

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Scienze Chirurgiche e Microbiologia Applicata

Dipartimento di Scienze Chirurgiche

Ciclo XXIX

**Utilizzo di cellule staminali vasculo-stromali adulte autologhe derivate
da lipoaspirato per la terapia delle pseudoartrosi di clavicola**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Luigi Roncoroni

Tutor:

Chiar.mo Prof. Francesco Ceccarelli

Dottorando: Filippo Calderazzi

Riassunto

Il tessuto adiposo rappresenta una fonte abbondante e accessibile di cellule staminali mesenchimali adulte in grado di differenziarsi in cellule e tessuti di origine mesodermica, comprese le cellule osteogeniche. Questo lavoro descrive la procedura per ottenere un campione di soluzione salina di 5 cm^3 , contenente un pellet di cellule mesenchimali vascolo-stromali (VSC), partendo da lipoaspirato ottenuto da una liposuzione addominale convenzionale. Una media di $2,5 \times 10^6$ cellule è isolata per ogni procedura; il 35% (875000) di queste sono cellule CD34 + / CD45-; queste esprimono un sottoinsieme di antigeni di superficie cellule-associati sia positivi per CD10, CD13, CD44, CD59, CD73, CD90, HLA-ABC, sia negativi per CD33, CD39, CD102, CD106, CD146, HLA-DR; queste permettono di caratterizzarle come cellule mesenchimali vasculostromali (VSCs). Questa procedura è semplice, efficace, economica e sicura. Essa consente la raccolta di un numero significativo di VSCs che sono pronte, nella stessa seduta operatoria, per essere utilizzate per procedure di chirurgia ortopedica destinata alla ricostruzione/rigenerazione ossea. Tra queste, possiamo includere ampie perdite di sostanza ossea dovute a un trauma o a un tumore, deformità scheletriche, necrosi avascolare e pseudoartrosi o ritardi di consolidazione. In particolare, le pseudoartrosi sono ancora oggi complicanze frequenti e invalidanti nel trattamento delle fratture e la terapia cellulare può rappresentare una valida alternativa all'utilizzo di procedure che prevedono innesti ossei o, semplicemente, sostituiti con materiale osteoconduttivo. La pseudoartrosi

della clavicola è la complicanza più comune dopo il trattamento di una frattura clavicola, probabilmente a causa della mancanza di sufficiente apporto vascolare. In questo scenario una semplice iniezione percutanea di VSCs vitali e purificate potrebbe essere effettuata sotto guida ecografica, direttamente nel sito pseudoartrosi, al fine di promuovere o accelerare il processo di guarigione. Il particolare sito coinvolto (la clavicola è di fatto un osso sottocutaneo) e la mancanza di tessuto muscolare circostante permetterà di iniettare il pellet di VSCs nel tessuto adiposo sottocutaneo che circonda la clavicola, che in pratica è in continuità con il tessuto osseo affetto da pseudoartrosi. Di fatto questa procedura rispetta sia il sito di origine delle VSCs (tessuto adiposo sottocutaneo addominale), sia il loro sito di destinazione (tessuto adiposo sottocutaneo intorno alla clavicola).

Introduzione

Il presente progetto prevede l'utilizzo di cellule vasculo-stromali autologhe isolate da lipoaspirato (VSCs) per il trattamento sperimentale delle pseudoartrosi di clavicola. In generale il è il fisiologico processo di riparazione di una frattura che determina la produzione di nuovi osteoblasti e quindi del callo osseo.

La pseudoartrosi è una temibile complicanza nel processo di guarigione di una frattura. Per pseudoartrosi si definisce la mancata consolidazione di una frattura dopo almeno 6 mesi dal trauma e si caratterizza per la presenza di tessuto fibrocartilagineo e non osseo nella regione interframmentaria. La pseudoartrosi deve essere differenziata dal ritardo di consolidazione che è una mancata guarigione della frattura entro i 6 mesi dal trauma iniziale.

La percentuale di fratture che va incontro a ritardo di consolidazione o pseudoartrosi è compresa tra il 2% e il 7%. Entrambe le complicanze si possono verificare sia per un mancato trattamento, ad esempio una frattura non diagnosticata o misconosciuta, sia in seguito ad un errato trattamento conservativo o chirurgico.

Affinché avvenga la guarigione di una frattura devono essere soddisfatti dei precisi criteri biologici e meccanici. Nel trattamento conservativo (non chirurgico) il focolaio di frattura non viene aggredito; può essere manipolato dall'esterno tramite manovre riduttive indirette. Ciò permette comunque la formazione dell'ematoma perifratturativo, primum movens biologico necessario per la formazione del callo osseo. In questo caso è sufficiente un buon affrontamento dei monconi di frattura ed

una stabilità meccanica anche non assoluta (stabilità relativa) per garantire la guarigione. Gli stessi obiettivi devono essere raggiunti anche nel trattamento chirurgico mini-invasivo, ossia effettuato con mezzi di sintesi (fili di Kirshner, chiodi endomidollari) che non aggrediscono direttamente il focolaio di frattura e quindi non interferiscono con la formazione dell'ematoma perifratturativo.

Al contrario, se la frattura viene trattata con chirurgia a cielo aperto l'ematoma di frattura viene completamente svuotato; non è più possibile in questo caso affidarsi alla biologia della guarigione, ma è necessario provvedere ad una riduzione anatomica dei frammenti, con loro affrontamento completo e preciso; inoltre bisogna provvedere ad una sintesi della frattura che preveda la compressione dei monconi e la loro stabilità assoluta. In questo caso la guarigione della frattura sarà “per primam”, ossia endostale, senza formazione di callo osseo periostale. Se i requisiti biologici e meccanici sopra citati non vengono soddisfatti, il rischio di una mancata consolidazione a medio (entro 6 mesi) o a lungo termine (oltre 6 mesi) della frattura aumentano. Non sempre le pseudoartrosi avvengono per un non corretto trattamento; infatti in qualche caso l'estrema comminuzione e pluriframmentarietà della frattura e la conseguente grave mortificazione dei tessuti molli provocano uno scarso apporto vascolare al focolaio di frattura, fattore fondamentale per la formazione di ematoma perifratturativo e l'inizio della guarigione. La presenza di una contaminazione batterica locale, dovuta ad una esposizione iniziale della frattura o ad una diffusione ematica per via sistemica, (ad esempio in paziente con una infezione pre-esistente in

atto in altra sede o un paziente immunodepresso) è un altro fattore che può determinare una pseudoartrosi.

Anche malattie metaboliche sistemiche (diabete, epatopatie) sono fattori predisponenti. Inoltre è importante valutare la sede della frattura: ci sono alcune ossa o segmenti ossei la cui vascolarizzazione è precaria già in condizioni fisiologiche, ad esempio la scafoide carpale, l'astragalo, la testa del femore e dell'omero, le diafisi delle ossa lunghe e la clavicola. Infatti sono questi i distretti in cui più frequentemente si verifica l'insorgenza di una pseudoartrosi.

La pseudoartrosi è classificata in base all'aspetto morfologico e topografico, trascurando la causa dei fenomeni patologici. Innanzitutto occorre distinguere pseudoartrosi non infette e infette.

Pseudoartrosi non infette

Secondo la classificazione di Weber e Cech (Weber, 1976), le pseudoartrosi asettiche, in base alla vitalità dei frammenti ossei, si suddividono in ipertrofiche e atrofiche.

Le *pseudoartrosi ipertrofiche/ipervascolari* sono ulteriormente suddivise in:

- Pseudoartrosi a zampa d'elefante: ampiamente ipertrofiche e ricche di callo osseo. Di solito seguono ad una fissazione instabile o ad un carico prematuro.
- Pseudoartrosi a zoccolo di cavallo: moderatamente ipertrofiche e con scarsa presenza di callo osseo. Tipicamente seguono ad un'immobilizzazione moderatamente instabile.

- Pseudoartrosi oligotrofiche: non ipertrofiche e con assenza di callo osseo. Generalmente seguono ad uno spostamento della frattura.

Le *pseudoartrosi atrofiche/avascolari* sono ulteriormente suddivise in:

- Pseudoartrosi distrofica, caratterizzata dalla presenza di un frammento intermedio con diminuito apporto di sangue.
- Pseudoartrosi necrotica, caratterizzata dalla presenza di uno o più frammenti intermedi necrotici.
- Pseudoartrosi con perdita di sostanza, caratterizzata dalla perdita di frammenti ossei diafisari.
- Pseudoartrosi atrofica, caratterizzata dall'assenza di frammenti intermedi; le estremità dei frammenti sono osteoporotici e atrofici.

Pseudoartrosi infette

Le pseudoartrosi infette seguono la classificazione di Cierny (Cierny, 1985), che suddivide l'osteomielite in 4 tipi anatomici, basati sull'estensione dell'infezione:

- Tipo 1, osteomielite midollare
- Tipo 2, osteomielite superficiale
- Tipo 3, osteomielite localizzata
- Tipo 4, infezione diffusa

Ogni tipo è ulteriormente suddiviso in tre classi fisiologiche, basate su caratteristiche sistemiche:

- A, soggetto fisiologicamente normale
- B, soggetto con compromissione locale o sistemica alla ferita e alla guarigione della frattura;
- C, soggetto con alto rischio di complicanze in caso di intervento chirurgico.

Le manifestazioni cliniche di una mancata consolidazione di una frattura sono la instabilità del segmento interessato (movimenti e crepitii ossei, motilità praeternaturale) associata a meno ad accorciamento e deviazione dell'asse, dolore, impotenza funzionale gonfiore, calore e rossore.

La terapia cellulare può rappresentare oggi un'ottima alternativa all'utilizzo di innesti ossei e/o terapie fisiche potendo potenziare il processo osteoinduttivo che è alla base della riparazione del sito di infortunio. Le cellule vasculo-stromali (VSCs) contenute nel tessuto adiposo hanno la possibilità di differenziarsi in cellule endoteliali (oltre che in osteociti) andando quindi ad incrementare la perfusione delle zone trattate.

Di seguito sarà illustrato il processo di estrazione e purificazione di VSCs autologhe da tessuto adiposo, destinate alla terapia delle pseudoartrosi di clavicola.

Materiale e Metodo

Previa sottoscrizione di specifico consenso informato, prima dell'intervento viene somministrata una singola dose di 1,5 g di sodio ampicillina + sulbactam endovena. Le procedure sono eseguite sotto sedo-analgesia con la tecnica tumescente (Fig 1A), infiltrando il tessuto sottocutaneo della regione addominale con soluzione di Klein: 0.9% NaCl 1000 mL, lidocaina 1000 mg (0.1%), 8.4% sodio bicarbonato 15 mL, e adrenalina 0.5 mg (concentrazione 1:2000000), come da consolidata pratica internazionale in tal ambito. Le procedure di liposuzione locale hanno un tasso di complicanze minimo (ematoma 1%, infezione 0,2%), comunque nel caso trattate e risolte in regime ambulatoriale. Il volume di liquido iniettato è proporzionale al volume stimato da estrarre con liposuzione (solitamente 100 cc). Successivamente, viene effettuata una liposuzione addominale tradizionale utilizzando cannule smusse da 2 mm. (Fig. 1B).

I dispositivi utilizzati (Lipokit-Cellticator, Medi-Khan Inc., USA) sono progettati per l'iniezione tumescente, l'aspirazione, la raccolta, il filtraggio e il trattamento del tessuto adiposo autologo in un circuito chiuso, evitando così eventuali rischi di contaminazione. Tuttavia, la stessa procedura potrebbe facilmente essere eseguita con cannule collegate a siringhe Luer-Lock da 50 cm³.

Il lipoaspirato viene poi elaborato secondo la seguente procedura: circa 50 cc di tessuto adiposo altamente concentrato (Fig. 1C) viene mescolato rapidamente con 1 g di collagenasi precedentemente diluita con 50 cc di soluzione sterile tampone fosfato

salino (PBS). La sospensione cellulare risultante (soluzione di collagenasi più lipoaspirato) viene poi incubato per 30 min (Fig. 1D) a 37 ° C.

A questo punto rimangono solo 10 cc di soluzione (contenente il pellet di VSCs). questa soluzione viene lavata per tre volte (Fig. 1E) in 45 mL di soluzione salina. Dopo ogni lavaggio, le siringhe contenenti la VSCs sono posizionate all'interno della centrifuga a 200 RCF × 4 minuti (Fig. 1F).

Al termine della procedura, il campione cellulare (pellet di VSCs), veicolato in 5 ml di soluzione salina, (Fig. 1G-H- I) è pronto per essere iniettato nel sito di interesse, sempre ovviamente nel contesto della medesima seduta operatoria. L'intera procedura (prelievo, separazione, iniezione) dura circa 120 min.

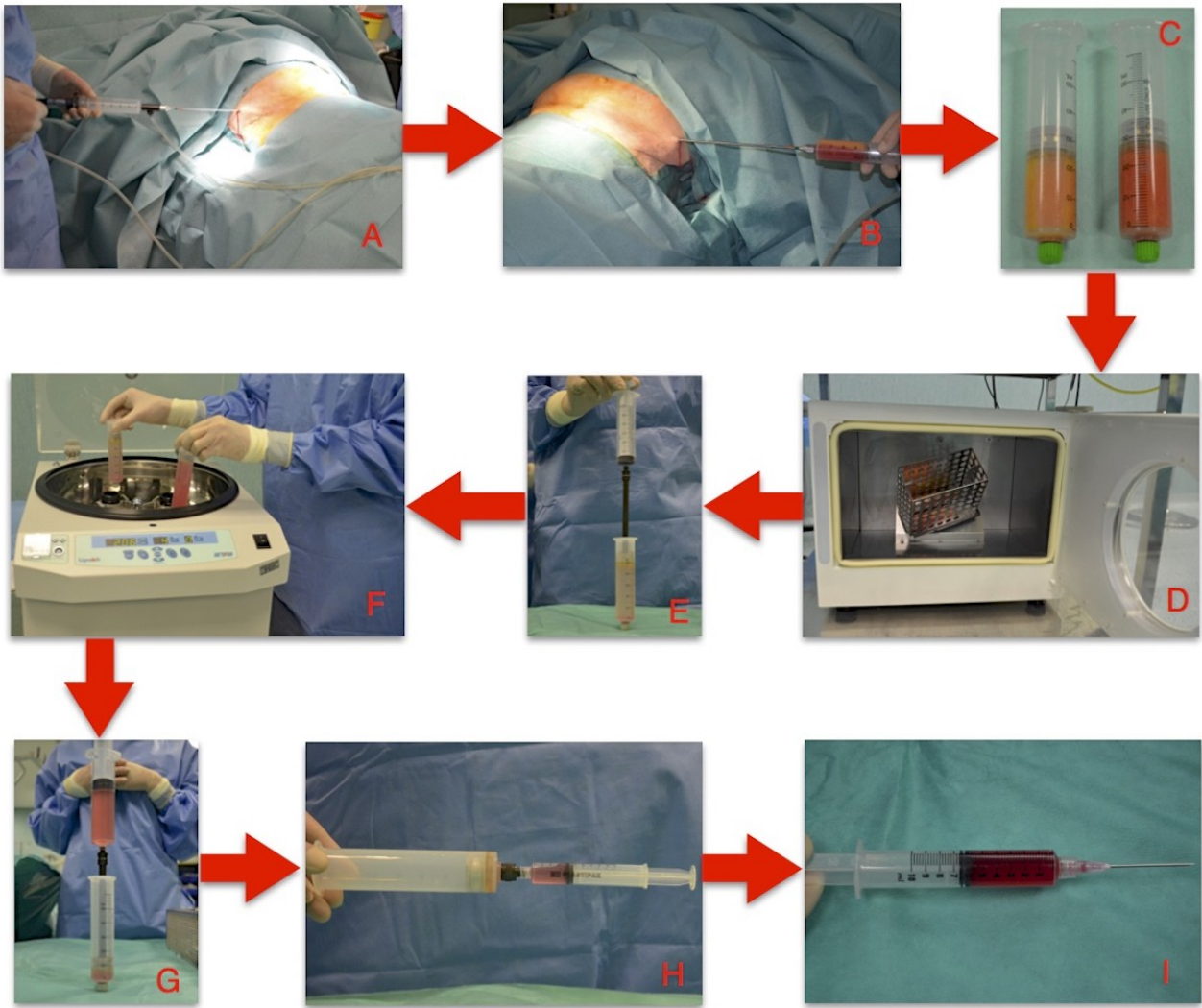


Fig 1 – A - I : Passaggi della procedura

Risultati

Per caratterizzare dettagliatamente le caratteristiche delle VSCs ottenibili con il metodo descritto, sono stati studiati i lipoaspirati processati da tre pazienti: i marcatori di superficie delle VSCs isolati sono stati analizzati mediante citometria di flusso in base ai criteri di definizione delle cellule stromali multipotenti. A tal fine, seguendo il nostro protocollo, le cellule sono state incubate per 20 minuti e colorate con anticorpi specifici per marcatori VSCs umani: CD10, CD13, CD31, CD33, CD34, CD39, CD44, CD45, CD59, CD73, CD90, CD102, CD106, CD146, HLADR, e HLAABC (Becton, Dickinson and Co.-NJ, USA). Le cellule sono state analizzate utilizzando un flusso citofluorimetro di otto colori (FACSCanto II; Becton, Dickinson e Co.- NJ, USA). Il colorante 7-amino-actinomicina D è stato aggiunto per valutare la vitalità delle cellule. Almeno 20.000 eventi sono stati raccolti.

Una media di $2,5 \times 10^6$ cellule è stata isolata per ogni procedura; il 35% (875.000) di queste sono cellule CD34 + / CD45- (Fig. 2A); queste esprimono un sottoinsieme di antigeni di superficie cellule-associati sia positivi per CD10, CD13, CD44, CD59, CD73, CD90, HLA-ABC, sia negativi per CD33, CD39, CD102, CD106, CD146, HLA-DR; queste permettono di caratterizzarle come cellule mesenchimali vasculostromali (VSCs). Il 60% (Fig. 2B) erano cellule CD34 + CD45-CD31- (20% di cellule totale; 525.000 cellule), e il 40% erano cellule CD34 + CD45-CD31 + (14% di cellule totale; 350.000 cellule). La vitalità complessiva di queste cellule era pari al 93% (Fig. 2C).

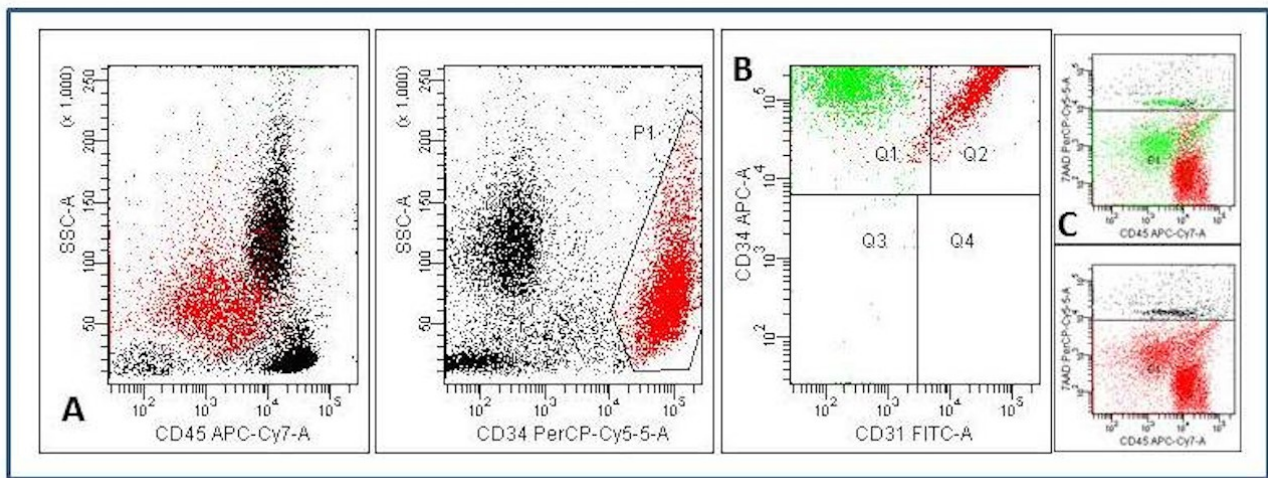


Fig.2: A) Caratterizzazione CD34+/CD45; B) Caratterizzazione CD31; C) Vitalità.

Discussione

Il trattamento delle pseudoartrosi si basa soprattutto sulla prevenzione, intesa come esecuzione accurata delle varie fasi della terapia delle fratture (riduzione e immobilizzazione) allo scopo di portarle a corretta consolidazione, ma anche sulla ricostruzione accurata dei tessuti molli, sul carico funzionale il più precoce possibile, sull'attento controllo del rischio di infezione.

A seconda del quadro radiografico, clinico oggettivo e soggettivo, unitamente ad altri fattori fondamentali quali distretto interessato, età del paziente e richieste

funzionali, in caso di pseudoartrosi si può decidere di intervenire o reintervenire chirurgicamente.

Riguardo alle metodiche di trattamento, quelle non chirurgiche comprendono: terapia farmacologica (calcio, vitamina D3, bisfosfonati), stimolazione meccanica (aumento della stabilità del focolaio associato a carico funzionale), stimolazione biofisica (campi elettrici o elettromagnetici, ultrasuoni pulsati a bassa intensità).

Il trattamento chirurgico delle *pseudoartrosi asettiche* è specifico. Per il *tipo ipertrofico* si basa su un'immobilizzazione stabile, mediante un'osteosintesi con chiodo endomidollare, che consente precocemente una parziale ripresa del carico, ma può provocare un'alterazione dell'apporto ematico endostale, che tuttavia viene pienamente ripristinato in circa 12 settimane. Anche le placche in compressione consentono di ottenere una condizione di stabilità per la guarigione dell'osso, ma non danno un adeguato stimolo osteogenico; proprio per questo occorre spesso associare un innesto osseo. Inoltre nelle forme ipertrofiche è frequente l'associazione con dismetria dell'arto o deformità angolare, con conseguente accorciamento dell'arto coinvolto. Questa condizione viene trattata con un'osteosintesi monolocale in distrazione, che consiste in un allontanamento graduale dei capi di pseudoartrosi, con contemporanea correzione di deformità associate per mezzo della guida di un fissatore esterno circolare. Le *pseudoartrosi atrofiche* richiedono una stimolazione biologica superiore alle forme normotrofiche, che può essere ottenuta tramite l'uso di *innesti ossei* o di *fattori di crescita*. Per le *pseudoartrosi infette* il trattamento

chirurgico è basato sull'utilizzo di fissatori esterni previo accurato *dèbridement*, con completa asportazione dei trami fistolosi e di tutti i tessuti necrotici e infetti, e successivo lavaggio con soluzione antibiotica.

E' evidente quindi che la maggior parte delle pseudoartrosi asettiche sintomatiche necessita di una stimolazione biologica per poter guarire. Essi possono essere innesti ossei autologhi od omologhi o sostituti ossei.

Innesti ossei autologhi – Sono prelevati dal paziente stesso in un sito donatore come per esempio le creste iliache. Hanno diverse proprietà tra cui la osteoconduttività e l'osteoaduttività. Un innesto osseo fornisce una impalcatura in cui di nuovo tessuto osseo può crescere, ed inoltre questi tipi di innesti forniscono cellule ossee fresche e fattori di crescita che stimolano la rigenerazione ossea. Nonostante le ottime qualità, questi tipi di innesto hanno diversi svantaggi, tra cui la disponibilità limitata e la morbidità a livello del sito donatore. In particolare risulta difficile ottenere una quantità sufficiente di innesto osseo quando le perdite di sostanza sono ingenti. (Fig 3A-E)

Innesti ossei omologhi – si utilizza osso proveniente da donatore vivo (teste di femore) o cadavere. Il principale vantaggio è di non richiedere un prelievo dal paziente, limitando quindi le incisioni e il dolore postoperatorio. Anch'esso funge da impalcatura per la formazione di nuovo tessuto osseo (proprietà osteoconduttiva) ma non contiene cellule vive e di conseguenza deve essere sostituito dal nuovo osso del paziente (non possiede proprietà osteoaduttiva).

Sostituti ossei – sono materiali di sintesi che hanno una composizione molto simile a quella dell'osso umano. Hanno proprietà osteoconduttive e non osteoinduttive come l'osso omologo. Hanno come svantaggio gli elevati costi, proprietà meccaniche inferiori a quelle dell'osso e tempi di integrazione più lunghi.



Fig 3 A – Pseudoartrosi atrofica sintomatica di clavicola destra in uomo di 40 anni – a 10 mesi dal trauma iniziale è ancora presente dolore costante, impotenza funzionale.

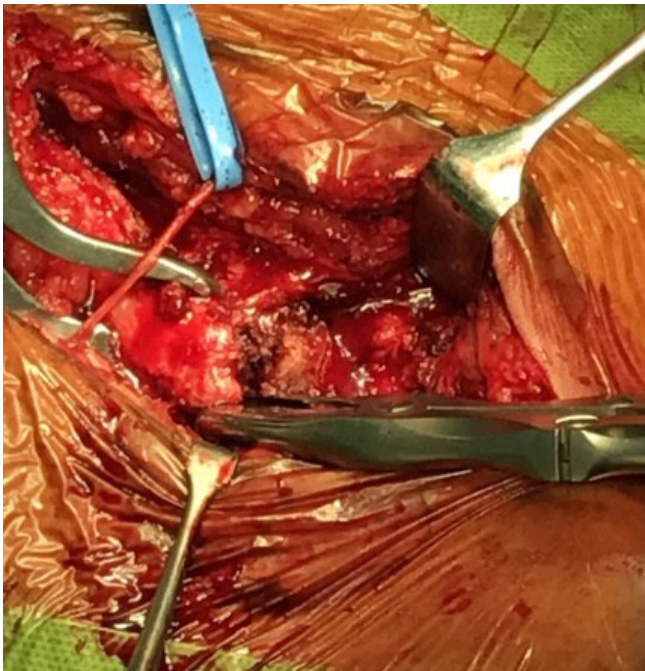


Fig 3 B – Debridement del focolaio di pseudoartrosi.

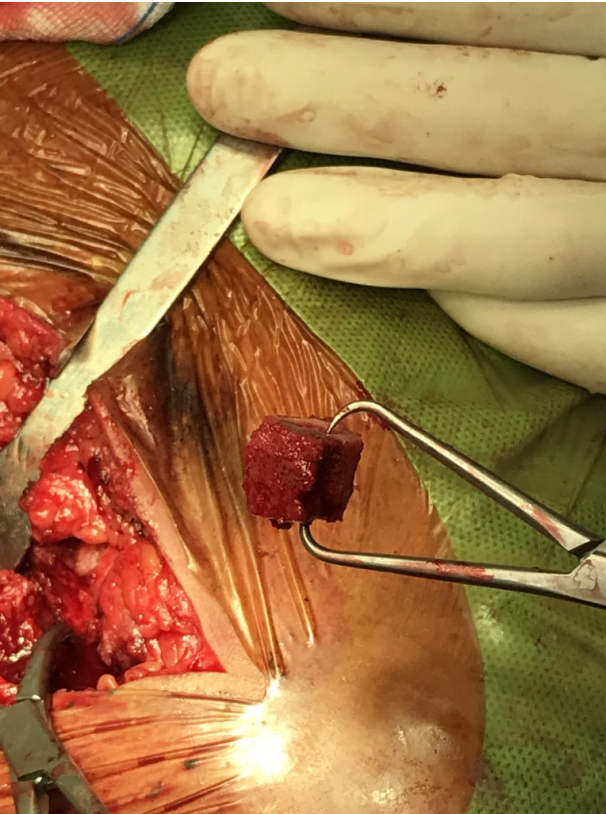


Fig 3 C – Preparazione innesto osso autologo prelevato da cresta iliaca.

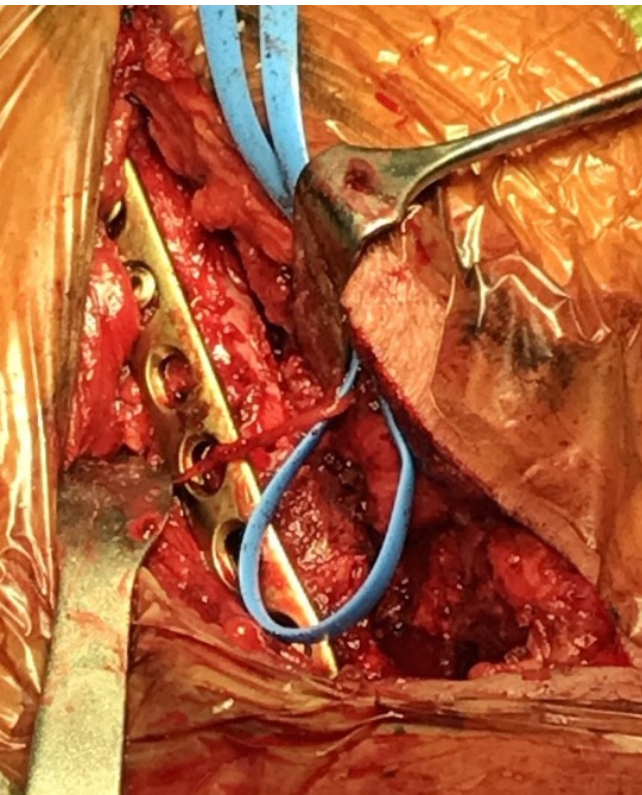


Fig 3 D – Applicazione innesto nel gap osseo e applicazione placca in compressione.



Fig 3 E – Controllo radiografico a 1 mese di distanza dall'intervento.

Nell'ambito della medicina rigenerativa negli ultimi anni l'ingegneria tissutale ha rapidamente proposto metodiche in grado di offrire la possibilità di riparare e rigenerare tessuti ed organi specifici, integrando discipline diverse, dalla chimica, alla fisica, alla biologia. Al fine di stimolare la osteogenesi nel trattamento della pseudoartrosi asettica sintomatica (aumentando la concentrazione locale di fattori di crescita) si può utilizzare il gel piastrinico (Platelet Rich Fibrin – PRF). Il gel di piastrine è un concentrato autologo di piastrine umane (ricche di fattori di crescita all'interno degli α -granuli in esse contenuti) in un piccolo volume di plasma. In quanto tale, il gel piastrinico contiene inoltre fibrinogeno, fibronectina e vitronectina, molecole plasmatiche dotate anche di proprietà osteoconduttive. L'attivazione piastrinica implica il rilascio dagli alfa-granuli di fattori di crescita utili ai processi di riparazione: PDGFs (platelet-derived growth factors), sono potenti regolatori della

migrazione, proliferazione e sopravvivenza delle cellule mesenchimali; TGF- β (transforming growth factor beta), costituisce il più potente agente fibrogenico tra le citochine; IGF I e II (insulin-like growth factor) regolatori positivi della proliferazione e differenziazione di molti tipi cellulari.

Sempre nell'ambito della medicina rigenerativa, al presente esistono diversi studi preclinici e clinici riguardanti l'uso di cellule mesenchimali vasculo-stromali prelevate da midollo osseo (BM-MSCs) ed usate come mezzo di stimolazione della riparazione ossea.

Il prelievo di cellule mesenchimali ottenute dal midollo osseo presenta alcuni limiti, quali la invasività della procedura, il dolore nel sito di prelievo e la raccolta di quantità molto limitate di tessuto (e conseguentemente di cellule mesenchimali); infatti, il numero di BM-MSCs contenuto in 1 ml (1 cc) di midollo osseo aspirato varia da 108 a 612 ± 134 .

Poiché il numero di cellule diminuisce rapidamente dopo la prima aspirazione, le BM-MSCs ottenute con aspirazione di 10-40 ml di midollo osseo dalla cresta iliaca varia da $1,5 \times 10^3$ /mL e $2,5 \times 10^3$ /mL.

Inoltre, è stata riportata una correlazione inversa tra età e potenziale di differenziazione delle BM-MSCs, rendendo l'utilizzo di queste cellule molto problematico nelle persone anziane.

Il prelievo di VSCs da lipoaspirato offre diversi vantaggi rispetto alle BM-MSCs: tessuto del donatore abbondante, numero abbondante di cellule, la compliance

del paziente, la facilità di procedura, il minimo tasso di complicanze post-operatorie, e la non necessità di coltura e/o amplificazione delle cellule.

Le VSCs isolate da lipoaspirato mostrano caratteristiche peculiari alle BM-MSCs, inclusa la capacità di formare colonie simil-fibroblastiche (CFU-U), di differenziarsi in differenti linee cellulari mesodermiche ad ottenere tessuti quali l'osso, la cartilagine, il muscolo ed i vasi, e di esprimere antigeni di superficie comuni alle BM-MSCs.

Con il nostro protocollo illustrato nella sezione Materiali e Metodi è possibile ottenere, entro circa 2 ore, una media di $8,75 \times 10^5$ VSCs vitali, altamente purificate, pronte per essere utilizzate nella stessa seduta operatoria.

Quindi il numero di cellule ottenibili da tessuto adiposo è 1430 volte maggiore rispetto al numero ottenibile dal midollo osseo. Tenendo presente che non è insolito lipoaspirare fino a più di 1 litro di tessuto adiposo, il numero di VSCs ottenibili può essere ulteriormente moltiplicato per un fattore di 20 (quindi circa $1,75 \times 10^7$ VSCs per procedura).

Un numero simile di BM-MSCs potrebbe essere ottenuto soltanto, con estese procedure di coltura cellulare. Tuttavia, questi numerosi passaggi possono provocare una perdita della loro funzione ed in aggiunta provocare mutazioni e potenziali effetti cancerogeni.

I vantaggi della tecnica "one-step" sono evidenti: in una singola sessione di chirurgia le VSCs sono sia isolate che applicate nel sito di interesse.

Non è possibile valutare il tasso di sopravvivenza di VSCs dopo l'iniezione in vivo in soggetti umani nei seguenti giorni o settimane. Tuttavia, diversi studi pre-clinici hanno dimostrato la piena sopravvivenza di tali cellule in modelli animali e la loro capacità di subire e promuovere la differenziazione in cellule osteoblastiche.

È interessante notare che, VSCs hanno dimostrato di regolare i geni osteogenici in risposta a sollecitazioni di taglio, il che le rende in grado di “rispondere” ad un carico meccanico.

Un esempio pratico di applicazione chirurgica può essere rappresentato dalla pseudoartrosi di clavicola.

Le fratture di clavicola, sebbene generalmente siano considerate lesioni benigne, possono essere soggette a complicanze, in particolare a pseudoartrosi; le percentuali di pseudoartrosi riportate in letteratura variano tra il 0.1% e il 15%; fattori predisponenti includono la severità del trauma iniziale, l'importante scomposizione e accorciamento nonché la comminazione della frattura, l'interposizione di tessuti molli e l'inadeguata immobilizzazione iniziale.

L'iniezione di VSCs vitali può essere effettuata nel tessuto adiposo sottocutaneo (rispettando così sia il sito di origine che il sito di destinazione delle VSCs) intorno al focolaio di pseudoartrosi dopo debridement aperto del tessuto fibrotico e prima della applicazione della placca con viti in compressione per la sintesi definitiva. Questo allo scopo di evitare il trapianto di autologo osso, una procedura che richiede

un secondo intervento chirurgico e ha alcune morbilità, come il dolore e infezione del sito donatore (cresta iliaca).

Controindicazioni assolute a queste o altre procedure di ricostruzione ossea con VSCs sono le infezioni locali o sistemiche, la perdita di tessuto osseo neoplastico, la sierologia positiva per l'HIV 1 o HIV-2, l'epatite B (HBsAg), dell'epatite C (anti-HCV-Ab) e le malattie immunosoppressive .

Bibliografia

1. Ahn HH, Kim KS, Lee JH, Lee JY, Kim BS, Lee IW, Chun HJ, Kim JH, Lee HB, Kim MS. In vivo osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in an injectable in situ-forming gel scaffold. *Tissue Eng Part A* 2009;15:1821–1832. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0386.
2. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1927–35.
3. Ateshrang A, Ochs BG, Ludemann M, Weise K, Albrecht D. Fibula and tibia fusion with cancellous allograft vitalised with autologous bone marrow: first results for infected tibial nonunion. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009 Jan;129(1):97-104. doi: 10.1007/s00402-008-0699-2.
4. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 2004;6(1):7-14.
5. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007;25(6):1384–1392.
6. Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W. Adipose-Derived Mesenchymal Cells for Bone Regeneration: State of the Art. *BioMed Research International* 2013;2013:416391. doi: 10.1155/2013/416391.
7. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:985–96.
8. Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM. Differentiation of adipose stem cells. *Methods in Molecular Biology* 2008; vol. 456, pp. 155–171. doi: 10.1007/978-1-59745-245-8_12.
9. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008; Jun;45(2):115-20. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
10. Dallari D, Savarino L, Stagni C, Cenni E, Cenacchi A, Fornasari PM, Albisinni U, Rimondi E, Baldini N, Giunti A. Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:2413–20.
11. De Girolamo L, Sartori MF, Arrigoni E, Rimondini L, Albisetti W, Weinstein RL, Brini AT. Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction. *Int J Artif Organs* 2008;31:467–479.

12. Dodson MV, Wei S, Duarte M, Du M, Jiang Z, Hausman GJ, Bergen WG. Cell Supermarket: Adipose Tissue as a Source of Stem Cells. *Journal of Genomics* 2013; 1:39-44. doi: 10.7150/jgen.3949.
13. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
14. Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, Benhaim P. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 2007;13:1615–1621.
15. Elabd C, Chiellini C, Massoudi A, Cochet O, Zaragosi LE, Trojani C, Michiels JF, Weiss P, Carle G, Rochet N, Dechesne CA, Ailhaud G, Dani C, Amri EZ. Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:342–348.
16. Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 2010 Jul;5(7):1294-311. doi: 10.1038/nprot.2010.81.
17. Fang GW, Liu XS, Lv TZ, Shu HS, Shao H. A new choice for the treatment of segmental tibial bone defects: Intramedullary nail internal fixation combined adipose-derived stem cells technique. *Med Hypotheses* 2013 Apr;80(4):422-4. doi: 10.1016/j.mehy.2012.12.032.
18. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013 Aug;21(8):1717-29. doi:10.1007/s00167-012-2329-3.
19. Gaíba S, França LP, França JP, Ferreira LM. Characterization of human adipose derived stem cells. *Acta Cir Bras* 2012;27:471–476.
20. Giannoni P, Mastrogiacomo M, Alini M, Pearce SG, Corsi A, Santolini F, Muraglia A, Bianco P, Cancedda R. Regeneration of large bone defects in sheep using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2008 Jul;2(5):253-62. doi: 10.1002/term.90.
21. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1(2): 19. doi:10.1186/scrt19.
22. Gomez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* 2015 Jan;70:93-101. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.033.
23. Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 2006 Dec;27(36):6052-63.
24. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, Longobardi L, Jansen ED, Mortlock DP, Spagnoli A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 2009 August ; 27(8): 1887–1898. doi:10.1002/stem.103.

25. Guilak F, Awad HA, Fermor B, Leddy HA, Gimple JM. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 2004;41(3-4):389-99.
26. Guilak F, Estes BT, Diekman BO, Moutos FT, Gimple JM. 2010 Nicolas Andry Award: Multipotent Adult Stem Cells from Adipose Tissue for Musculoskeletal Tissue Engineering. *Clin Orthop Relat Res* 2010; 468:2530–2540. doi 10.1007/s11999-010-1410-9.
27. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimple JM. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 2001;7:729–741.
28. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004;178:2–12.
29. Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K, Ishihara M. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;76:230–239.
30. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1430–7.
31. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(Suppl. 1 Pt 2):322–7.
32. Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J Orthop* 2009;43:40–5. doi: 10.4103/0019-5413.45322.
33. Hernigou P, Flouzat-Lachaniette CH, Delambre J, Poignard A, Allain J, Chevallier N, Rouard H. Osteonecrosis repair with bone marrow cell therapies: State of the clinical art *Bone* 2015 Jan;70:102-9. doi: 10.1016/j.bone.2014.04.034.
34. Im GI, Lee JH. Repair of osteochondral defects with adipose stem cells and a dual growth factor-releasing scaffold in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;92:552–560. doi:10.1002/jbm.b.31552.
35. Kang Y, Liao WM, Yuan ZH, Sheng PY, Zhang LJ, Yuan XW, Lei L. In vitro and in vivo induction of bone formation based on adeno-associated virus-mediated BMP-7 gene therapy using human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:839–849.
36. Kang SH, Chung YG, Oh IH, Kim YS, Min KO, Chung JY. Bone regeneration potential of allogeneic or autogeneic mesenchymal stem cells loaded onto cancellous bone granules in a rabbit radial defect model. *Cell Tissue Res* 2014;355:81–8. doi: 10.1007/s00441-013-1738-z.
37. Kasten P, Beyen I, Egermann M, Suda AJ, Moghaddam AA, Zimmermann G, Luginbühl R. Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *Eur Cell Mater* 2008 Oct 23;16:47-55.

38. Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Andrew JG, Hardingham TE. The epitope characterization and the osteogenic differentiation potential of human fat pad-derived stem cells is maintained with ageing in later life. *Injury* 2009;40:150–157. doi: 10.1016/j.injury.2008.05.029.
39. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK, Im SA, Won YD, Sung YB, Jeon TS, Chang CH, Jang JD, Lee SB, Kim HC, Lee SY. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord* 2009;10:20. doi: 10.1186/1471-2474-10-20.
40. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J Pediatr Orthop* 2009;29:643–9. doi: 10.1097/BPO.0b013e3181b2afb2.
41. Klein JA. *Tumescent Technique. Tumescent Anesthesia & Microcannular Liposuction*. St. Louis: Mosby, USA, 2000.
42. Kristjánsson B, Honsawek S. Current perspectives in mesenchymal stem cell therapies for osteoarthritis. *Stem Cells Int* 2014;2014:194318. doi: 10.1155/2014/194318.
43. Levi B, Longaker MT. Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Medicine Stem Cells* 2011 April; 29(4): 576–582. doi:10.1002/stem.612.
44. Li X, Liu H, Niu X, Fan Y, Feng Q, Cui FZ, Watari F. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells induced by osteoinductive calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;97:10–19. doi:10.1002/jbm.b.31773.
45. Li X, Liu H, Niu X, Yu B, Fan Y, Feng Q, Cui FZ, Watari F. The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro and ectopic bone formation in vivo. *Biomaterials* 2012;33:4818–4827. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.045.
46. Locke M, Feisst V, Dunbar P.R. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 2011;29:404–411. doi: 10.1002/stem.593.
47. Long T, Zhu Z, Awad HA, Schwarz EM, Hilton MJ, Dong Y. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice. *Biomaterials* 2014 Mar;35(9):2752-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.039.
48. Mathieu M, Rigutto S, Ingels A, Spruyt D, Stricwant N, Kharroubi I, Albarani V, Jayankura M, Rasschaert J, Bastianelli E, Gangji V. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone* 2013;53:391–8. doi: 10.1016/j.bone.2013.01.005.
49. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials* 2008;29:3053–61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.012.
50. Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 2006;30:115–8.

51. Myers KR, Sgaglione NA, Grande DA. Trends in biological joint resurfacing. *Bone Joint Res* 2013 Sep 16;2(9):193-9. doi: 10.1302/2046-3758.29.2000189.
52. Ochs BG, Schmid U, Rieth J, Ateschrang A, Weise K, Ochs U. Acetabular bonereconstruction in revision arthroplasty: a comparison of freeze-dried, irradiated and chemically-treated allograft vitalised with autologous marrow versus frozen non-irradiated allograft. *J Bone Joint Surg Br* 2008;90:1164–71. doi: 10.1302/0301-620X.90B9.20425.
53. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006;8:166–77.
54. Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Madry H, Cucchiari M. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* 2014; 7: 1–17. doi:10.2147/SCCAA.S42880.
55. Pang L, Hao W, Jiang M, Huang J, Yan Y, Hu Y. Bony defect repair in rabbit using hybrid rapid prototyping polylactic-co-glycolic acid/beta-tricalciumphosphate collagen I/apatite scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells. *Indian J Orthop* 2013;47:388–94. doi: 10.4103/0019-5413.114927.
56. Park IH, Micic ID, Jeon IH. A study of 23 unicameral bone cysts of the calcaneus: open chip allogeneic bone graft versus percutaneous injection of bone powder with autogenous bone marrow. *Foot Ankle Int* 2008;29:164–70. doi: 10.3113/FAI.2008.0164.
57. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, Grgurevic L, Trkulja V, Bagi CM, Vukicevic S. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 2015 Jan;70:73-86. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.010.
58. Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, Cousin B. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* 2010 Nov;28(11):2065-72. doi: 10.1002/stem.523.
59. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res* 2006 Apr 1;312(6):727-36.
60. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385–6.
61. Qi Y, Feng G, Yan W. Mesenchymal stem cell-based treatment for cartilage defects in osteoarthritis. *Mol Biol Rep* 2012 May;39(5):5683-9. doi: 10.1007/s11033-011-1376-z.
62. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev* 2011;7:64–76. doi: 10.1007/s12015-010-9147-0.
63. Rada T, Santos TC, Marques AP, Correlo VM, Frias AM, Castro AG, Neves NM, Gomes ME, Reis RL. Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human adipose-derived stem cells: an in vitro and in vivo study. *J Tissue Eng Regen M* 2012;6:1–11. doi: 10.1002/term.388.

64. Raposio E, Guida C, Baldelli I, Benvenuto F, Curto M, Paleari L, Filippi F, Fiocca R, Robello G, Santi PL. Characterization and induction of human pre-adipocytes. *Toxicol In Vitro* 2007; Mar;21(2):330-4.
65. Raposio E, Caruana G, Bonomini S, Libondi G. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg* 2014 Jun;133(6):1406-9. doi: 10.1097/PRS.0000000000000170.
66. Rathbone CR, Guda T, Singleton BM, Oh DS, Appleford MR, Ong JL, Wenke GC. Effect of cell-seeded hydroxyapatite scaffolds on rabbit radius bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:1458–66. doi: 10.1002/jbm.a.34834.
67. Riminucci M, Remoli C, Robey PG, Bianco P. Stem cells and bone diseases: new tools, new perspective. *Bone* 2015 Jan;70:55-61. doi: 10.1016/j.bone.2014.09.009.
68. Robey PG, Kuznetsov SA, Ren J, Klein HG, Sabatino M, Stroncek DF. Generation of clinical grade human bone marrow stromal cells for use in bone regeneration. *Bone* 2015 Jan;70:87-92. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.020.
69. Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res* 2014 Feb;100(1Suppl):S107-12. doi: 10.1016/j.otsr.2013.11.010.
70. Salibian AA, Widgerow AD, Abrouk M, Evans GR. Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. *Arch Plast Surg* 2013 November; 40(6): 666–675. doi:10.5999/aps.2013.40.6.666.
71. Shen JF, Sugawara A, Yamashita J, Ogura H, Sato S. Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose tissues. *Int J Oral Sci* (2011) 3:117-124 doi: 10.4248/IJOS11044.
72. Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, Bogdanský S, Atkinson BL. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1313–1321. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0357.
73. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):132-41.
74. Supronowicz P, Gill E, Trujillo A, Thula T, Zhukauskas R, Ramos T, Cobb RR. Human adipose-derived side population stem cells cultured on demineralized bone matrix for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2011;17:789–798. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0357.
75. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med* (Maywood) 2009;234:1–9. doi: 10.3181/0805/MR-170.

76. Wall ME, Bernacki SH, Lobo EG. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2007;13:1291–1298.
77. Wang J, Ye Y, Tian H, Yang S, Jin X, Tong W, Zhang Y. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412:143–149. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.062.
78. Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2006;34:466–471.
79. Wright JG, Yandow S, Donaldson S, Marley L. A randomized clinical trial comparing intraleisional bone marrow and steroid injections for simple bone cysts. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:722–30. doi: 10.2106/JBJS.G.00620.
80. Zamzam MM, Abak AA, Bakarman KA, Al-Jassir FF, Khoshhal KI, Zamzami MM. Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts. *Int Orthop* 2009;33:1353–8. doi: 10.1007/s00264-008-0619-7.
81. Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, Liu B, Yu X. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* 2012;50:325–30. doi: 10.1016/j.bone.2011.11.002.
82. Zou XH, Cai HX, Yin Z, Chen X, Jiang YZ, Hu H, et al. A novel strategy incorporated the power of mesenchymal stem cells to allografts for segmental bone tissue engineering. *Cell Transplant* 2009;18:433–41. doi: 10.3727/096368909788809839.
83. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211–228.
84. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–4295.
85. Zuk P, Chou YF, Mussano F, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res* 2011;52:119–132. doi: 10.3109/03008207.2010.484515.