tammi R H, Helminen H J, Espanha M M. (2001) Strong hyaluronan expression in the full-thickness rat articular cartilage repair tissue. *Histochem Cell Biol*, 115:301-308.
- Lattermann C, Romine SE (2009) Osteochondral allografts state of the art. *Clin Sports Med.*, 28(2):285-301. IX.
- Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M. (2003) Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res*, 21: 272-281.
- Lee J E, Kim K E, Kwon I C, Ahn H J, Lee S H, Cho H, Kim H J, Seong S C, Lee M C. (2004) Effects of the controlled-released TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials*, 25, 4163-4173.
- Lee, K, Silva E A, Mooney D J. (2011) Growth factor delivery-based tissue engineering: General approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface*, 8, 153-170.
- Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, et al. (2006) Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang*;91:135-139.
- Li B, Davidson J M, Guelcher S A. (2009) The effect of the local delivery of platelet-derived growth factor from reactive two-component polyurethane scaffolds on the healing in rat skin excisional wounds. *Biomaterials*, 30, 3486-3494.
- Lima E G, Tan A R, Tai T, Bian L, Stoker A M, Ateshian G A, Cook J L, Hung C T. (2008) Differences in interleukin-1 response between engineered and native cartilage. *Tissue Engineering Part A*, 14, (10), 1721-1730.

- Litzke L F, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic- Alasevic O, Libera J. (2004) Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann Biomed Eng*, 32:57-69.
- Lohmann C H, Schwartz Z, Niederauer G G, Carnes D L, Dean D D, Boyan B D. (2000) Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo. *Biomaterials*, 21:49-61.
- Lu Y, Dhanaraj S, Wang Z, Bradley DM, Bowman SM, Cole BJ et al. (2006) Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J Orthop Res*, 24(6):1261-1270.
- Lu Y, Hayashi K, Hecht P, Fanton G, Thabit G, Cooley AJ et al. (2000) The effect of monopolar radiofrequency energy on partial-thickness defects of articular cartilage. *Arthroscopy*, 16:527-536.
- Madry H, Grun U W, Knutsen G. (2011) "Cartilage repair and joint preservation", *Deutsche Arzteblatt International*, 180(40):669-77.
- Magnuson P B (1946). Technic of debridement of the knee joint for arthritis. *The Surgical clinics of North America*, 249.
- Malins D C, Polissar N L, Gunselman S J. (1996) Progression of Human Breast Cancers to the Metastatic State Is Linked To Hydroxyl Radical-Induced DNA Damage. *PNAS*, 93, 2557-2563.
- Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Free L E. (2001) Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J. Cell. Biochem.*, 83, 121–128.
- Martini F M. (2006) *Patologie articolari nel cane e nel gatto*. Poletto, Milano.
- Matsiko A, Levingstone T J, O'Brien F J. (2013) Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials*, 6(2):637-668.
- Matsusue Y, Yamamuro T, Hama M. (1993) Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*, 9, 318–321.
- McCulloch P C, Kang R W, Sobhy M H, Hayden J K, Cole B J. (2007) Prospective evaluation of prolonged fresh osteochondral allograft transplantation of the femoral condyle: minimum 2-year followup. *Am J Sports Med.*, 35(3):411–20.
- Mikos A G, Herring S W, Ochareon P, Elisseeff J, Lu H H, Kandel R et al. (2006) Engineering complex tissues. *Tissue Eng*, 12(12):3307-3339.
- Milam S B, Zardeneta G, Schmitz JP. (1998) Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: a proposed hypothesis. *J Oral Maxillofac Surg* 56: 214-223.
- Milano G, Sanna Passino E, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, Saccomanno MF, Fabbriani C (2010). The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on

- the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(7), 971-980.
- Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Manunta A, Postacchini R, Saccomanno MF, Fabbriani C. (2012). Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 28(5), 688-701.
 - Miolo A, mortellaro CM. (2003) Artrosi del cane e stress ossidativo-infiammatorio: dalla clinica al meccanismo. *Veterinaria*, 17.1: 17-33.
 - Mithoefer K. (2013) Complex articular cartilage restoration. *Sports Med Arthrosc Rev*, 21(1):31-37.
 - Mobasher A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt M E. (2014) Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas*, Volume 78, Issue 3, July: 188-198
 - Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. (2013) The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21 1824-1833.
 - Mortellaro C M. (2003) Pathophysiology of osteoarthritis. *Veterinary research communications*, 27 75-78.
 - Mrugala D, Bony C, Neves N, Caillot L, Fabre S, Moukoko D, Noel D. (2008). Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Annals of the rheumatic diseases*, 67(3), 288-295.
 - Nakagawa K, Sasho T, Arai M et al. (2007) Effects of autologous platelet-rich plasma on the metabolism of human articular chondrocytes. 7th World Congress of ICRS, Warsaw.
 - Nakajima M, Wakitani S, Harada Y, Tanigami A, Tomita N. (2008). In vivo mechanical condition plays an important role for appearance of cartilage tissue in ES cell transplanted joint. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(1), 10-17.
 - Nehrer S, Breinan H A, Ramappa A, Hsu H P, Minas T, Shortkroff S, et al. (1998) Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*, 19:2313-2328.
 - Niederauer G G, Slivka M, Leatherbury N C, Korvick D L, Harroff Jr, H, Ehler W C, Kieswetter K. (2000) Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials*, 21(24), 2561-2574.
 - Niu J L, Azfer A, Rogers L M, Wang X , Kolattukudy P E. (2007) Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, 73, (3), 549-559.
 - Niu J, Wang K, Kolattukudy P E. (2011) Cerium Oxide Nanoparticles Inhibits Oxidative Stress and Nuclear Factor- B Activation in H9c2 Cardiomyocytes Exposed to Cigarette Smoke Extract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 338, 53-61.

- Nixon A J, Haupt J L, Frisbie D D, Morisset S S, McIlwraith C W, Robbins P D, Evans C H, Ghivizzani S. (2005) Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy. *Gene Ther* Jan,12(2):177-86.
- No authors listed. American Society for Testing and Materials. ASTM F2451 - 05(2010) Standard Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage. <http://www.astm.org/Standards/F2451.htm>.
- Noel D, Djouad F, Jorgense C. (2002) Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs*,3(7):1000-4.
- Oldershaw R A, Baxter M A, Lowe E T, Bates N, Grady L M, et al. (2010) Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol*, 28: 1187-1194.
- Oldershaw, Rachel A. (2012) "Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future." *International journal of experimental pathology*, 93.6 389-400.
- Onyekwelu, Ikemefuna, Mary B. Goldring, and Chisa Hidaka. (2009) "Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration." *Journal of cellular biochemistry*, 107.3 383-392.
- Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan J K, Madry H, Cucchiari M. (2014) Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 7:1-17.
- Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T. (2005) Behaviour of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J Histochem Cytochem*, 53:207-216.
- Outerbridge RE (1961) The aetiology of Chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg*, 43B, 752-757.
- Pagliari F, Mandoli C, Forte G, Magnani E, Pagliari S, Nardone G, Licocchia S, Minieri M, Nardo P D, Traversa E. (2012) Cerium Oxide Nanoparticles Protect Cardiac Progenitor Cells from Oxidative Stress. *ACS Nano*, 6, 3767-3775.
- Pallante A L, Bae W C, Chen A C, Gortz S, Bugbee W D, Sah R L. (2009) Chondrocyte viability is higher after prolonged storage at 37 degrees C than at 4 degrees C for osteochondral grafts. *Am J Sports Med.*, 37 Suppl 1:24S-32S.
- Parekkadan B, Milwid JM. (2010) Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng*, 12:87-117.
- Park E J, Choi J, Park Y K, Park K (2008). Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245(1), 90-100.
- Patil S, Kuiry S, Seal S, Vanfleet R. (2002) Synthesis of Nanocrystalline Ceria Particles for High Temperature Oxidation Resistant Coating. *J. Nanopart.Res.*, 4, 433-438.

- Pearce S G, Hurtig M B, Clarnette R, Kalra M, Cowan B, Miniaci A. (2001) An investigation of 2 techniques for optimizing joint surface congruency using multiple cylindrical osteochondral autografts. *Arthroscopy*,17:50-55.
- Pearsall A W, Tucker J A, Hester R B, Heitman R J. (2004) Chondrocyte viability in refrigerated osteochondral allografts used for transplantation within the knee. *Am J Sports Med.*, 32(1):125–31.
- Pennock A T, Wagner F, Robertson C M, Harwood FL, Bugbee W D, Amiel D. (2006) Prolonged storage of osteochondral allografts: does the addition of fetal bovine serum improve chondrocyte viability? *J Knee Surg.*,19(4):265–72.
- Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143–7.
- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen L D, Manchester L C. (1993) Melatonin, Hydroxyl Radical-Mediated Oxidative Damage, And Aging: A Hypothesis. *J. Pineal Res.*, 14, 151-168.
- Ponnurangam S, O'Connell G D, Chernyshova I V, Wood K, Hung C T, Somasundaran P. (2014) Beneficial effects of cerium oxide nanoparticles in development of chondrocyte-seeded hydrogel constructs and cellular response to interleukin insults. *Tissue Eng Part A*. Nov, 20(21-22):2908-19.
- Pourkhalili N, Hosseini A, Nili-Ahmadabadi A, Hassani S, Pakzad M, Baeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M. (2011) Biochemical And Cellular Evidence Of The Benefit Of A Combination Of Cerium Oxide Nanoparticles And Selenium To Diabetic Rats. *World J Diabetes*, 2, 204-210.
- Pridie K H, & Gordon G. (1959, January) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *Journal of bone and joint surgery-british volume* (Vol. 41, No. 3, pp. 618-619). 22 Buckingham Street, London WC2N 6ET, England: British Editorial Soc Bone Joint Surgery.
- Ranawat A S, Vidal A F, Chen C T, Zelken J A, Turner A S, Williams 3rd RJ. (2008) Material properties of fresh cold-stored allografts for osteochondral defects at 1 year. *Clin Orthop Relat Res*, 466 (8):1826–36.
- Rangarao G, Mishra B G. (2003) Structural, redox and catalytic chemistry of ceria based materials. *Bull. Catal. Soc. India.*, 2, 122-134.
- Renu G, Rani V V, Nair D, Subramanian S V, Lakshmanan K R V, Kumar V. (2012) Development Of Cerium Oxide Nanoparticles And Its Cytotoxicity In Prostate Cancer Cells. *Adv. Sci. Lett.*, 6, 17-25.
- Richardson S M, Mobasher A, Freemont A J, Hoyland J A. (2007) Intervertebral disc biology: degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Histol Histopathol*, 22:1033–41.
- Rudert M, Wilms U, Hoberg M, Wirth C J. (2005) Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome. *Arch Orthop Trauma Surg*,125:598-608.

- Rudert M. (2002) Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. *Cells Tissues Organs*, 17:229-240.
- Safran M R, Kim H, & Zaffagnini S. (2008) The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 16(6), 306-311.
- Sahu T, Bish S S, Das K R and Kerkar S. (2013) Nanocerium: Synthesis and Biomedical Applications. *Current Nanoscience*, Vol. 9, No. 00
- Saito M, Takahashi KA, Arai E, Inoue A, Sakao K, Tonomura H, Kuho, T. (2009). Intra-articular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clinical & Experimental Rheumatology*, 27(2), 201.
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 52(8):2521e9.
- Sato T, Chen G, Ushida T, Ishii T, Ochiai N, Tateishi T. (2004) Evaluation of PLLA-collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng*, 24:365-372.
- Sayre L M, Smith M A, Perry G. (2001) Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8: 721-738,
- Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan S W. (2006) Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, (1), 86-91.
- Schulz R M, & Bader A. (2007) Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *European Biophysics Journal*, 36(4-5), 539-568.
- Shao X X, Huttmacher D W, Ho S T, Goh J, Lee E H. (2006) Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials*, 27:1071-1080.
- Shcherbakov A B, Ivanov V K, Zholobak N M, Ivanova O S, Elu K, Baranchikov A E, Nla S. (2011) Nanocrystalline ceria based materials-- perspectives for biomedical application, *Biofizika*, 56(6), 995-1015.
- Shiraishi T, DeMeester S R, Worrall N K, Ritter J H, Misko T P, Ferguson T B Jr, Cooper J D. (1995) Patterson, G. A., Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates rat lung allograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110, (5), 1449-1460.
- Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. (2006) In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem*, 97(1):84e97.
- Shortkroff S, Barone L, Hsu H P, Wrenn C, Gagne T, Chi T, et al. (1996) Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 17:147-154.

- Siebert C H, Miltner O, Weber M W, Sopka S, Koch S, Niedhart C. (2003) Healing of osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF. *Arthroscopy*, 19:182-187.
- Smith G D, Knutsen G, Richardson J B. (2005) A clinical review of cartilage repair techniques. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* , 87.4: 445-449.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. (2006) Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE*,1:e79.
- Strauss EJ, Goodrich LR, Chen CT, Hidaka C, Nixon AJ. (2005) Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med.*,33(11):1647–1653.
- Strauss E, Schachter A, Frenkel S, Rosen J. (2009) The efficacy of intra-articular hyaluronan injection after the microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions. *Am J Sports Med.* , Apr,37(4):720-6.
- Sudimack J, Robert B A, Lee J. (2000) Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Deliv. Rev.* , 41(2), 147-162.
- Sun L, Reagan M R, Kaplan D L. (2010). Role of Cartilage Forming Cells in Regenerative Medicine for Cartilage Repair. *Orthopedic research and reviews*,(2), 85.
- Swieszkowski W, Saey Tuan B H, Kurzydłowski KJ, Hutmacher D W. (2007) Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints , *Biomolecular Engineering*, 24: 489-495
- Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Robbins R C. (2005). Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation*, 112(9 suppl), I-166.
- Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S. (2005) Vacancy Engineered Ceria Nanostructures for Protection from Radiation-Induced Cellular Damage. *Nano Letters*, 5, 2573-2577.
- Teng MS, Yuen AS, Kim HT. (2008) Enhancing osteochondral allograft viability: effects of storage media composition. *Clin Orthop Relat Res.*,466(8):1804–9.
- Tibesku CO, Szuwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, van Aken H, et al. (2004) Hyaline cartilage degenerated after autologous osteochondral transplantation. *J Orthop Res*,22:1210-1214.
- Ting V, Sims CD, Brecht LE, McCarthy JG, Kasabian AK, Connelly PR, et al. (1998) In vitro prefabrication of human cartilage shapes using fibrin glue and human chondrocytes. *Ann Plast Surg*;40:413-420.
- Tiwari A K. (2004) Antioxidants: New-Generation Therapeutic Base for Treatment of Polygenic Disorders. *Curr. Sci.* , 86, 1092-1102.
- Tognana E, Borrione A, De Luca C, Pavesio A. (2007) Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs.*,186(2):97–103.

- Toh WS, Guo XM, Choo AB, Lu K, Lee EH, et al. (2009) Differentiation and enrichment of expandable chondrogenic cells from human embryonic stem cells in vitro. *J Cell Mol Med* , 13: 3570-3590.
- Toh W S, Lee E H, Cao T. (2011) Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(3), 544-559.
- Tole S, Kaprieliana Z, Ker-hwa OU, et al. (1995) FORSE-1: a positionally regulated epitope in the developing rat central nervous system. *J Neurosci* 15: 957–969.
- Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, et al. (2005) Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol*,18:213–21.
- Trubiani O, Orsini G, Caputi S, Piattelli A. (2006) Adult mesenchymal stem cells indental research: a new approach for tissue engineering. *Int J ImmunopatholPharmacol*,19:451–60.
- Trzeciak T, Kruczynski J, Jaroszewski J, Lubiowski P. (2006) Evaluation of cartilage reconstruction by means of autologous chondrocyte versus periosteal graft transplantation: an animal study. *Transplant Proc*,38:305-311.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* , 8(9):726–36.
- Ulijn R V, Bibi N, Jayawarna V, Thornton P D, Todd S J, Mart R J, Smith A M, Gough JE. (2007) Bioresponsive hydrogels. *Mater. Today* , 10, 40–48.
- Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. (2010) Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and molecular life sciences*, 67(24), 4197-4211.
- Van Dyk GE, Dejardin LM, Flo G, Johnson LL. (1998) Cancellous bone grafting of large osteochondral defects: an experimental study in dogs. *Arthroscopy*,14:311-320.
- Vasara AI, Hyttinen MM, Pulliainen P, Lammi MJ, Jurvelin JS, Peterson L. (2006) Immature porcine knee cartilage lesions show good healing with or without autologous chondrocyte transplantation. *Osteoarthritis Cartilage* ,14:1066-1074.
- Vasara AI, Hyttinen MM, Lammi MJ, Lammi PE, Långsjö TK, Lindahl A, Kiviranta I. (2004). Subchondral bone reaction associated with chondral defect and attempted cartilage repair in goats. *Calcified tissue international*, 74(1), 107-114.
- Vats A, Bielby RC, Tolley N, Dickinson SC, Boccaccini AR, Hollander AP, Bishop AE, Polak JM. (2006) Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells: the effect of the micro-environment. *Tissue Eng.* , 12(6):1687–97.
- Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. (2009) Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* , May,27(5):307-14.
- Wakitani S, et al. (2003) Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)* 42(1): 162–165.
- Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, et al. (2011) Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage

- repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regenerative Med* , 5(2):146-150.
- Wakitani S, Aoki H, Haradan Y, Sonobe M, Morita Y, Mu Y, Tanigami A. (2004). Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell transplantation*, 13(4), 331-336.
 - Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 76(4), 579-592.
 - Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Ono KEIRO. (1989). Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 71(1), 74-80.
 - Walker P D, Shaht SV. (1988) Evidence Suggesting a Role for Hydroxyl Radical in Gentamicin-Induced Acute Renal Failure in Rats. *J. Clin. Inves*, 81, 334-341.
 - Ward P A, Till G O, Kunkel R, Beauchamp C. (1983) Evidence for Role of Hydroxyl Radical in Complement and Neutrophil-Dependent Tissue Injury. *J. Clin. Invest*, 72, 789-801.
 - Waselau AC, Nadler D, Müller JM, Zlinszky K, Hilbe M, Auer JA, von Rechenberg B. (2005). The effect of cartilage and bone density of mushroom-shaped, photooxidized, osteochondral transplants: an experimental study on graft performance in sheep using transplants originating from different species. *BMC musculoskeletal disorders*, 6(1), 60.
 - Wegener B, Schrimpf FM, Pietschmann MF, Milz S, Berger-Lohr M, Bergschmidt P, Jansson V, Müller PE. (2009) Matrix-guided cartilage regeneration in chondral defects. *Biotechnol Appl Biochem*;53:63e70.
 - Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J, et al. (2008) Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 75(5):382-386.
 - Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(7), 913-925.
 - Williams 3rd RJ, Ranawat AS, Potter HG, Carter T, Warren RF. (2007) Fresh stored allografts for the treatment of osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* , 89(4):718–26.
 - Williams GM, Klisch SM, Sah RL. (2008) Bioengineering cartilage growth, maturation, and form. *Pediatr Res* , 63(5): 527e34.
 - Williams SK, Amiel D, Ball ST, Allen RT, Wong VW, Chen AC, Sah RL, Bugbee WD. (2003) Prolonged storage effects on the articular cartilage of fresh human osteochondral allografts. *J Bone Joint Surg Am.*,85-A(11):2111–20.

- Wu W, Chen F, Liu Y, Ma Q, Mao T. (2007) Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: Experimental study in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*;65:1951-1957.
- Xia T, Kovochich M, Liong M, Ma L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI, Nel AE. (2008) Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano* , 2, 2121-2134.
- Xie F, et al. (2008) Chondrogenic differentiation of mouse embryonic stem cells promoted by mature chondrocytes. *Science in China Series C: Life Sciences* , 51(9): 774–778.
- Xu JW, Zaporozhan V, Peretti GM, Roses RE, Morse KB, Roy AK, et al. (2004) Injectable tissue-engineered cartilage with different chondrocyte sources. *Plast Reconstr Surg*;113:1361-1371.
- Yao H C, Yu Yao YF. (1984) Ceria in Automotive Exhaust Catalysts I. Oxygen Storage. *J. Catal.*, 86, 254-265.
- Yu D, Cringle S. (2005) Retinal Degeneration and Local Oxygen Metabolism. *Exp. Eye Res.*, 80, 745-751.
- Zaslav, K., McAdams T, Scopp J, Theosadakis J, Mahajan V, Gobbi A. (2012). New frontiers for cartilage repair and protection. *Cartilage*, 3(1 suppl), 77-86.
- Zhang L, Hu J , Athanasiou K A. (2009) The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng.*, 37(1-2):1-57.