



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

**RUOLO DELL'IP OSSIA NEL DIFFERENZIAMENTO
CONDROCITARIO: APPLICAZIONI NELLA MEDICINA
RIGENERATIVA.**

**ROLE OF HYPOXIA IN CHONDROCYTE DIFFERENTIATION:
APPLICATIONS IN REGENERATIVE MEDICINE.**

Relatore:

Chiar.mo Prof. PAOLO BORGHETTI

Correlatore:

Dott.ssa ELENA DE ANGELIS

Laureanda:

MARTINA VECCHI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1 ARTICOLAZIONI SINOVIALI	5
1.1 <i>Capsula articolare</i>	6
1.2 <i>Membrana sinoviale</i>	7
1.3 <i>Liquido sinoviale</i>	8
1.4 <i>Osso subcondrale</i>	9
2 IL TESSUTO CARTILAGINEO	10
2.1 <i>La cartilagine ialina</i>	10
2.2 <i>La cartilagine articolare</i>	11
2.2.1 <i>Funzione della cartilagine articolare</i>	13
3 COMPOSIZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE	15
3.1 <i>La Matrice Extracellulare (ECM)</i>	15
3.1.1 <i>Le fibre collagene</i>	16
3.1.2 <i>I Proteoglicani</i>	17
3.1.3 <i>I Glicosamminoglicani (GAGs)</i>	20
3.1.4 <i>Le Glicoproteine</i>	21
3.2 <i>I Condrociti</i>	23
4 CONDROGENESI	26
4.1 <i>Condensazione delle cellule mesenchimali</i>	27
4.2 <i>Differenziamento in condrociti e proliferazione</i>	30
4.3 <i>Ipertrofia e maturazione</i>	32
4.4 <i>Regolazione della condrogenesi</i>	34
5 IPOSSIA	39
5.1 <i>Risposta cellulare e tissutale ai danni causati dall'ipossia</i>	39
5.2 <i>Sopravvivenza dei condrociti in ambiente ipossico</i>	40
6 PATOLOGIE ARTICOLARI DEL CAVALLO	45
6.1 <i>Osteoartrite (osteoartrosi o malattia degenerativa articolare)</i>	45
6.1.1 <i>Inizio e progressione</i>	49
6.1.2 <i>Evoluzione della lesione</i>	52
6.2 <i>Importanza del meccanismo autofagico in corso di osteoartrite</i>	53
6.3 <i>Ruolo dell'ipossia, di HIF-1α e HIF-2α in corso di osteoartrite</i>	55
6.4 <i>Opzioni terapeutiche per l'osteoartrite (OA)</i>	57
6.4.1 <i>Terapie mediche</i>	57
6.4.2 <i>Terapie chirurgiche</i>	60
7 RIGENERAZIONE E RIPARAZIONE DEL TESSUTO CARTILAGINEO	63

8	LA MEDICINA RIGENERATIVA COME NUOVA OPZIONE TERAPEUTICA PER IL TRATTAMENTO DELL'OSTEOARTRITE.....	67
8.1	<i>Terapia cellulare</i>	68
8.2	<i>Terapia genica</i>	69
8.3	<i>Ingegneria tissutale</i>	69
8.3.1	Cellule.....	70
8.3.1.1	Trapianto di condrociti autologhi (ACI)	71
8.3.1.2	Terapia con cellule staminali mesenchimali (MSCs).....	72
8.3.2	Scaffold.....	73
8.3.2.1	Configurazione degli scaffold	75
8.3.3	Proprietà meccaniche.....	78
9	L'USO DEI CONDROCITI NELLA RIPARAZIONE DELLA CARTILAGINE	79
9.1	<i>Trapianto di condrociti allogenici</i>	80
9.2	<i>Sistemi di coltura adatti per i condrociti</i>	82
9.2.1	Medium.....	82
9.2.2	Idrogel in alginato (BEADS)	83
9.2.2.1	Protocollo standard di preparazione degli Idrogel in Alginato di Sodio	86
	RAZIONALE.....	88
1	PRINCIPALI COMPLICAZIONI RELATIVE ALLA COLTIVAZIONE <i>IN VITRO</i> DEI CONDROCITI	88
2	UTILIZZO DELL'IPPOSSIA NELL'INGEGNERIA TISSUTALE PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO CARTILAGINEO.....	93
	MATERIALI E METODI	96
1	CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEGLI ARTI	96
2	ESPIANTO DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE	97
3	DIGESTIONE DELLA MATRICE E ISOLAMENTO DEI CONDROCITI	99
3.1	<i>Controllo delle contaminazioni microbiche dei condrociti</i>	99
3.2	<i>Digestione enzimatica della matrice cartilaginea</i>	99
3.2.1	Preparazione della soluzione di proteasi 0,1% (pronasi) e prima digestione della cartilagine	100
3.2.2	Preparazione della soluzione di collagenasi 0,2% e seconda digestione della cartilagine	100
3.3	<i>Isolamento dei condrociti</i>	101
3.3.1	Valutazione numerica della sospensione cellulare mediante reticolo di Burker ..	102
4	SISTEMI DI COLTURA	104
4.1	<i>Semina in adesione su plastica</i>	104
4.2	<i>Semina in Beads di alginato di Sodio</i>	104
4.3	<i>Soluzioni</i>	104
4.4	<i>Preparazione delle Beads di Alginato di Sodio</i>	105
4.5	<i>Condizioni di coltura</i>	106

5	CONSERVAZIONE DELLE CELLULE A BASSE TEMPERATURE	107
5.1	<i>Congelamento delle cellule</i>	107
5.2	<i>Scongelamento delle cellule</i>	108
6	ANALISI MOLECOLARE	109
6.1	<i>Estrazione dell'RNA messaggero (mRNA)</i>	109
6.1.1	Quantificazione dell'RNA e valutazione della purezza.....	111
6.2	<i>Retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA</i>	112
6.3	<i>Real Time PCR (Real Time - Polymerase Chain Reaction) o qPCR (PCR</i> <i>quantitativa)</i>	114
6.3.1	Reagenti per la rivelazione (fluorescenza).....	115
6.3.2	Fasi della Real Time PCR.....	115
6.3.3	Melt curve	118
6.3.4	Sistema $\Delta/\Delta C_t$	119
6.3.5	Analisi statistica dei dati	120
	RISULTATI	121
1	VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI MARKERS DIFFERENZIAATIVI/SDIFFERENZIAATIVI IN CONDROCITI SEMINATI IN ADESIONE SU PLASTICA	121
2	VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI MARKERS DIFFERENZIAATIVI/SDIFFERENZIAATIVI IN CONDROCITI SEMINATI IN IDROGEL DI ALGINATO DI SODIO (BEADS)	125
	DISCUSSIONE	128
	CONCLUSIONI	140
	BIBLIOGRAFIA	142

RIASSUNTO

Il presente studio sperimentale ha avuto l'obiettivo di studiare e capire se, e in che misura, l'ipossia e i fattori dipendenti da essa, in particolare HIF-1 α , potessero influenzare il differenziamento condrocitario *in vitro*. Per tali indagini, espianti di cartilagine sono stati ottenuti dall'articolazione metacarpo- e metatarso-falangea (articolazione del nodello) di arti di equino prelevati in macello.

L'espianto è stato fatto esclusivamente da articolazioni senza segni di artropatia o degenerazione cartilaginea per prevenire alterazioni nell'espressione genica dovute a una condizione patologica iniziale dei condrociti.

I condrociti isolati sono stati successivamente coltivati in due diversi sistemi colturali: 1) in adesione su plastica (sistema bidimensionale) e 2) all'interno di sfere ("beads") di idrogel di alginato di sodio (sistema tridimensionale)

Entrambe le tipologie colturali sono state coltivate in quattro differenti condizioni: 1) in D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con siero fetale bovino al 10% mantenuto in normossia (20% di Ossigeno) (+FCSN); 2) D-MEM con siero fetale bovino al 10% mantenuto in ipossia (5% di Ossigeno) (+FCSI); 3) D-MEM senza siero fetale bovino mantenuto in normossia (-FCSN); 4) D-MEM senza siero fetale bovino mantenuto in ipossia (-FCSI). Le colture sono state così incubate per due settimane. Al termine di tale periodo dalle cellule è stato estratto l'RNA messaggero (mRNA) e quindi è stata eseguita l'analisi molecolare per valutare l'espressione dei *markers* condrocitari, tramite Real-Time PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Le analisi comprendevano i seguenti *markers* differenziativi: Collagene tipo II (COLL2), Aggrecano (ACAN), Fattore ipossia inducibile (HIF-1 α), SOX9 (*SRY-box transcription factor 9*); e i seguenti *markers* de-differenziativi: Collagene tipo I (COLL1) e Runx2 (*RUNX family transcription factor 2*).

I risultati ottenuti dalle analisi effettuate sono stati confrontati mediante *Test t* di Student per evidenziare le differenze statisticamente significative con un livello di significatività inferiore al 5% ($p < 0,05$).

Dal confronto dei due sistemi colturali si è riscontrata una maggiore espressione dei *markers* de-differenziativi nei condrociti seminati in adesione e una maggiore espressione di quelli differenziativi in quelli seminati in *beads*. In generale, l'ipossia indipendentemente dai sistemi colturali, riduce i *markers* di de-differenziamento e mantiene/aumenta i *markers* fenotipici del condrocita.

La condizione che maggiormente ha favorito l'espressione genica tanto in adesione, quanto in *beads* è stata quella in ipossia in terreno con FCS10%. Di particolare rilievo è l'espressione di COLL2, estremamente elevata, e di COLL1, praticamente non espresso in *beads* in nessuna condizione. Anche HIF-1 α e Sox-9, fattore ad esso correlato, hanno avuto un'espressione maggiore nelle colture in *beads*, suggerendo che la loro espressione sia strettamente influenzata dall'ipossia e che essa sia necessaria per mantenere il differenziamento condrocitario.

I risultati ottenuti mettono in evidenza che un sistema di coltura *in vitro* mantenuto in ipossia stimola maggiormente l'espressione genica di HIF-1 α da parte dei condrociti e la sua maggiore espressione sarebbe associata positivamente all'espressione di *markers* specifici del fenotipo condrocitario, in particolare COLL2, Aggrecano e SOX9.

I dati ottenuti, seppur preliminari, contribuiscono a spiegare in che modo l'ipossia, pur associata ad altri fattori, favorisca il mantenimento del fenotipo condrocitario; l'ipossia, infatti, stimola l'aumento dell'espressione di HIF-1 α , fattore di trascrizione che regola l'aumento di espressione di altri fattori di trascrizione implicati nell'attivazione di *pathway* necessari alla differenziazione e al mantenimento energetico e metabolico del condrocita.

ABSTRACT

The experimental study aims at trying to understand if and how hypoxia and other elements related to it, especially HIF-1 α , could influence the chondrocyte differentiation *in vitro*. For the experiments, we selected samples of articular cartilage from fetlock joints of properly slaughtered horses. Samples and explant of articular cartilage were obtained only from joints with no signs of arthropathy or cartilage degeneration, to prevent alteration in gene expression caused by a pathological condition.

Isolated chondrocytes were then seeded in two different methods of culture: adhesion culture on plastic (bidimensional system) and chondrocytes cultured into beads of hydrogel of sodium alginate (tridimensional system).

Independently to different types of culture, chondrocytes were cultured in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium in four different conditions: 1) D-MEM with bovine's fetal serum (FCS) at 10% maintained in normoxia (20% of Oxygen) (+FCSN); 2) D-MEM with bovine's fetal serum (FCS) at 10% maintained in hypoxia (5% of Oxygen) (+FCSI); 3) D-MEM without bovine's fetal serum (FCS) maintained in normoxia (-FCSN); 4) D-MEM without bovine's fetal serum (FCS) maintained in hypoxia (+FCSI).

At the end of two weeks of culture mRNA was extracted from the cells, and molecular analyses Real Time PCR method (Polymerase Chain Reaction) was performed to evaluate the following chondrocyte differentiation markers: collagen II (COLL2); Aggrecan (ACAN); Hypoxia inducible factor (HIF-1 α); Sox9 (Sox box transcription factor 9); and the following dedifferentiation markers: collagen I (COLL1) and Runx (RUNX family transcription factor 2).

The results were compared throughout a Test t Student to highlight some statistical differences, with a significant level cutoff under 5% ($p < 0,05$).

When comparing the two cultivation systems, we've noticed a higher expression of de-differentiation markers on chondrocytes seeded in adhesion and a higher expression of the differentiation markers in ones seeded in beads. Generally,

independently to different culture systems, hypoxia reduced de-differentiation markers and maintained the chondrocyte differentiation markers.

The condition with hypoxia and FCS10% mostly supported the gene expression, both in adhesion and beads. Particularly relevant was the expression of COL2, extremely high and the expression of COL1, non-detectable in all bead's conditions. Furthermore, the HIF-1 α and Sox-9 appear related factors and have a higher expression in cells cultured in beads, suggesting that their expression should be closely influenced by hypoxia, which is necessary to maintain the differentiation of chondrocytes.

The obtained results have showed that an in vitro culture maintained in hypoxia and with FCS upregulate gene expression of HIF-1 α in chondrocytes. Its major expression would be positively related to expression of other specific markers of chondrocyte phenotype, particularly COL2, aggrecan and Sox9.

These results can contribute to explain how hypoxia, associated at some other factors, could support the maintenance of chondrocyte phenotype. Indeed, hypoxia stimulates the expression of HIF-1 α and other transcription factors and the activation of pathways useful for the differentiation and for the energetic and metabolic maintenance of chondrocyte.

We discussed results making comparison with related recent studies found in literature. This was made to underline the analogies of the results we obtained, but also to show eventual limits of the present study and to present advice for the future analyses.

INTRODUZIONE

1 Articolazioni sinoviali

Per articolazione si definisce un complesso di strutture anatomiche che realizzano la connessione di due o più segmenti ossei e permettono il movimento tra essi (Borghetti Paolo, 2002).

Nelle articolazioni sinoviali (*Articulationes synoviales*) le estremità ossee articolari sono rivestite da cartilagine articolare di tipo ialino che permette lo scorrimento delle due estremità. Lo spazio che separa le superfici articolari è detto cavità articolare ed è riempita di un liquido lubrificante: il liquido sinoviale (*Synovia*) (Barone, 2012).

Lo spessore dello strato cartilagineo articolare può variare da 0,1 mm a 5 o 6 mm, ma è direttamente proporzionale all'intensità delle forze pressorie che vengono esercitate sull'articolazione stessa e al suo ruolo ammortizzante (Barone, 2012). Inoltre, nel cavallo, lo spessore è maggiore nelle articolazioni prossimali e distali degli arti rispetto a quelle intermedie per le forti pressioni che vengono esercitate durante le diverse discipline sportive. È bene ricordare che nella specie equina le patologie articolari hanno un'incidenza e un'importanza clinica elevata, come risultato di progressivi cambiamenti dell'apparato locomotore nel corso del processo evolutivo. Se da un lato, infatti, questi cambiamenti hanno permesso lo sviluppo di un apparato locomotore efficace e adatto alle discipline sportive, dall'altro, gli elevati livelli di *performance* richiesti, anche oltre le possibilità del soggetto, gli allenamenti intensi e continui, le poche pause durante la stagione agonistica, le continue sollecitazioni ed eventuali traumi, provocano enormi pressioni e ripercussioni a livello articolare nel cavallo atleta (Bhattacharya A.).

Tutte le componenti che vanno a costituire un'articolazione sinoviale sono mantenute in contatto da formazioni fibrose o fibro-elastiche che costituiscono le capsule articolari e i legamenti (Barone, 2012), e in modo accessorio anche muscoli e tendini (*Figura 1*).

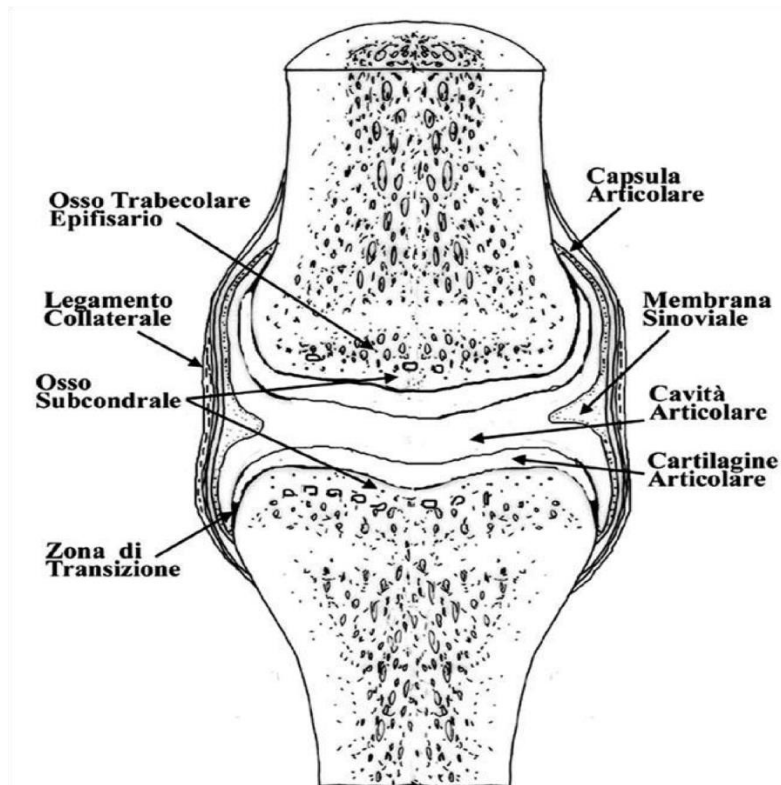


Figura 1: Schema delle strutture anatomiche presenti in un'articolazione sinoviale (Borghetti Paolo, 2002).

1.1 Capsula articolare

La capsula articolare (*Capsula articularis*) consiste in un forte e resistente strato fibroso che riveste esternamente la membrana sinoviale e che avvolge completamente l'articolazione. La sua struttura è data per la maggior parte da fasci densi di fibre collagene, con orientamenti differenti a seconda della profondità: negli strati più superficiali i fasci sono distribuiti longitudinalmente, mentre negli strati profondi trasversalmente (Barone, 2012). Si associano ai fasci di tessuto fibroso denso poche fibre elastiche, unite insieme da una trama connettivale lassa. Le caratteristiche di compattezza, rigidità e scarsa vascolarizzazione sono fondamentali per garantire il movimento e la stabilità articolare; inoltre, questo limita eventuali diffusioni di infezioni o neoplasie all'interno dell'articolazione. (Borghetti Paolo, 2002)

La faccia esterna, normalmente, solidarizza ai tendini mediante tessuto connettivo, ma in alcuni casi è possibile che ne riceva le inserzioni o che si fonda con essi. Il solidarizzo tra le due strutture è di fondamentale importanza durante il movimento,

infatti in questo modo anche la capsula articolare viene spostata nella direzione del tendine, evitando così di lesionarsi. La faccia interna è rivestita dalla membrana sinoviale, unita da un sottile strato connettivale (Barone, 2012).

1.2 Membrana sinoviale

La membrana sinoviale (*Membrana synovialis*) è un tessuto connettivo vascolarizzato che tappezza la superficie interna della capsula e della cavità articolare, ad eccezione delle superfici cartilaginee e i menischi. (Laurie R. Goodrich, 2006).

Per quanto riguarda la struttura della membrana sinoviale, essa è costituita di due strati: uno strato superficiale di tessuto fibroso, areolare o adiposo (subintima), che è in continuità con la faccia interna della capsula articolare e uno strato profondo (intima), che è quello più vicino alla sinovia e viene bagnato dal liquido sinoviale (Barone, 2012).

Lo strato superficiale è assente a livello di menischi, mentre quando è presente risulta in contatto con lo strato profondo. È solitamente sottile e fibroso nei punti in cui viene sottoposto a forze meccaniche importanti. È sullo strato superficiale che si inseriscono pliche e villi sinoviali (*Plicae et Villi synoviales*). Le cellule presenti in questo strato sono: fibrociti, mastociti (soprattutto nelle zone più ispessite), adipociti (a livello di pliche sinoviali) (Barone, 2012).

Lo strato profondo è avascolarizzato e può presentarsi come uno strato povero di cellule e quasi totalmente fibroso nelle aree dove si esercitano temporanee pressioni o pluristratificato nelle aree sottoposte a deboli forze meccaniche. (Barone, 2012).

La membrana sinoviale comprende diverse tipologie cellulari, associate a cellule con morfologia intermedia. Le cellule principali sono i sinoviociti (*Synovicytis*), che si possono disporre in strati cellulari discontinui. Nelle aree sottoposte a maggiori stress meccanici le cellule divengono appiattite e si dispongono l'una sopra l'altra, coperte da uno strato subintimale fibroso, mentre nelle aree sottoposte a poco

stress l'intima diviene ripiegata e ricopre lo strato subintimale di connettivo areolare o adiposo (Borghetti Paolo, 2002).

Si distinguono due tipologie di sinoviociti: sinoviociti di tipo A o fagocitari (istiocitari), facenti parte del sistema reticolo-fagocitario, e sinoviociti di tipo B o secretori, che sintetizzano acido ialuronico e prevalgono nell'articolazione matura (Laurie R. Goodrich, 2006).

La membrana sinoviale è anche sede delle cellule staminali mesenchimali (MSCs), che possiedono il potenziale di differenziarsi nei diversi *lineages* dei tessuti mesenchimali, inclusa appunto la cartilagine (Cosimo De Bari, 2001)

Le funzioni della membrana sinoviale sono quindi la fagocitosi, la produzione di acido ialuronico, la regolazione del contenuto proteico e salino del liquido sinoviale mediante la diffusione intrasinoviale delle componenti plasmatiche e il riassorbimento dei linfatici e infine la distensione e contrazione durante il movimento articolare (Borghetti Paolo, 2002). Risulta essere inoltre sede della risposta immunitaria e infiammatoria.

1.3 Liquido sinoviale

Il liquido sinoviale è un liquido vischioso, incolore o leggermente giallognolo, a reazione debolmente alcalina. In condizioni fisiologiche non deve essere molto abbondante, perché un suo aumento considerevole è indice di eventi patologici o sub-patologici (Barone, 2012).

La composizione chimica del liquido sinoviale varia a seconda della specie animale, dell'articolazione considerata, ma anche dell'attività stessa. Può essere considerato un dialisato del plasma contenente importanti proteine come acido ialuronico e lubrificina. (Borghetti Paolo, 2002). Il liquido sinoviale, essendo una riserva di proteine di derivazione cartilaginea e sinoviale serve anche come *biomarker* per la valutazione delle condizioni fisiologiche e patofisiologiche delle articolazioni (Barone, 2012).

La capacità lubrificante del liquido sinoviale, in condizioni fisiologiche, è ottenuta grazie alla sinergia di tre sue componenti: acido ialuronico, lubricina (glicoproteina) e fosfolipidi associati. La relazione tra queste tre componenti permette di ridurre in parte gli attriti e le frizioni meccaniche. L'effetto ammortizzante, però, si realizza anche grazie a un effetto idrostatico dovuto sia al liquido sinoviale sia al liquido che deriva dall'essudazione del tessuto cartilagineo sotto sforzo (Borghetti Paolo, 2002).

Il liquido sinoviale, oltre alla funzione di lubrificante e all'apporto di elasticità meccanica alle superfici articolari, è di fondamentale importanza per l'apporto nutrizionale delle cartilagini articolari. La membrana sinoviale possiede infatti un'alta vascolarizzazione e i microvasi presenti al suo interno sono responsabili anche della generazione del liquido sinoviale. Le arteriole, venule e i capillari sinoviali possiedono perforazioni e minute fenestrature che contengono piccoli pori coperti da una sottile membrana (Laurie R. Goodrich, 2006). La loro distribuzione è altamente organizzata e non uniforme (L. Haywood, 2001).

1.4 Osso subcondrale

L'osso subcondrale si localizza al di sotto dello strato calcificato della cartilagine articolare. È più sottile delle altre ossa corticali e la sua rigidità modifica le forze compressive a cui è sottoposta la cartilagine articolare (Borghetti Paolo, 2002).

2 Il tessuto cartilagineo

Il tessuto cartilagineo fa parte dei tessuti connettivi specializzati ed ha la funzione di connettere altri tessuti tra di loro nella formazione degli organi. Tutti i tessuti connettivi sono accumulati dalla stessa organizzazione strutturale e/o dall'origine mesenchimale. Durante il periodo di accrescimento nella vita post-natale dell'individuo, la cartilagine permane nelle aree di confine tra epifisi e diafisi delle ossa lunghe, permettendo lo sviluppo in lunghezza di tali segmenti ossei (cartilagine di accrescimento o di coniugazione). Nell'animale adulto, invece, la cartilagine permane a livello delle superfici articolari, che non si ossificano, e in altre sedi specifiche (Adamo, 2012).

Il tessuto cartilagineo è costituito da cellule, quali condroblasti e condrociti, che sono circondate da matrice extracellulare allo stato di gel. Si tratta di un tessuto privo di vasi sanguigni, che viene nutrito per diffusione dalla matrice stessa. È generalmente rivestito da un tessuto connettivo capsulare, di tipo fibroso compatto, definito pericondrio, ad eccezione delle superfici articolari, che sono a diretto contatto con il liquido sinoviale (Dipartimento di Medicina Sperimentale - Università di Genova, 2011-2019).

2.1 La cartilagine ialina

La cartilagine ialina è il tipo di cartilagine maggiormente presente nei tessuti dei mammiferi domestici. Macroscopicamente appare come una superficie liscia e traslucida. La cartilagine immatura ha una colorazione più bianco-bluastro, mentre quella matura è più giallognola. Può assumere anche una colorazione più rosata, quando lo strato si assottiglia e si intravede l'osso sottostante. È abbastanza elastica e resistente alla compressione. La matrice viscosa permette la nutrizione e il passaggio di metaboliti per diffusione (Adamo, 2012).

I condrociti possiedono un nucleo evidente con uno o più nucleoli e si alloggiano in lacune della matrice extracellulare. Nella cartilagine ialina matura i condrociti si raggruppano in isolotti, definiti gruppi isogeni, assenti invece nella cartilagine

immatura (Dipartimento di Medicina Sperimentale - Università di Genova, 2011-2019).

La matrice della cartilagine ialina si presenta allo stato di gel compatto, è povera di fibre e formata in prevalenza da sostanza amorfa ricca di proteoglicani, in particolar modo intorno ai gruppi isogeni (Dipartimento di Medicina Sperimentale - Università di Genova, 2011-2019).

2.2 La cartilagine articolare

La cartilagine articolare è di tipo ialino. Strutturalmente si riconoscono in essa due strati: lo strato superficiale e lo strato profondo. Lo strato superficiale è di colore biancastro e lucente, mentre quello profondo, più spesso, è opaco e grigiastro.

Embriologicamente, la cartilagine articolare deriva dai processi di ossificazione dei centri di ossificazione epifisari. Durante il processo di ossificazione endondrale, la parte di cartilagine più superficiale non viene intaccata dalla calcificazione e persiste, come cartilagine articolare, mentre la parte più profonda, la cartilagine epifisaria di accrescimento, che è attiva, ossifica alla fine del processo. Durante la fase di sviluppo osteocartilagineo, i due strati di cartilagine, articolare ed epifisaria, vengono definiti come complesso cartilagineo articolare-epifisario (CCA), che viene nutrito da canali cartilaginei, vasi e nervi, che a fine del processo di ossificazione si riducono per poi andare incontro ad atrofia. Nel Cavallo la cartilagine epifisaria dei condili del femore risulta avascolare già a 5 mesi di vita (Borghetti Paolo, 2002).

La cartilagine articolare è un tessuto costituito da poche cellule, i condrociti, immersi nella matrice extracellulare. (Borghetti Paolo, 2002). Essendo questo tessuto avascolarizzato, i nutrienti, così come i cataboliti vengono trasportati mediante il liquido sinoviale per diffusione attraverso la matrice extracellulare. La cartilagine è unita al tessuto osseo sottostante mediante una sottile linea di cartilagine calcificata (Camila B. Carballo, 2017).

La struttura, nonché l'organizzazione delle componenti portanti della cartilagine, condrociti e matrice extracellulare (ECM), varia a seconda dello strato; in particolare si nota una variazione di concentrazione delle componenti strutturali della matrice extracellulare, quali collagene e proteoglicani (Camila B. Carballo, 2017). Il

contenuto in collagene è superiore negli strati più superficiali, mentre si riduce del 20% nello strato intermedio e profondo (Borghetti Paolo, 2002).

Proprio in base alla disposizione e alla forma dei condrociti, nonché alla quantità e al tipo di organizzazione del collagene e proteoglicani, Gardner e colleghi distinguono quattro diverse zone nella cartilagine articolare (Borghetti Paolo, 2002) (*Figura 2*):

1. Strato superficiale, tangenziale o *lamina obscurans*: è bagnato dal liquido sinoviale e si compone di un sottile strato di fibrille collagene che si dispongono tangenzialmente per opporsi alle forze tangenziali che si creano per lo scorrimento articolare. E' questa la regione maggiormente esposta alle forze di attrito e compressione. Alle fibre collagene sono associati piccoli condrociti sparsi, più o meno appiattiti o ellissoidali, che alloggiato in lacune vicine tra di loro a causa della scarsa quantità di sostanza intercellulare. I proteoglicani sono scarsamente presenti (Adamo, 2012);
2. Strato intermedio o di transizione: i condrociti sono singoli, più ovalari e tondeggianti, ma non si presentano in gruppi. Le fibre assumono una disposizione più casuale o arcuata (Borghetti Paolo, 2002);
3. Strato profondo o radiale: i condrociti sono singoli, ovoidali o sferici, ma di dimensioni maggiori rispetto agli strati precedenti, a volte anche appiattiti. Le fibre collagene sono disposte casualmente nella zona più superficiale di questo strato, mentre in profondità assumono un andamento radiale (Borghetti Paolo, 2002). Nella parte che si avvicina maggiormente allo strato calcificato le cellule si ammassano in brevi colonne, formate da circa 2-4 cellule, dette gruppi isogeni assiali. La presenza dei gruppi isogeni assiali conferma la capacità, seppure lenta, di rigenerazione compensatoria del tessuto in caso di usura degli strati più superficiali (Barone, 2012). I proteoglicani aumentano notevolmente in questo livello, sede delle maggiori cariche pressorie. La matrice è molto abbondante (Borghetti Paolo, 2002);
4. Strato calcificato: in questo strato le fibre collagene si dispongono con andamento radiale, fino ad unirsi a livello dell'osso subcondrale. La distribuzione radiale delle fibre permette di distribuire in modo omogeneo le forze e di dissiparle verso l'osso subcondrale (Borghetti Paolo, 2002).

La linea festonata o “*tidemark*” è invece una sottile linea basofila di separazione che si evidenzia tra lo strato profondo e quello calcificato: essa rappresenta il punto di interruzione del processo di mineralizzazione che interessa la cartilagine epifisaria (strato calcificato), che risulta invece inibito a livello della cartilagine articolare (strato profondo) (Camila B. Carballo, 2017).

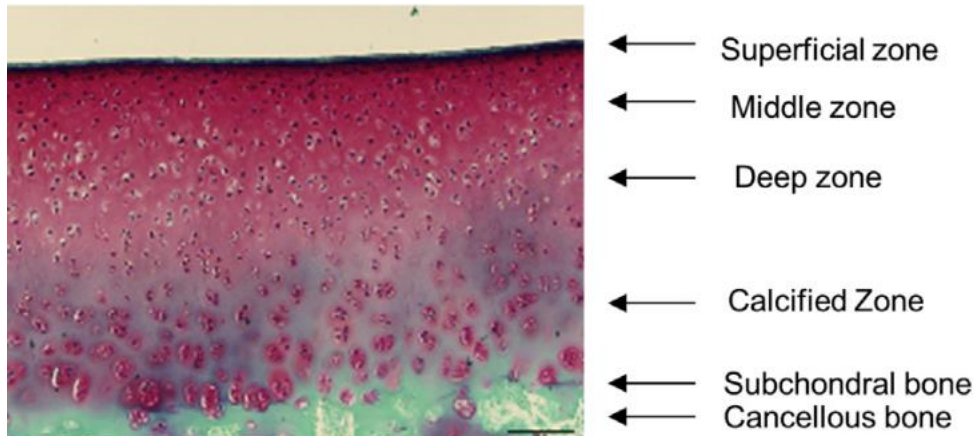


Figura 2: Preparato istologico di sezione longitudinale di superficie epifisaria di femore distale suino, colorato mediante Safranin-O, con cui si evidenziano i diversi strati del tessuto cartilagineo. (Camila B. Carballo, 2017)

Esternamente la cartilagine articolare si unisce alla sinoviale e al periostio, due strutture intimamente interconnesse: le fibre della sinoviale si addensano nel periostio, ripiegandosi per portarsi verso la superficie della cartilagine. Sul bordo del periostio si forma anche un cerchio vascolare, oltre il quale inizia la zona avascolare dello strato superficiale della cartilagine articolare (Barone, 2012).

2.2.1 Funzione della cartilagine articolare

La cartilagine articolare è un tessuto connettivo specializzato la cui funzione principale è quella di lubrificare le superfici articolari per facilitare la trasmissione dei carichi e delle forze all'osso subcondrale sottostante. Grazie alle sue caratteristiche fisiologiche la cartilagine articolare può sopportare anche elevate forze d'attrito, per poi disperdere la forza compressiva risultante all'osso subcondrale. Per mantenere moderate le forze durante l'escursione articolare si attivano complessi meccanismi di lubrificazione. L'interazione tra gli aggregati di proteoglicani e il liquido interstiziale

permette alla cartilagine di mantenere un'elasticità alla compressione durante la fase di repulsione delle forze. L'iniziale e rapida applicazione di forze di contatto durante il caricamento articolare provoca un aumento immediato della pressione del liquido interstiziale. L'aumento locale di pressione permette al liquido interstiziale di fuoriuscire dalla matrice extracellulare, generando così una forte resistenza all'attrito nella matrice. Quando il carico pressorio viene rimosso, il liquido interstiziale ritorna all'interno della matrice. La ridotta permeabilità della cartilagine articolare impedisce ai fluidi di essere rapidamente persi fuori dalla matrice (Camila B. Carballo, 2017).

3 Composizione della cartilagine articolare

La cartilagine articolare è composta da due fasi: una fase fluida, la cui principale componente è data dall'acqua (80% del peso fresco), nella quale si ritrovano anche ioni inorganici, come Sodio, Calcio, Cloro e Potassio, e una fase solida, caratterizzata dalla matrice extracellulare, porosa e permeabile (Camila B. Carballo, 2017) e da una scarsa componente cellulare (2-5%), rappresentata dai condrociti (Adamo, 2012).

3.1 La Matrice Extracellulare (ECM)

La matrice extracellulare (ECM) è formata da: fibre collagene (15%) immerse in una superficie amorfa, che vanno a costituire un gel acquoso; proteoglicani (10-15%); acido ialuronico (0,2-0,5%); proteine non collagene (0.2-0.6%). Le sue componenti principali sono quindi: componente fibrillare, in cui si ritrovano le fibre collagene e l'elastina e la sostanza fondamentale, ricca di proteoglicani, glicosamminoglicani e glicoproteine (Camila B. Carballo, 2017). Le fibre collagene e i proteoglicani rappresentano circa il 50% e il 30-40% del peso secco della cartilagine (Adamo, 2012).

La matrice extracellulare circonda e sostiene le cellule all'interno dei tessuti. La sua struttura determina le caratteristiche fisiche e molte delle proprietà biologiche dei tessuti. Alla cartilagine articolare essa conferisce sia la capacità di resistere alle forze di trazione e di rottura, grazie alla disposizione delle fibre collagene, sia l'elasticità e la resistenza alla compressione, grazie alla presenza degli aggregati di proteoglicani e acido ialuronico immersi nella rete di collagene. La matrice, grazie alle sue proprietà chimico-fisiche, regola anche il trofismo e l'omeostasi cellulare, assicurando il normale metabolismo e le attività di sintesi (Borghetti Paolo, 2002). Inoltre, funge da serbatoio per fattori di crescita, enzimi, citochine ed ormoni. La matrice extracellulare e le sue componenti vengono sintetizzate e mantenute dai condrociti (Camila B. Carballo, 2017).

La sostanza fondamentale della cartilagine si compone per circa il 70-80% di acqua. È altamente basofila. La basofilia non è attribuibile direttamente alla presenza dei

proteoglicani, ma soprattutto alle glicoproteine ad essi associate. La basofilia nel soggetto adulto, però, non è omogeneamente intensa in tutto il tessuto, come invece accade nel feto, questo perché vi sono delle differenze nella distribuzione delle componenti. Ad esempio, la regione intorno ai gruppi isogeni ha concentrazioni più elevate di proteoglicani e minori di fibre collagene, e quindi presenta un aspetto intensamente basofilo (matrice territoriale). Nella matrice territoriale vi è una regione adiacente ad ogni lacuna che è ancora più ricca in proteoglicani e quindi più basofila. Essa forma un anello intorno alle lacune, definito capsula. Le regioni tra i gruppi isogeni hanno concentrazioni minori di condroitin-solfato, mentre possiedono più fibre collagene e perciò appaiono meno basofile (matrice interterritoriale o interstiziale) (Adamo, 2012).

3.1.1 Le fibre collagene

Le fibre collagene, oltre ad avere un ruolo fondamentale nella gestione e nel dissipamento delle forze pressorie che si formano a livello articolare, garantiscono un compartimento meccanicamente isolato dove possono alloggiare le poche cellule presenti nel tessuto cartilagineo, i condrociti. Le fibre collagene della cartilagine ialina non si dispongono a formare dei fasci, come accade invece nel tessuto connettivo lasso e compatto. Le fibrille più piccole, di diametro di 10-30 nm, si riscontrano soprattutto nello strato superficiale, mentre aumentano di diametro negli strati più profondi, arrivando fino a 75 nm. (Adamo, 2012).

Le fibre collagene espresse nella matrice extracellulare sono di diverse forme e vengono sintetizzate dai condrociti. Il collagene di tipo II (CII), omotrimerico, è la forma predominante nella cartilagine articolare matura (95%). La molecola di collagene è costituita di tre catene polipeptidiche identiche, chiamate catene α_1 [$\alpha_1(\text{II})_3$] (Gabriele Bertoni, 2011). È un collagene di tipo fibrillare, costituito da fibre sottili e da un alto contenuto di idrossilisina, e rappresenta la rete fondamentale della matrice extracellulare. Interagisce con altre forme di collagene meno rappresentate, come il collagene di tipo IX, X e XI, che hanno funzioni regolatrici. Forma lo scheletro strutturale che consente al tessuto di mantenere forma e volume, dona resistenza alle forze meccaniche, alla pressione di rigonfiamento e alla tensione interna ed esterna (Borghetti Paolo, 2002). Il telopeptide C-terminale del

collagene tipo II rimane all'interno della matrice extracellulare una volta avvenuto il distacco dal procollagene. Essendo capace di legare Calcio e idrossiapatite esso è molto abbondante soprattutto nelle regioni di mineralizzazione della cartilagine. Alterazioni di questa forma di collagene portano all'evoluzione di condrodisplasie (Adamo, 2012).

Il collagene di tipo VI (<1%) è un collagene laminare o reticolare presente soprattutto nella matrice pericellulare, che riveste i condrociti. Si ritiene abbia funzioni di mediazione delle interazioni funzionali tra il condrocita e il microambiente circostante (Borghetti Paolo, 2002).

Il collagene di tipo IX (5-20%) è un collagene associato a fibrille, legato covalentemente alle molecole di collagene tipo II. Si tratta di molecole corte (200 nm), che mantengono i telopeptidi (Adamo, 2012). Potrebbe avere un ruolo nell'interazione di macromolecole con la rete di fibre collagene tipo II e nel regolarne i diametri (Borghetti Paolo, 2002). Nonostante la sua funzione non sia del tutto nota, risulta di fondamentale importanza in relazione alle patologie che derivano da difetti nei suoi geni (condrodisplasia, osteoartriti congenite) (Adamo, 2012).

Il collagene di tipo X è un collagene laminare o reticolare presente solo nella cartilagine ipertrofica in accrescimento (Borghetti Paolo, 2002).

Il collagene di tipo XI (3%), fibrillare, è presente soprattutto nella matrice pericellulare, che riveste i condrociti. Interagisce con il collagene tipo II nella formazione delle fibrille (Borghetti Paolo, 2002). Come per il collagene tipo IX, un difetto nei suoi geni provoca condrodisplasia.

I diversi tipi di collagene giocano un ruolo importante nella regolazione dei condrociti.

3.1.2 I Proteoglicani

Gli elementi di origine non collagene della matrice extracellulare includono proteoglicani (PGs), glicosamminoglicani (GAGs) e glicoproteine.

I proteoglicani sono macromolecole proteiche e idrofiliche, sintetizzate all'interno dei condrociti e secrete mediante esocitosi. Sono imbrigliati saldamente all'interno della rete del collagene nella matrice extracellulare e, insieme a quest'ultimo, sono di fondamentale importanza per il mantenimento della corretta funzione meccanica della cartilagine articolare (Borghetti Paolo, 2002).

I proteoglicani sono costituiti da una proteina interna o *protein core* a cui si legano covalentemente una o più catene di Glicosamminoglicani mediante una regione di collegamento (*Figura 3*).

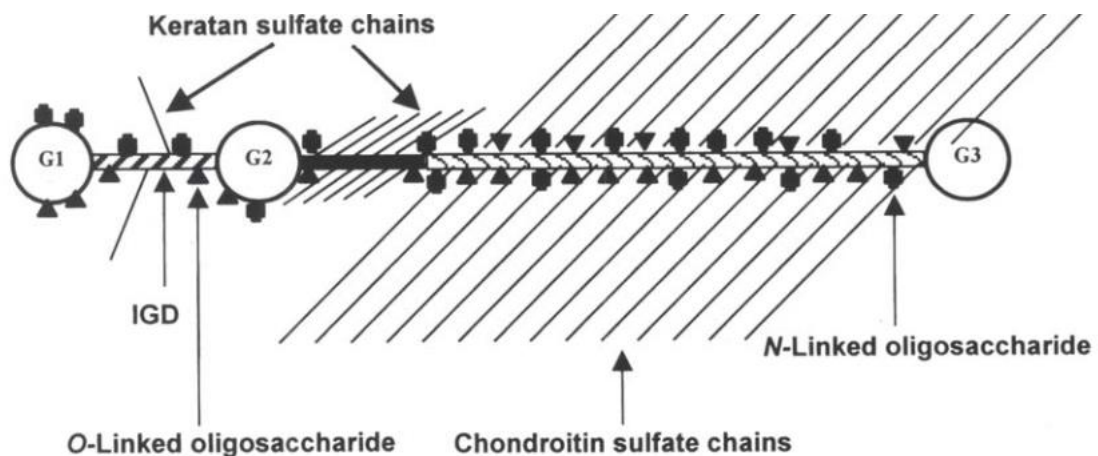


Figura 3: Modello di struttura del proteoglicano aggregato (Chris Kiani, 2002)

Grazie alle cariche anioniche, date dalla presenza del cheratan-solfato e del condroitin-solfato che portano gruppi SO_4^{3-} , essi attraggono nubi di cationi osmoticamente attivi, come Na^+ ; e conseguentemente vengono trattenuti dipoli di molecole di acqua. Questo processo è la chiave del regolamento degli scambi e dei movimenti dei fluidi, nonché di metaboliti o molecole regolatrici dell'omeostasi del tessuto. Si forma così una pressione di rigonfiamento (*swelling pressure*) all'interno della matrice che si oppone alle forze pressorie e che permette al tessuto cartilagineo di resistere alla deformazione quando si applica una forza di compressione (Borghetti Paolo, 2002). L'elevata concentrazione di proteoglicani e il loro grado di solfatazione sono i principali determinanti dell'alto grado di idratazione, fino all'80%, della matrice extracellulare (Adamo, 2012).

Nella famiglia dei proteoglicani l'Aggrecano è il più grande, nonché il più rappresentato (90%) nella matrice extracellulare della cartilagine ialina. Si tratta di una macromolecola ad alto peso molecolare ($1-4 \times 10^6$ Da), formata da un asse proteico (*protein core*), costituito da circa 3.000 aminoacidi, a cui si legano covalentemente in punti diversi oltre 100 catene di glicosamminoglicani solforati: condroitin-4-solfato (C-4-S), circa il 40%; condroitin-6-solfato (C-6-S), circa il 50%; cheratansolfato (KS), il 7-10%, nonché piccole catene N- e O-oligosaccaridiche. I glicosamminoglicani solforati si legano all'asse proteico grazie alle catene laterali presenti su quest'ultimo, che però non sono distribuite uniformemente. La massa di aggrecano risulta essere di circa 2 milioni di Dalton (Adamo, 2012). I singoli monomeri di aggrecano si legano successivamente all'acido ialuronico o ialuronato (*Hyaluronan*), grazie a un segmento di attacco situato all'estremità della molecola, per formare grandi complessi multimolecolari. Il legame tra l'aggrecano e l'acido ialuronico viene stabilizzato da una proteina di legame (*link protein*) (Borghetti Paolo, 2002). I grandi aggregati di proteoglicani monomeri (LAPLs) sono formati da un asse di acido ialuronico a cui si legano circa 100 molecole di aggrecano. L'aggrecano si concentra molto, insieme al telopeptide-C del collagene di tipo II e all'Annessina V, una proteina canale per il calcio, nelle vescicole della matrice o globuli calcificanti, che rappresentano i siti iniziali di calcificazione della matrice durante il processo di ossificazione (Adamo, 2012). L'aggrecano fa infatti parte di una famiglia di proteoglicani in grado di legare l'acido ialuronico e definita collettivamente come *hyalectans* (Gabriele Bertoni, 2011). I proteoglicani, però, possono legarsi anche ad altre molecole, tra cui il tropocollagene e la fibronectina, formando reti tridimensionali.

Altri proteoglicani monomeri non aggregati e piccoli proteoglicani presenti in concentrazioni inferiori sono:

- Versicano, un voluminoso proteoglicano capace di legarsi all'acido ialuronico;
- Biglicano, un proteoglicano più piccolo capace di legarsi al collagene;

- Decorina, prevale negli strati più superficiali. È capace di legarsi al collagene (Adamo, 2012) e contiene catene di dermatan-solfato. Insieme al biglicano fa parte della famiglia delle SLRPs (Gabriele Bertoni, 2011);
- Fibromodulina, e Lumicano;
- Perlecano: proteoglicano pericellulare;
- Lubricina (PRG-4), presente soprattutto nello strato superficiale della cartilagine articolare (Camila B. Carballo, 2017);
- Sindecano: proteoglicano con funzioni correlate alla condrogenesi (Borghetti Paolo, 2002).

La distribuzione dei proteoglicani non è uniforme all'interno della matrice, ma risulta massima negli strati più profondi (Adamo, 2012).

3.1.3 I Glicosamminoglicani (GAGs)

I glicosamminoglicani sono lunghi polisaccaridi lineari presenti nella matrice costituiti dal concatenamento, mediante legame O-glicosidico, di unità disaccaridiche ripetute contenenti gruppi solfati (Adamo, 2012). Si legano covalentemente alle proteine, formando i proteoglicani.

I glicosamminoglicani vengono così classificati:

- Condroitin-solfato IV e VI: sono costituiti da catene brevi legate in punti diversi a un'unica catena polipeptidica per formare proteoglicani di grandi dimensioni (Adamo, 2012);
- Cheratan-solfato II: si ritrova assieme al Condroitin-solfato nei proteoglicani;
- Dermatan-solfato;
- Eparan-solfato: sottoforma di proteoglicano è un componente ubiquitario della superficie cellulare, in cui si ritrova come sindecano, glicano e biglicano (Adamo, 2012);

- **Acido ialuronico:** è un grande polisaccaride, il più semplice di tutti i glicosamminoglicani, non contiene zuccheri solforati e tutte le sue unità disaccaridiche sono identiche (Gabriele Bertoni, 2011). È abbondante nel liquido sinoviale, in quanto per la sua viscosità e per la sua resistenza alla compressione rappresenta un ottimo lubrificante. Forma un gel acquoso che rende la matrice elastica alla compressione. Svolge quindi un ruolo fondamentale nel controllo della diffusione di sostanze nutritive, ormoni e anticorpi e nel prevenire la diffusione di agenti tossici e di batteri, in quanto variazioni delle sue proprietà portano a variazioni della diffusione stessa di tali sostanze (Adamo, 2012).

I glicosamminoglicani sono molecole grandi e hanno carica negativa per l'alto contenuto di gruppi anionici (radicali carbossilici, esteri solforici, amidi solforici), si respingono reciprocamente, mentre attraggono ioni con cariche positive, come ioni Calcio e Sodio, e molte molecole di acqua. Queste caratteristiche conferiscono le cariche anioniche alla molecola proteoglicanica e rendono gelatinosa e viscosa la sostanza fondamentale. La loro funzione principale è quella di assorbire l'acqua e mantenere l'idratazione e le proprietà meccaniche della matrice extracellulare (Camila B. Carballo, 2017).

3.1.4 Le Glicoproteine

Le glicoproteine sono delle componenti importanti della sostanza fondamentale, anche se presenti in quantità inferiori rispetto ai glicosamminoglicani. Costituiscono un gruppo molto vasto di molecole, che si distinguono dai proteoglicani per il basso contenuto in esammine e per la prevalenza della parte proteica rispetto a quella glucidica. Sono formate da brevi catene di oligosaccaridi legate con legame O-glicosidico ad un'unica catena polipeptidica o con legame N-glicosidico all'asparagina. Sono responsabili della reazione PAS della matrice extracellulare (Adamo, 2012). Le proteine non collagene vengono divise in due sottogruppi secondo la loro funzione nella matrice: proteine strutturali e proteine regolatrici.

Le glicoproteine strutturali includono:

- Glicoproteine fibrose: l'Elastina determina l'elasticità e la resistenza alle trazioni;
- Glicoproteine adesive, tra cui la Fibronectina, un dimero che controlla la deposizione e l'orientamento del collagene e favorisce il congiungimento dei fibroblasti e delle integrine con la matrice e la Vitronectina, che interagisce con l'elastina, i GAGs e il collagene, modulando l'angiogenesi e la degradazione della matrice extracellulare stessa. (Università del Salento).

Le proteine non strutturali includono:

- Trombospondine, tra cui trombospondina-1, trombospondina-3 e trombospondina-5: rappresentano una famiglia di grandi proteine multifunzionali, alcune delle quali inibiscono anche l'angiogenesi (Camila B. Carballo, 2017);
- Glicoproteina 39/YKL-40: si ritiene che possa indurre eventi proliferativi nei condrociti, nonché aumentare la sintesi di glicosamminoglicani (Frédéric De Ceuninck, 2001);
- Proteine matricellulari: proteine di secrezione che hanno ruolo di adattatori molecolari, interagiscono con le proteine strutturali della matrice extracellulare, con recettori cellulari, con fattori di crescita, citochine e proteasi. Esse includono: Matrilina-1 e Matrilina-3, espresse per la maggior parte nella cartilagine. Esse partecipano alla formazione delle componenti fibrillari e filamentose della matrice extracellulare e modulano l'interazione collagene-proteoglicani. La Tenascina-C fa parte della famiglia delle tenascine, grandi proteine multimeriche presenti nelle nicchie di cellule neuronali staminali, coinvolte nella morfogenesi, nella modulazione dell'adesione e nella migrazione cellulare durante l'embriogenesi, inoltre promuove l'angiogenesi. La Fibrillina forma microfibrille mediante legami covalenti tra le catene laterali di Glu e Lys (transglutaminasi), in parte viene incorporata nelle fibre elastiche. Infine, le Fibuline legano le fibre elastiche e la fibrillina (Università del Salento);

- Condromodulina-I: si tratta di una proteina espressa nelle zone avascolarizzate della cartilagine in accrescimento, ma assente nello strato calcificato. Inibisce l'angiogenesi, favorendo invece la crescita dei condrociti e del tessuto cartilagineo a discapito della neoformazione ossea nelle primissime fasi di ossificazione endondrale (Yuki Hikari, 1999);
- Condromodulina-II: anch'essa è una proteina di derivazione cartilaginea che stimola la crescita dei condrociti, ma non inibisce la vascolarizzazione. Stimola anche il differenziamento degli osteoclasti (Suzuki, 1996);
- Acido retinoico: forma attiva della vitamina A. E' implicato nel controllo del differenziamento e dello sviluppo cellulare;
- Condroadherina o condronectina: media le interazioni tra i condrociti e le fibre collagene di tipo II e i proteoglicani (Adamo, 2012);
- Fattori di crescita, come il TGF- β (*Transforming Growth Factor β*). Il TGF- β gioca un ruolo fondamentale sia nello sviluppo embrionale della cartilagine sia nel mantenimento dell'omeostasi della cartilagine articolare matura, in quanto è un regolatore tanto del tessuto cartilagineo quanto del tessuto osseo (Camila B. Carballo, 2017);
- Ancorina CII: proteina con proprietà regolatrici nelle interazioni cellulari e tra le cellule e la matrice (Borghetti Paolo, 2002).

3.2 I Condrociti

I condrociti sono cellule di origine mesenchimale molto specializzate, che occupano solo il 2% del volume totale della cartilagine articolare (Camila B. Carballo, 2017). Alloggiano in cavità all'interno della matrice extracellulare, definite lacune. Nelle fasi di più intensa proliferazione le lacune possono anche accogliere più condrociti a formare i cosiddetti gruppi isogeni. I condrociti possiedono sistemi enzimatici responsabili della produzione di tutte le macromolecole che costituiscono la struttura della matrice cartilaginea, come tropocollagene, proteine associate alle fibrille, proteoglicani, acido ialuronico, fibronectina e altre glicoproteine (Adamo, 2012).

Inoltre sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi, della sintesi di enzimi, fattori di crescita e mediatori infiammatori e anche della degradazione delle componenti della matrice stessa mediante l'attivazione delle proteasi. La matrice, infatti, viene continuamente degradata e rimpiazzata, con un ricambio più rapido per quanto riguarda i proteoglicani (giorni o settimane), e uno molto più lento per quanto riguarda il collagene. Questo processo, in condizioni fisiologiche, è necessario per il corretto rimodellamento del tessuto cartilagineo (Camila B. Carballo, 2017). Tra le proteasi coinvolte nel processo degradativo della matrice si evidenziano le metalloproteasi della matrice (MMPs), tra cui quelle maggiormente conosciute sono le stromalisine (MMP-3 e MMP-10), la collagenasi 1, 2 e 3 (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), le gelatinasi A e B (MMP-2 e MMP-9), nonché le metalloproteasi legate alla membrana (MT-MMPs). MMP-1, MMP-8, MMP-13, le gelatinasi e la MT1-MMP attaccano e degradano i frammenti del collagene tipo II. Le collagenasi si occupano di spaccare la tripla elica del collagene tipo I, tipo II e tipo III. MMP-3, MMP-8 e la MT1-MMP frammentano i proteoglicani, anche se il principale attacco enzimatico all'aggrecano è operato dalle ADAMTs (*Disintegrin-Metalloproteinase with thrombospondin motifs*) e altri enzimi come le aggrecanasi (Borghetti Paolo, 2002). Da recenti studi si evidenzia come gli enzimi ADAMTS abbiano diversi ruoli tanto nella morfogenesi tissutale quanto in processi patofisiologici infiammatori di rimodellamento (Richard Kelwick, 2015). Inoltre, i condrociti regolano la sintesi e la degradazione della matrice anche mediante meccanismi derivanti dalle interazioni del condrocita stesso, mediante le integrine, con componenti della ECM, quali fibre collagene, proteoglicani e proteine non collagene (Borghetti Paolo, 2002).

Segnali citochinici, fattori di crescita, tra cui il TGF- β , fattori di crescita insulino-simili-1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), inibitori delle proteasi tissutali, quali interleuchina-1 e interleuchina-6 (IL-1 e IL-6), fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMPs) e fattori di trascrizione regolano la funzionalità dei condrociti stessi e l'omeostasi del tessuto, assicurandone il mantenimento fisiologico e la funzionalità. In particolare, le TIMPs, prodotte dai condrociti, sono le più importanti molecole coinvolte nella regolazione della produzione delle MMPs. IL-1, IL-6 e TNF- α svolgono ruoli antianabolici e catabolici, mentre TGF- β e IGF-1 e -2 hanno un ruolo importante in senso anabolico e antidegradativo nel metabolismo della matrice (Borghetti Paolo, 2002). L'equilibrio che esiste tra i

processi di sintesi e quelli degradativi permette di mantenere il corretto *turn-over* tissutale e la sua corretta funzionalità. Da ciò ne deriva che una lesione o un processo degenerativo che alteri l'equilibrio omeostatico può comportare l'arresto della maturazione dei condrociti e una loro attivazione aberrante con espressione di citochine proinfiammatorie e cataboliti (Camila B. Carballo, 2017).

È importante evidenziare che anche fisiologicamente, con l'invecchiamento della cartilagine, si riduce il numero di condrociti e la loro capacità proliferativa in risposta ai diversi fattori di crescita e così l'equilibrio metabolico si sposta naturalmente verso la degradazione della matrice (Borghetti Paolo, 2002).

4 Condrogenesi

Per condrogenesi si intende il processo che porta alla formazione di tessuto cartilagineo che precede l'ossificazione (ossificazione endocondrale) durante lo sviluppo scheletrico. Nell'embrione la condrogenesi ha inizio con il reclutamento e la migrazione di cellule mesenchimali, le quali si aggregano per formare il primo abbozzo cartilagineo, per poi essere sottoposte a un processo di differenziamento che le porta a diventare prima condroblasti e infine a maturare in condrociti, cellule specializzate (*Figura 4*). Nella vita post-natale, una banda di cartilagine permane a livello delle ossa lunghe e permette la crescita longitudinale delle ossa. A questo livello le cellule ripercorrono gli stessi stadi del processo di condrogenesi sopra elencati (Nigel Mabvuure, 2012).

Il processo di condrogenesi può essere schematicamente sintetizzato come l'evoluzione di tre tessuti fondamentali: tessuto mesenchimale, tessuto di condensazione e infine cartilagine. I tre tessuti possiedono caratteristiche specifiche e possono essere differenziati mediante la valutazione della morfologia e della densità cellulare e le caratteristiche chimiche del tessuto stesso. Il mesenchima presenta una morfologia cellulare ed extracellulare uniforme. Nel tessuto di condensazione si denota un aumento della densità cellulare e un cambiamento nella matrice extracellulare che lo distingue dal precedente. Per ottenere tale aumento di densità è necessario che venga rimossa una parte di matrice extracellulare e che vengano secrete nuove componenti. Infine, nel tessuto cartilagineo le cellule vengono sottoposte a una completa rielaborazione tramite la regolazione genica. Le cellule diventano più rotondeggianti (Donald A. Fowler, 2020).

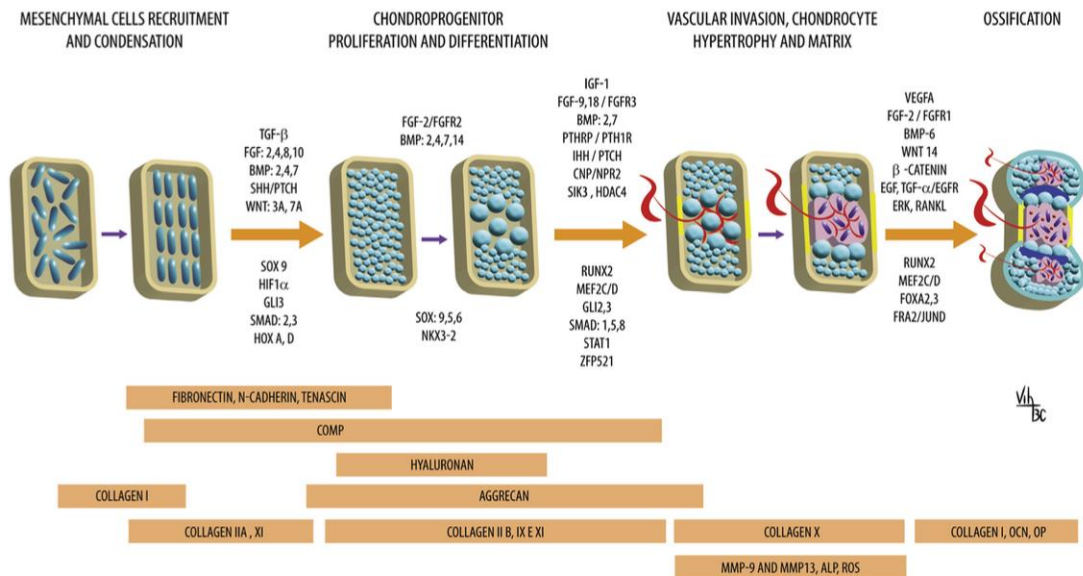


Figura 4: Schema dei diversi stadi della condrogenesi, con relativi fattori di regolazione e prodotti sintetizzati in ciascuna fase (Camila B. Carballo, 2017).

4.1 Condensazione delle cellule mesenchimali

La prima fase del processo condrogenetico, la condensazione, coinvolge le cellule precondrogeniche, e fa riferimento sia all'aggregazione delle cellule mesenchimali staminali sia al prodotto di tale aggregazione. Le cellule mesenchimali derivano da tre siti: cresta neurale, sclerotomo e somatopleura. Le cellule mesenchimali vanno incontro a cambiamenti in risposta a segnali di differenziamento che le portano a dividersi in due linee diverse, quella condrogenica e quella miogenica, da cui nascono il tessuto cartilagineo al centro e quello muscolare perifericamente (Mary B. Goldring, 2006).

Si formano densi aggregati di cellule mesenchimali che assumono aspetti più rotondeggianti, in quanto ritirano i loro prolungamenti e riducono la quantità di citoplasma. Questi aggregati si definiscono centri di condricificazione o blastema protocondrale ed è al loro centro che ha inizio il processo di differenziamento delle cellule progenitrici. Questo è il primo stadio della condrogenesi, in cui vengono definite forma, dimensione e posizione delle cellule, inoltre vengono espressi geni

cartilagine-specifici; possono essere anche già riscontrabili i primi proteoglicani. Il processo di condensazione può essere suddiviso in diverse fasi: il reclutamento delle cellule mesenchimali, la loro proliferazione e la condensazione finale. Precedentemente alla loro aggregazione, le cellule mesenchimali producono una matrice extracellulare ricca in acido ialuronico e collagene tipo I che riduce le interazioni tra le cellule. Dopo l'inizio della condensazione si ha un aumento dell'attività delle ialuronidasi, che riducono la presenza di acido ialuronico nella ECM, dato che quest'ultimo favorirebbe il movimento delle cellule impedendone l'adesione. (Nigel Mabvuure, 2012).

Un'altra caratteristica peculiare che presentano le cellule mesenchimali durante questa fase è la capacità di legare la *lectin Peanut agglutinin* (PNA). Dopo il differenziamento in condrociti, queste cellule non sono più in grado di legare la PNA. PNA è quindi un possibile *marker* funzionale per le cellule condroprogenitrici (Tuan, 2004).

I segnali che permettono il reclutamento delle cellule mesenchimali e che danno inizio alla condensazione sono principalmente segnali di interazione tra le cellule mesenchimali e quelle epiteliali che le circondano. Tali segnali favoriscono l'adesione, il contatto cellula-cellula, nonché la formazione di *gap junctions* e cambiamenti nell'architettura del citoscheletro. Sono due le molecole di adesione maggiormente implicate durante questo processo: in primo luogo le molecole di adesione cellulare neurale (N-CAM), che hanno un ruolo centrale, infatti, un'alterazione a carico delle N-CAM va ad alterare anche la condensazione, portando a una diminuzione della condrogenesi. In particolare, N-CAM1 è una proteina transmembrana che media l'adesione cellulare e le interazioni tra la matrice e i domini extracellulari di fibronectina, una componente della matrice extracellulare, che aumenta durante la condensazione, mentre diminuisce con la citodifferenziazione. Mediante studi di laboratorio eseguiti da Tuan e collaboratori nel 2004 si è evidenziato come l'acido ribonucleico messaggero (mRNA) della fibronectina sia sottoposto a uno *splicing* alternativo durante la condrogenesi per ottenere un'isoforma che contenga l'esone EEIII, presente solo nella fase di condensazione. La funzione di questa isoforma sembrerebbe essere correlata alla regolazione delle N-CAM (Nigel Mabvuure, 2012).

La seconda molecola di adesione che viene espressa durante la condensazione è la N-caderina. N-CAM e N-caderina non vengono espresse dal tessuto cartilagineo differenziato e si ritrovano solo a livello di pericondrio. Anche le interazioni che avvengono tra le cellule mesenchimali e la matrice extracellulare sono importanti: viene prodotta una matrice ricca in condroitin-4-solfato, tenascina, sindecano e versicano. La tenascina promuove la differenziazione in condrociti, contrastando gli effetti della fibronectina, mentre il sindecano attua una *down regulation* delle N-CAM. Sono stati identificati anche vari fattori di crescita essenziali in questa fase. Il *tumor growth factor beta* (TGF- β), il primo segnale che viene espresso in questa fase, stimola l'espressione delle N-CAM, fibronectina, tenascina, trombospondina e *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), le quali interagiscono con le molecole di adesione cellulare e attivano segnali intracellulari coinvolti nell'adesione, permettendo così la transizione da cellule condroprogenitrici a condrociti. Il *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) è massivamente espresso durante questa fase e regola le N-CAM e la loro funzione. Le *bone morphogenic proteins* (BMPs) regolano i geni Homeobox (Hoxa-2, Hoxd-11, Pax-2), una famiglia di fattori di trascrizione che sono i principali regolatori delle primissime fasi di sviluppo. In particolare, BMP-2 attiva p38 (*mitogen-activated protein kinase* o MAPK), che è responsabile della procondrogenesi, inoltre aumenta anche i livelli della proteina Sox-9, essenziale per tutti gli stadi della condrogenesi. Le BMPs sono anche coinvolte nel passaggio da condensazione a differenziamento in quanto regolano i fattori di trascrizione Msx-1 e Msx-2, che fanno parte della famiglia dei geni homeobox con azione soppressiva (Nigel Mabvuure, 2012).

Molti *markers* sono presenti durante la condensazione, ma solo pochi vengono mantenuti fino allo stadio finale dai condrociti. Tre geni coinvolti nel segnalamento cellulare sono espressi sia durante la fase di condensazione sia durante il differenziamento: *nogging*, un inibitore dei segnali espressi dalle BMPs; BMPR1B, il recettore per le BMPs e VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) (Donald A. Fowler, 2020).

Durante questa fase è necessario che si modifichi anche la composizione della matrice extracellulare. Si evidenziano cinque indicatori più comuni presenti nella matrice extracellulare del tessuto condensato rispetto a quella delle cellule

mesenchimali: Cd44, una molecola di proteoglicano condroitin-solfato, versicano, sindecano 3, Ext 1 ed Ext 2, proteine responsabili della creazione dell'eparan-solfato (Donald A. Fowler, 2020).

Nelle regioni in cui si formeranno le articolazioni le cellule condroprogenitrici condensate non si differenziano in condrociti, ma si raggruppano strettamente e vanno incontro ad apoptosi. In questo modo si delinea il piano cartilagineo. Un fallimento di questo processo esita in malformazioni del piano cartilagineo come sindattilia o polidattilia (Tuan, 2004).

4.2 Differenziamento in condrociti e proliferazione

La fase successiva, quella di differenziazione, si caratterizza per l'aumento dell'espressione dei geni per il collagene tipo II, tipo IX, tipo XI e per l'aggrecano. Anche il fattore di trascrizione Sox-9 è necessario per l'espressione del gene del collagene tipo II e altre proteine cartilagine-specifiche della matrice. Le cellule assumono una morfologia arrotondata e quelle che si trovano al centro dei centri di condificazione disattivano l'espressione dei *markers* per la condensazione e proliferano prima di diventare ipertrofiche e di terminare il differenziamento. Lo stesso processo avviene nella cartilagine di accrescimento. Nelle metafisi delle ossa lunghe, i condroblasti, piccole cellule che derivano dalla prima differenziazione e che possiedono la capacità di proliferare rapidamente e produrre nuovo tessuto, si appiattiscono e si riarrangiano in colonne longitudinali e parallele sotto l'influenza dei fattori di trascrizione Runx-2, Runx-3, Sox-5 e Sox-6 (Nigel Mabvuure, 2012).

A livello citologico questa fase si può evidenziare mediante la scomparsa dei prolungamenti cellulari, l'aumento della basofilia citoplasmatica per l'accumulo di ribosomi, lo sviluppo del reticolo endoplasmatico granulare e dell'apparato del Golgi. A livello molecolare i condroblasti esprimono intensamente fibronectina, laminina, i loro recettori e i fattori di trascrizione della cartilagine, quali Omeoproteina-1 e Sox-9. Inizialmente prevale la produzione di collagene tipo IIA e aggrecano e le cellule risultano strettamente vicine le une alle altre, mentre quando aumenta la matrice intercellulare esse si distanziano, restando incluse nella matrice da loro prodotta, all'interno di cavità definite lacune cartilaginee. La cellula viene definita condrocita

quando diminuisce la sua attività biosintetica. Contemporaneamente il mesenchima intorno al tessuto cartilagineo si compatta, formando un involucro connettivale, definito pericondrio, che va a separare la cartilagine dal mesenchima stesso. Il pericondrio possiede importanti proprietà condrogenetiche, infatti durante la fase di sviluppo le cellule condroprogenitrici presenti nello strato più interno del pericondrio (strato condrogenico) si differenziano in condroblasti e depositano per apposizione nuova cartilagine sulla superficie (Adamo, 2012).

Durante la condrogenesi è l'equilibrio che si instaura tra i segnali inviati dalle BMPs e quelli delle FGFs a determinare la velocità della proliferazione dei condroblasti. Nelle ossa lunghe, dopo la fase di condensazione, le BMP-2, -3, -4, -5 e -7 vengono espresse nel pericondrio e solo BMP-7 nei condrociti proliferanti; BMP-6 è stata ritrovata esclusivamente nei condrociti ipertrofici insieme a BMP-2. Si hanno invece ancora difficoltà nell'individuare *in vivo* i ligandi che attiverrebbero i recettori per le FGFs durante la condrogenesi. Da recenti studi è stato messo in evidenza però che FGF-18 e FGF-9 interagiscono con il recettore per FGF-1 nella zona ipertrofica per regolare l'invasione vascolare inducendo l'espressione di VEGF e dei suoi recettori. Il recettore FGF-R1 sembra essere coinvolto nella regolazione della sopravvivenza e forse anche nella morte cellulare. La proliferazione dei condrociti nella zona preipertrofica viene regolata mediante un *feedback* negativo gestito dai *pathway* PTHrP (proteina relazionata all'ormone paratiroideo) e *Indian Hedgehog* (Ihh) (Mary B. Goldring, 2006). Durante lo sviluppo della cartilagine una piccola quota di PTHrP si ritrova sulla superficie dei condrociti proliferanti. Questo peptide mantiene i condrociti in uno stato proliferativo e inibisce il loro differenziamento terminale durante la condrogenesi. PTHrP blocca la fase ipertrofica stimolando l'espressione del fattore di trascrizione Nkx3.2 (*NK3 homeobox 2*) e prevenendo l'espressione di Runx-2 (Magali Demoor, 2014). Recenti studi hanno indicato che Ihh induce l'espressione di PTHrP nel pericondrio e che i segnali di PTHrP stimolano la proliferazione cellulare nei condrociti periarticolari. Altri studi invece dimostrano che PTHrP agisce prevenendo un prematuro differenziamento nei condrociti ipertrofici, quindi sopprimendo una prematura espressione di Ihh. Ihh e PTHrP determinano il numero di cellule che rimangono all'interno della linea condrogenetica rispetto a quelle che seguono il processo di ossificazione endocondrale (Mary B. Goldring, 2006). L'espressione di Nkx3.2 è importante per il reclutamento delle cellule

condroprogenitrici e di conseguenza decresce durante il processo di differenziazione. Agisce come regolatore negativo della maturazione condrocitaria, in quanto sopprime l'espressione di Runx-2 (Magali Demoor, 2014).

L'accrescimento della cartilagine avviene grazie a due meccanismi. Le cellule già differenziate si dividono dando origine a una progenie che deposita nuova sostanza intercellulare (accrescimento interstiziale). Le cellule figlie, derivate dalla proliferazione di ogni cellula iniziale, formano invece un clone di cellule condroprogenitrici accostate tra di loro, definite gruppi isogeni (accrescimento per apposizione), che si differenziano alla periferia del centro di condificazione, ossia nel pericondrio, in condroblasti. I condroblasti, elaborando nuova sostanza interstiziale cartilaginea, formano così un nuovo strato (Adamo, 2012). I condrociti presenti nella cartilagine articolare, ad eccezione di quelli localizzati nella linea festonata, non vanno incontro a ipertrofia, ma in caso di osteoartrosi possono tornare allo stadio di condroblasti per poi subire i processi di ipertrofia e differenziamento terminale. I condrociti articolari esprimono i geni per aggrecano e lubrificina, che conferiscono alla superficie cartilaginea l'aspetto tipico levigato, Sox-9, Sox-5 e Sox-6, esprimono meno i geni per il collagene tipo II e inattivano l'espressione del fattore di trascrizione Runx-2, anche conosciuto come *Core binding factor*, espresso durante l'intera fase di condensazione (Nigel Mabvuure, 2012).

Nella cartilagine ialina si individua inoltre una tipologia cellulare specifica, il condroclasto, cellula multinucleata di origine monocito-macrofagica, che si localizza nella cartilagine di coniugazione, a confine tra epifisi e metafisi. La sua funzione è quella di riassorbire la cartilagine mineralizzata durante il processo di osteogenesi condrale (Adamo, 2012).

4.3 Ipertrofia e maturazione

In seguito alla differenziazione e proliferazione, alcuni condrociti iniziano il processo di ipertrofia e maturazione. A livello di cartilagine di accrescimento questi condrociti occupano una zona precisa, identificabile sia a livello istologico che molecolare. È essenziale che i condrociti siano sottoposti alla fase di ipertrofia e di

differenziamento finale prima che avvenga l'invasione vascolare e la mineralizzazione ossea durante il processo di ossificazione endocondrale. L'ipertrofia inizia dalle cellule localizzate più centralmente, nelle quali si riscontra un aumento del volume cellulare di almeno 20 volte. Ad ogni modo, la cartilagine articolare non è sottoposta al processo di ipertrofia, ma viene sottoposta a un processo di maturazione differente. Quando i condrociti raggiungono lo stadio preipertrofico avvengono modificazioni importanti sia a livello morfologico sia di espressione genica. *Ihh*, necessario per la formazione dell'osso endocondrale viene espresso nei condrociti preipertrofici alla fine della fase proliferativa. Quando entrano in fase ipertrofica vengono espressi *markers* specifici, quali collagene tipo X e fosfatasi alcalina (Mary B. Goldring, 2006). *Runx-2*, gene che esercita una regolazione positiva sull'ipertrofia dei condrociti, viene espresso nel pericondrio durante i momenti iniziali, e più tardivamente anche nei condrociti ipertrofici. La *MMP-13* è anch'essa espressa nella fase terminale dai condrociti ipertrofici e una sua carenza esita in un accumulo consistente di collagene a livello interstiziale e causa un ritardo nell'ossificazione endocondrale a livello del piatto di accrescimento che aumenta l'ampiezza della zona ipertrofica della cartilagine (Mary B. Goldring, 2006).

Sembra che anche *Sox-9* abbia un ruolo nel ritardare o sopprimere la fase di ipertrofia, in quanto inibirebbe *Runx-2* (Nigel Mabvuure, 2012). *PTHrP* è essenziale per bloccare la progressione verso l'ipertrofia e per mantenere un *pool* di condrociti immaturi nella cartilagine di accrescimento delle ossa lunghe. Il *TGF-β1* inibisce il differenziamento terminale dei condrociti aumentando l'espressione di *PTHrP*, inibendo invece quella di collagene tipo X, *VEGF* e *MMP13* (Magali Demoor, 2014).

Dopo essere andati incontro a ipertrofia, i condrociti differenziati esprimono meno i geni per il collagene tipo X, mentre aumentano l'espressione dei geni per la *MMP-13*, osteopontina e fosfatasi alcalina, che hanno un ruolo funzionale nelle interazioni tra cellule e matrice durante l'ossificazione. La matrice extracellulare viene rimodellata e questo induce delle alterazioni nell'ambiente in cui vivono i condrociti e li sottopone a stress, che eventualmente può portarli anche a indurre apoptosi. Tra le metalloproteasi coinvolte in questa fase terminale si evidenzia anche *MMP-9*, espressa dalle cellule endoteliali che migrano al centro della zona ipertrofica

durante il processo di angiogenesi. MMP-13 coopera con MMP-9 degradando la matrice non mineralizzata durante l'ossificazione primaria e secondaria. Gli eventi di rimodellamento della matrice cartilaginea e l'invasione vascolare sono prerequisiti fondamentali per la migrazione e il differenziamento di osteoclasti e osteoblasti, che rimuoveranno la matrice cartilaginea mineralizzata, rimpiazzandola con tessuto osseo (Mary B. Goldring, 2006).

Tramite alcuni fattori di trascrizione viene permessa l'uscita dal ciclo cellulare e il differenziamento finale, mediante la *downregulation* dell'espressione di ciclina D1 e ciclina A, nonché attraverso l'attivazione di Runx-2. Il fattore di trascrizione c-Maf facilita l'inizio della fase di differenziamento finale e il suo completamento. In caso di osteoartrosi, in cui la cartilagine diviene ipertrofica, il fattore di trascrizione c-Maf viene sovraespresso (Nigel Mavvure, 2012).

4.4 Regolazione della condrogenesi

La regolazione della condrogenesi è controllata da geni, segnali cellulari, interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. I mediatori coinvolti includono: fattori di trascrizione, fattori di crescita, citochine, metaboliti, ormoni e altri fattori ambientali che stimolano o inibiscono i segnali cellulari o la trascrizione di specifici geni (Tuan, 2004).

Nei vertebrati lo sviluppo della cartilagine è controllato dall'interazione di diversi *pattern*, che coinvolgono prevalentemente il *fibroblast growth factor*, *bone morphogenetic protein* e il *pathway Hedgehog*. Inoltre, sia fattori di trascrizione, quali Sox-9 e Runx-2, proteine chinasi e le loro interazioni determinano se i condrociti differenziati possano rimanere all'interno della cartilagine articolare o siano sottoposti a ipertrofia e maturazione, andando incontro poi a ossificazione. Quest'ultimo processo necessita anche della vascolarizzazione (Mary B. Goldring, 2006).

Sox-9 è il fattore di trascrizione stimolante più importante per la condrogenesi. È il primo fattore che viene espresso nelle cellule mesenchimali condroprogenitrici e viene spento solo nelle cellule ipertrofiche, suggerendo che la sua funzione persista durante tutte le fasi della condrogenesi. Sox-9 regola direttamente il gene Col2a1,

il principale *marker* per il differenziamento della cartilagine ialina, in quanto fornisce le istruzioni per la sintesi della pro- α 1(II), una delle componenti del collagene tipo II.

La regolazione dell'attività trascrizionale del gene Col2a1 avviene anche ad opera di due proteine "zinc finger" ubiquitarie, Sp1 e Sp3. La loro quantità è differente a seconda dello stato dei condrociti. È stato infatti dimostrato che il tasso di Sp1/Sp3 diminuisce durante la de-differenziazione dei condrociti e ciò si correla a una *downregulation* dell'espressione del collagene tipo II. In condrociti che stanno andando incontro a differenziamento, invece, Sp1 stimola l'espressione del gene Col2a1, mentre Sp3 lo inibisce (Magali Demoor, 2014).

La proteina "zinc finger" 219, appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione Sp1, interagisce con Sox-9 stimolandone l'attività per regolare il differenziamento condrocitario. Questo la rende un fattore essenziale di induzione della condrogenesi (Magali Demoor, 2014).

Anche i geni che esprimono varie componenti della matrice extracellulare, come quelli per l'aggricano e matrilina-1 sono espressi solo quando Sox-5, Sox-6 e Sox-9 si legano ai siti di dominio dei loro *enhancers*. Infine, anche le modificazioni post-trascrizionali, come la fosforilazione attuata dalla proteina chinasi A cAMP-dipendente (PKA), aumentano l'attività trascrizionale di Sox-9 (Nigel Mabvuure, 2012). L'espressione della proteina Sox-9 dipende dai segnali inviati dalle BMPs tramite i recettori BMP-R1A e BMP-R1B, attivi durante la condensazione dei condrociti, ma non nel pericondrio (Mary B. Goldring, 2006).

I fattori di crescita sono polipeptidi biologicamente attivi che sono prodotti dall'organismo per stimolare la differenziazione e la proliferazione cellulare. In particolare, il processo di differenziamento delle cellule condrogeniche del pericondrio in condroblasti e la loro attività biosintetica è regolata da una famiglia di fattori di crescita denominati BMPs, che sono prodotti dalle stesse cellule condroprogenitrici (Adamo, 2012). Altri fattori di crescita quali quelli della superfamiglia dei TGF, IGF e FGF sembrano avere un ruolo significativo nella condrogenesi. La superfamiglia dei TGF comprende BMPs, activina, TGF- β 1, TGF- β 2 e GDF-5 (*growth differentiation factor*). Le BMPs controllano la morfogenesi ossea mediante il controllo del differenziamento delle cellule condroprogenitrici e

regolando gli stadi finali della maturazione e differenziamento terminale dei condrociti fino al raggiungimento del loro fenotipo ipertrofico. Tra le BMPs, si prende in considerazione soprattutto BMP-2, che indirettamente favorisce la disponibilità di Sox-9 attivando p38 MAPK, uno dei *pathway* che contribuisce all'avvio della condrogenesi e responsabile della *downregulation* di Wnt-7a/ β -catenina, che a bassi livelli promuove il differenziamento delle cellule condroprogenitrici e l'ipertrofia dei condrociti (Mary B. Goldring, 2006). Anche TGF- β 1 coopera con i segnali espressi dal *pathway* della Wnt/ β -catenina per indurre la condrogenesi ed inibire il differenziamento degli osteoblasti, mediante la riduzione dell'espressione di osteocalcina, fosfatasi alcalina e Runx-2 (Magali Demoor, 2014). L'espressione di segnali Wnt, quali Wnt2a e Wnt2c, è associata all'induzione di diverse FGFs, tra cui FGF-10 e FGF-8, che hanno un'azione positiva sulla condrogenesi. BMP-2 è probabilmente anche il fattore stimolante più efficace tra quelli presenti nella superfamiglia delle TGF, in quanto possiede due effetti diretti e distinti nell'orientamento del *lineage* delle cellule staminali: sembra regolarne il differenziamento ed inoltre sembra avere la capacità di indurre sia la condrogenesi che l'osteogenesi (Magali Demoor, 2014). Anche BMP-4 ha un ruolo essenziale, in quanto aumenta l'espressione dei *markers* condrogenetici (Nigel Mabvuure, 2012). Da studi *in vitro* e *in vivo* è emerso che i segnali delle BMPs sono necessari sia per la formazione degli aggregati precartilaginei sia per il differenziamento dei precursori in condrociti (Mary B. Goldring, 2006).

Le proteine *Hedgehog* (*Sonic Hedgehog* e *Indian Hedgehog*) vengono espresse grazie ai fattori di trascrizione codificati dai geni *homeobox*. La via di segnalazione di *hedgehog* è fondamentale nella regolazione dell'organogenesi nei vertebrati e in particolar modo nel differenziamento degli arti (Mary B. Goldring, 2006).

Tra le GDFs, solo GDF-5 sembrava avere un ruolo essenziale nella condrogenesi. GDF-5 dovrebbe agire durante la fase di condensazione aumentando l'adesione e durante la fase di differenziazione aumentando la proliferazione dei condrociti; inoltre aumenterebbe anche i livelli di Sox-9. Da recenti studi sembra che anche GDF-8 (miostatina) abbia un ruolo nella riduzione della sintesi del collagene tipo II (Nigel Mabvuure, 2012).

La Somatomedina C o *insulin-like growth factor* (IGF-1) è il principale fattore di crescita anabolico della cartilagine articolare. Uno dei meccanismi d'azione dell'IGF-1 comprende l'attivazione di fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e protein-chinasi B (Akt o PKB). Si è visto che IGF-1 e TGF- β agiscono in combinazione per regolare la proliferazione e il differenziamento delle cellule mesenchimali del periostio durante la condrogenesi (Nigel Mabvuure, 2012).

Anche la Triiodotironina (T3), ormone sintetizzato dalla tiroide, agisce a livello cartilagineo grazie alla deiodinasi. Essa inibisce la proliferazione dei condrociti, stimola la sintesi del collagene tipo X e aumenta l'attività della fosfatasi alcalina. T3 regola la proliferazione condrocitaria, l'organizzazione dei condrociti proliferanti e il differenziamento terminale dei condrociti ipertrofici (Magali Demoor, 2014)

Nella famiglia degli FGFs, quelle in relazione con la condrogenesi sono FGF-2 e FGF-18. Questi fattori di crescita sembrano essere coinvolti in tutti gli stadi della condrogenesi, infatti una mutazione a carico dei loro recettori porta a condrodisplasia. FGF-2 protegge la cartilagine da danni e lesioni, in parte perché riduce gli effetti dell'aggrecanasi, un enzima che distrugge l'aggrecano, e in parte perché protegge dall'osteoartrosi. FGF-18 viene espresso nel pericondrio e nelle regioni di accrescimento delle ossa lunghe, dove regola la proliferazione, il differenziamento e la produzione della matrice. Tramite studi *in vivo* si è evidenziato che FGF-18 agisce già nelle prime fasi della condrogenesi, poiché è necessario per la proliferazione dei condrociti, per il processo di ipertrofia e per permettere l'invasione vascolare nella superficie di accrescimento (Nigel Mabvuure, 2012).

Nuovi mediatori della condrogenesi e dell'ossificazione endocondrale sono stati oggetto di studio, in particolare è stata identificata una molecola, GADD45 β , che fungerebbe da intermediario tra Runx-2 e MMP-13. GADD45 β sarebbe implicata nella risposta allo stress e nella sopravvivenza cellulare durante la fase terminale di differenziamento. Dagli studi di Goldring (2006) è stato evidenziato come GADD45 β venga indotta da BMP-2 attraverso il *pathway* dipendente da Runx-2. La sua espressione coinciderebbe con quella di Runx-2 nei condrociti preipertrofici e stimolerebbe l'attività di MMP-13. Sembrerebbe anche coinvolta nell'inibizione della proliferazione dei condrociti nella zona ipertrofica, mentre fungerebbe da fattore di sopravvivenza cellulare per un tempo sufficiente da permettere i processi di

rimodellamento della matrice, vascolarizzazione e mineralizzazione (Mary B. Goldring, 2006).

I membri della famiglia delle *Activator protein-2* (in particolare $AP-2\alpha$) sono coinvolti in vari processi, quali migrazione cellulare, differenziazione e apoptosi. Risultano essere regolatori negativi del differenziamento delle MSCs in condrociti e la loro espressione diminuisce durante il processo di ossificazione endocondrale. Inoltre, l'espressione del collagene tipo II e quella di $AP-2\alpha$ risulta essere inversamente correlata. Ciò significa che un'alta concentrazione di $AP-2\alpha$ inibisce la transizione di queste cellule in condrociti differenziati (Magali Demoor, 2014).

Sono stati studiati anche altri mediatori della condrogenesi che influenzano la trascrizione genica promuovendone o inibendone l'espressione a differenti livelli. Ad esempio, il fattore inducibile dall'ipossia (HIF) 1α è richiesto per la sopravvivenza dei condrociti durante la fase di ipertrofia, poiché tra le sue funzioni regola anche l'espressione di VEGF (Mary B. Goldring, 2006). HIF è un gene che viene espresso nella cartilagine ed è sensibile all'ossigeno (Donald A. Fowler, 2020).

L'interazione di fattori positivi e negativi controlla e regola la velocità della progressione della condrogenesi. Una mutazione a carico di uno dei mediatori porta a difetti ossei e articolari di forma congenita. Anche alterazioni a carico dei geni che codificano per proteine strutturali come quelle del Collagene tipo II o delle COMP portano ad anomalie strutturali (Tuan, 2004).

5 Ipossia

All'interno dell'organismo i tessuti e le cellule vivono a diverse condizioni di ossigeno. Un'improvvisa perdita dei livelli fisiologici di ossigeno porta a una massiva morte cellulare nei tessuti colpiti. Alcuni tessuti e cellule, tuttavia, sono capaci di sopravvivere in un ambiente ipossico. L'esempio più eclatante è dato dai condrociti, situati all'interno di un'abbondante matrice ed estremamente distanti dai vasi sanguigni. È importante ricordare come solo la cartilagine immatura contenga vasi sanguigni che vadano a nutrirla, mentre la cartilagine articolare viene nutrita per diffusione dal liquido sinoviale e dall'osso subcondrale. Nei cavalli purosangue i condrociti sono sottoposti ad alte concentrazioni di ossigeno di derivazione vascolare fino ai 7 mesi di età, mentre i primi segni della presenza della linea festonata, tipica della cartilagine articolare adulta, appaiono a 15 mesi, per maturare a 24. Dopo questo lasso di tempo la cartilagine articolare equina viene considerata matura (Nicole Schneider, 2007).

5.1 Risposta cellulare e tissutale ai danni causati dall'ipossia

L'ipossia si definisce come la parziale riduzione della concentrazione di ossigeno fornito alle cellule e ai tessuti. L'ipossia è una delle cause più importanti di morte cellulare, come quella che avviene in corso di ischemia. L'ossigeno è infatti una molecola critica e necessaria per la fosforilazione ossidativa e la respirazione cellulare, soprattutto nelle cellule altamente specializzate. L'ipossia può derivare da un'inadeguata ossigenazione del sangue, da perdita o riduzione dell'apporto ematico, come in corso di ischemia, o da una riduzione nel trasporto dell'ossigeno nel sangue, come in corso di anemia o di avvelenamento da monossido di carbonio, o ancora da un blocco enzimatico della respirazione cellulare (Ronald K. Myers, 2017).

Nella maggior parte dei tessuti, quali tessuto polmonare, muscoli, placenta o sangue, una variazione dai *ranges* fisiologici nella concentrazione di ossigeno provoca degli effetti sui sistemi di trasporto intracellulare, andando ad alterare la funzione delle cellule e la loro composizione (P. I. Milner, 2006).

5.2 Sopravvivenza dei condrociti in ambiente ipossico

Per sopravvivere in condizioni di ipossia i condrociti devono possedere dei meccanismi adattativi che li differenzino dalla maggioranza delle cellule dell'organismo. Ad esempio, è stato mostrato che il fattore inducibile dall'ipossia è altamente conservato, e gioca un ruolo chiave nella funzione e nel controllo della produzione energetica, sopravvivenza cellulare e sintesi della matrice nel piano di accrescimento articolare. Vivere in queste condizioni infatti presuppone che siano necessari specifici fattori che controllino i geni responsabili del metabolismo energetico anaerobico e glucidico e del regolamento del pH (David Pfander, 2007).

Negli ultimi anni si è evidenziata sempre di più l'importanza dell'ipossia e del fattore di trascrizione HIF-1 α nel tessuto cartilagineo. Bassi livelli di tensione di ossigeno e la presenza di HIF-1 α sono fattori importanti per regolare la funzionalità dei condrociti sia in ambiente fisiologico sia durante l'apparizione di patologie, quali osteoartriti. A livello articolare, i piani di accrescimento in cui viene inattivato HIF-1 α sviluppano gravi difetti nelle aree centrali, dovute alla massiva morte cellulare. HIF-1 α è assolutamente necessario per la sopravvivenza dei condrociti in ambienti estremamente poveri di concentrazione di ossigeno (David Pfander, 2007).

HIF-1 è un eterodimero che consiste di due subunità: HIF-1 α e HIF-1 β . A normali concentrazioni di ossigeno la subunità HIF-1 β è stabile, mentre la subunità α , che è quella che conferisce a HIF-1 la reattività all'ossigeno, viene rapidamente degradata. La maggior parte dei geni *target* di HIF-1 sono coinvolti in processi di omeostasi sistemica, locale e intracellulare, come anche nei processi di produzione energetica tramite la via anaerobica. È stato dimostrato che uno dei ruoli più importanti di HIF-1 α risiede nella regolazione del trasporto del glucosio, nella produzione di energia per via anaerobica e nella sintesi della matrice da parte dei condrociti articolari. L'espressione dei trasportatori del glucosio (GLUT) e degli enzimi glicolitici è di fondamentale importanza per il passaggio dalla fosforilazione ossidativa alla produzione di energia per via anaerobica. A normali tensioni di ossigeno HIF-1 α non è rilevabile a livello nucleare, mentre quando i livelli di ossigeno si abbassano sotto il 3% si ha un aumento dell'accumulo di HIF-1 α e l'espressione dei suoi geni *target* (David Pfander, 2007). L'accumulo di HIF-1 α e dei

geni *target* è regolato dalla prolil-4-idrossilasi (C-P4Hs) ferro dipendente che ne inizia la degradazione attraverso i proteosomi, dopo l'accoppiamento con la proteina Von Hippel-Lindau (VHL). Questo processo avviene in normossia, mentre in ipossia è inibito. Grazie a tale inibizione HIF-1 α si accumula nel citosolo per poi spostarsi nel nucleo delle cellule, grazie al legame con HIF-1 β (Elise Duval, 2009). L'eterodimero si lega ad elementi ipossia-dipendenti (HRE) dei geni *target*, che aiutano le cellule ad attivare il metabolismo glicolitico (Magali Demoor, 2014). Da uno studio di Hofbauer e collaboratori (2003) è stato dimostrato che a bassi tenori di ossigeno viene aumentata l'attività di un gruppo di idrossilasi, di cui fa parte la prolil-4-idrossilasi, che catalizzano la formazione della 4-idrossiprolina, essenziale per la formazione della tripla elica e per la sintesi del collagene. L'isoforma più espressa nei condrociti epifisari è la prolil-4-idrossilasi II e gioca un ruolo prioritario nella sintesi del Collagene tipo II. C-P4H è predominante nella zona profonda della cartilagine. Inibendo l'attività di HIF-1 α si ottiene una forte riduzione della quantità di Collagene tipo II, dimostrando quanto sia necessaria l'azione di questo fattore anche per la sintesi dei *markers* specifici della cartilagine e per preservarne il differenziamento. (Claudia Grimmer, 2006).

HIF-1 α non induce solamente l'espressione di Col2a1 e aggregano, ma una sua sovraespressione inibisce quella dei promotori per il Collagene tipo I e tipo III, anche se ad oggi le molecole specifiche coinvolte nella loro regolazione non sono ancora note. La sovraespressione di HIF-1 α , inoltre, si accompagna a un aumento dei livelli di Sox-9, mentre una sua inibizione ne provoca la *downregulation*. (Elise Duval, 2009).

I condrociti articolari, che vivono in un microambiente con tensioni di ossigeno molto basse, sono i responsabili del mantenimento della matrice extracellulare e delle sue componenti. I condrociti, che sono gli unici elementi cellulari presenti all'interno della matrice, ricevono il nutrimento e l'ossigeno tramite il liquido sinoviale e non dai vasi sanguigni, perciò l'apporto, nonché la pressione parziale di ossigeno, risulta essere molto bassa e si suppone decresca ancora di più in condizioni patologiche, come in caso di osteoartrite (David Pfander, 2007). All'interno delle articolazioni sinoviali l'apporto di ossigeno ai condrociti è limitato e dipende nella capacità del liquido sinoviale di diffonderlo durante i movimenti articolari. (David Pfander, 2007).

È stato calcolato da Silver e colleghi (1975) che i condrociti situati nella zona più superficiale di una cartilagine sana vivano in un ambiente con circa il 6-10% di ossigeno e che questo diminuisca fino all'1% nella zona della cartilagine calcificata. È stato inoltre calcolato che la concentrazione di ossigeno scenda quasi a 0 quando ci si trova a una distanza di 0,096 cm dalla superficie in una cartilagine sottoposta a compressione. Come conseguenza diretta del limitato apporto, il consumo di ossigeno da parte dei condrociti articolari risulta essere del 2-5% in meno rispetto alle cellule di altri tessuti più riccamente vascolarizzati, come rene o fegato (David Pfander, 2007).

Il contenuto di ossigeno del liquido sinoviale e della cartilagine, infatti, è già di per sé inferiore rispetto alla maggior parte dei tessuti, e varia dal 3% al 9% in condizioni fisiologiche, raggiungendo livelli inferiori negli strati più profondi. La mancanza di ossigeno sembra essere parzialmente compensata dall'elevata capacità di permeabilità alle molecole di ossigeno che possiede la cartilagine nelle regioni cellulari e pericellulari. Nelle regioni più profonde della cartilagine articolare, la disponibilità di ossigeno non dipende dalla densità dei condrociti, che nella specie equina si riducono a solo l'1-2%, ma dalla diffusione e dal gradiente di ossigeno. È reso evidente che la respirazione mitocondriale del condrocita non sia la via principale del metabolismo energetico, ma che si renda necessaria soprattutto la via anaerobica, che è più resistente alle condizioni di ipossia. È stato individuato che nella specie equina i sinoviociti, ma non i condrociti, producono specie reattive dell'ossigeno dopo cicli di anossia/re-ossigenazione. È stato dimostrato da differenti studi *in vitro* che dal 40% al 60% i condrociti maturi sopravvivono a tensioni dell'1% di ossigeno anche in completa assenza di glucosio. Si è dimostrato inoltre come tali cellule siano in grado di sopravvivere in totale assenza di ossigeno per almeno 7 giorni e per 48 ore in assenza di glucosio, rendendo evidente la loro grande capacità di adattamento all'ipossia. Il basso tasso di respirazione cellulare dei condrociti sottolinea che la fosforilazione ossidativa contribuisce solo in modo limitato all'approvvigionamento energetico delle cellule e conferma che la glicolisi anaerobica è la principale fonte di ATP. La conferma che la respirazione ossidativa sia limitata è data anche dall'assenza della presenza delle normali due molecole di lattato prodotte per ogni cellula di glucosio consumata durante la respirazione (Nicole Schneider, 2007).

Questo porta invece in primo piano il ruolo del fattore di trascrizione HIF-1 α nella sopravvivenza e nella crescita di tali cellule. Infatti, i condrociti non sono in grado di sopravvivere in condizioni di ipossia in assenza di HIF-1 e la perdita della produzione energetica tramite la via della glicolisi rappresenta la principale causa di morte cellulare che avviene nel piano di accrescimento articolare. Al contrario, l'inattivazione della proteina VHL porta alla formazione di condrociti atipici e allargati nella zona di proliferazione, riduce il numero di cellule e disturba la normale architettura degli strati della cartilagine. Da studi di laboratorio si è inoltre evidenziato come un'assenza totale di VHL nella cartilagine sia correlata a un accumulo di HIF-1 α , geni *target* per HIF-1 e collagene tipo II, mentre una sua alterazione esiti in un aumento dell'attività trascrizionale di HIF-1 α (David Pfander, 2007).

I condrociti equini dispongono anche di importanti riserve lipidiche e si ipotizza che possano utilizzarle come fonte energetica in condizioni estreme. L'accumulo di lipidi suggerisce che possa venire utilizzata anche un'altra via metabolica oltre a quella glicolitica, ossia la β -ossidazione (Nicole Schneider, 2007).

Da uno studio di Bohensky e collaboratori (2007), è stato dimostrato come i condrociti che vivono in ambiente ipossico siano refrattari a trattamenti con staurosporine, le quali normalmente inducono apoptosi. È proprio HIF-1 a fungere da protezione contro l'apoptosi in presenza di un basso tenore di ossigeno. L'importanza di HIF-1 come fattore di sopravvivenza condrocitaria è stata anche sottolineata dal lavoro di Brucker e colleghi (2005), in cui si è dimostrato che HIF-1 α viene immagazzinato a livello perinucleare nei condrociti della zona intermedia e profonda, suggerendo che in queste aree essi debbano possedere un fenotipo specifico adattato all'ipossia e che il gene di espressione per HIF-1 α sia particolarmente conservato (David Pfander, 2007).

Altri studi, partendo da quelli di Stockwell in cui si evidenzia una significativa riduzione della densità mitocondriale nei condrociti dello strato più profondo in comparazione con quelli degli strati più superficiali, fino a quelli più recenti di Yudoh e collaboratori, in cui sperimentalmente si evidenzia che HIF-1 protegge i condrociti articolari dalla morte cellulare indotta dalle citochine proinfiammatorie in ambiente ipossico, confermano l'importanza del fattore HIF-1. In particolare, gli studi di Yudoh

(2005) dimostrano come HIF-1 sia necessario per l'*upregulation* degli enzimi glicolitici e dei trasportatori del glucosio al fine di ottenere energia tramite il metabolismo anaerobico. I condrociti articolari esprimono infatti almeno 9 dei 14 trasportatori del glucosio esistenti. In particolare, GLUT-1 e GLUT-3 sono trasportatori ad alta affinità che controllano l'*intake* di glucosio e il suo utilizzo. L'*upregulation* di tali trasportatori permette ai condrociti di aumentare l'*intake* di glucosio e l'attività glicolitica, portando alla produzione di ATP, la molecola fondamentale che apporta energia alle cellule e ne garantisce la sopravvivenza, soprattutto durante condizioni patologiche. GLUT-1, soprattutto in condizioni di ipossia, trasporta deidroascorbato all'interno dei condrociti, aumentano così la concentrazione intracellulare di acido ascorbico (David Pfander, 2007). L'inibizione di HIF-1 porta a una perdita completa dell'espressione genica di GLUT-1 e fosfoglicerato-chinasi (PGK-1), un altro suo gene *target* (Claudia Grimmer, 2006).

In altri studi è stato infine evidenziato come l'omeostasi del pH cartilagineo non sia inficiata da concentrazioni di ossigeno superiori o uguali al 5%, ma quando queste scendono al di sotto del 5% si ha invece una diminuzione del pH extra- e intracellulare. Tale processo potrebbe essere favorito dall'aumento dell'attività della lattatodeidrogenasi, da eccessi di lattato e dall'inibizione degli scambi tra ioni Sodio (Na^+) e Idrogeno (H^+). *In vivo*, i condrociti articolari riescono a adattarsi a un microambiente ostile, basse concentrazioni di glucosio e bassi livelli di pH (David Pfander, 2007).

Tramite la descrizione dei diversi studi si evince come HIF-1 possa trovare un'importante applicazione a fini terapeutici, in particolare in terapie che coinvolgano l'ingegneria del tessuto cartilagineo, in quanto è fondamentale per mantenere il fenotipo dei condrociti. Inoltre, la manipolazione di questo fattore potrebbe rappresentare un nuovo approccio nelle terapie che riguardano la cartilagine (Elise Duval, 2009).

6 Patologie articolari del Cavallo

Le patologie articolari di interesse veterinario riguardanti la specie equina sono numerose, ma ai fini del progetto si è posta particolare attenzione sullo studio dell'osteoartrite. È una delle patologie articolari più comuni a carico di questa specie ed è caratterizzata da aree di cartilagine articolare danneggiata, concentrate nelle porzioni articolari soggette a carico, in associazione con la formazione di nuovo tessuto osteo-cartilagineo ai margini articolari, cambiamenti a carico dell'osso subcondrale e sinovite (Jan Bondeson, 2010).

La patologia è causata da processi degenerativi a carico della cartilagine e dell'osso subcondrale. Le cause possono essere riscontrate sia in fattori predisponenti di natura congenita (genetici, costituzionali) sia acquisita, che agiscono sul metabolismo della cartilagine matura e sul rimodellamento osseo (Borghetti Paolo, 2002).

6.1 Osteoartrite (osteoartrosi o malattia degenerativa articolare)

L'osteoartrite (OA), definita anche più generalmente "*Degenerative Joint Disease*" (DJD), è un processo patologico multifattoriale e autoalimentante con andamento progressivo dell'intera articolazione sinoviale; provoca degenerazione della cartilagine articolare, ispessimento dell'osso subcondrale, formazione di osteofiti, infiammazione sinoviale, degenerazione legamentosa e ipertrofia della capsula articolare (Livia Roseti, 2019). Nella specie equina si ha una frequente associazione con processi infiammatori articolari, sebbene la patologia sia classificata come sinovite non infiammatoria (Yeon-Ah Lee, 2007); inoltre è la causa più significativa di zoppia e di perdita di rendimento nel cavallo sportivo. (D.R. Manhart, 2009).

Vede come momento patogenetico principale lo squilibrio del metabolismo condrocitario. Provoca un progressivo deterioramento della cartilagine articolare a causa della degradazione del collagene tipo II, che appare mutato, rimodellamento osseo e processi infiammatori capsulo-sinoviali, agendo direttamente sulla cartilagine e sull'osso maturo (Yeon-Ah Lee, 2007). Presenta forme cliniche, associate a segni clinici quali dolore, deformità, instabilità e riduzione

dell'escursione articolare quando vengono coinvolti osso e tessuti periarticolari, ma anche forme subcliniche croniche che possono portare allo sviluppo di osteoartrite anche dopo anni dall'evento patologico iniziale. I segni clinici includono dolore di grado variabile, che peggiora con l'esercizio e l'attività, rigidità dopo periodi di riposo e gonfiore articolare. La diagnosi si esegue mediante l'utilizzo dei raggi X, che rivelano nei casi sintomatici osteofitosi marginale, rimodellamento osseo ed effusione articolare; i segni radiografici possono però anche essere assenti (Livia Roseti, 2019). Può risultare asintomatica in quanto la cartilagine è un tessuto non innervato e le lesioni presenti possono essere identificabili solo mediante artroscopia. Il meccanismo patogenetico primario risiede nella degenerazione della cartilagine, in particolar modo per un'eccessiva condrolisi e degradazione delle componenti fondamentali della ECM a cui seguono alterazioni morfologiche dei tessuti (Borghetti Paolo, 2002). In generale si ritiene che la degenerazione della cartilagine sia caratterizzata da due momenti: una fase biosintetica, durante la quale le cellule residenti, i condrociti, cercano di riparare la matrice, e una fase degradativa, in cui l'attività di enzimi prodotti dai condrociti va a digerire la matrice, ne inibisce la sintesi e come conseguenza si accelera l'erosione della cartilagine. Il processo provoca alterazioni a carico della proliferazione e del fenotipo dei condrociti, con riduzione della sintesi della ECM e un aumento della sua degradazione. In una cartilagine matura normale i condrociti sintetizzano le componenti della matrice molto lentamente, tranne durante il periodo dello sviluppo, in cui la biosintesi viene stimolata da diverse citochine e fattori di crescita, quali TGF- β , BMPs e IGF-1. Durante l'osteoartrite alcuni di questi fattori vengono comunque prodotti dai condrociti, ma l'equilibrio omeostatico viene disturbato, con un aumento della componente catabolica. I condrociti, inizialmente, cercano di riparare il danno della matrice aumentando la loro attività anabolica, ma successivamente si ha una forte perdita della rete di proteoglicano, che rappresenta un tratto distintivo che accompagna tutte le fasi evolutive della patologia (Linda J. Sandell, 2001). La degradazione della ECM può essere causata da alterazioni metaboliche primarie del condrocita che, sottoposto a un eccessivo stress meccanico e a stimoli quali la presenza di frammenti di acido ialuronico nel liquido sinoviale, libera citochine e mediatori infiammatori (IL-1, TNF- α e IL-6), che innescano la degradazione della ECM, poiché inducono l'espressione di prostaglandine, ossido nitrico, cicloossigenasi, MMPs e probabilmente anche altre

citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL-8, IL-17 e IL-18 (Borghetti Paolo, 2002), mentre riducono le concentrazioni di enzimi inibitori delle MMPs e la sintesi di ECM. I radicali liberi dell'ossido nitrico, inoltre, sono mediatori biologici importanti in corso di osteoartrite. I condrociti articolari, tanto sani quanto danneggiati, producono l'enzima ossido-nitrico sintasi inducibile. L'ossido nitrico e l'enzima iNOS, *in vitro*, possono inibire la sintesi di proteoglicano e la risposta dei condrociti all'IGF-1, potendo giocare un ruolo importante nell'apoptosi condrocitaria e dei sinoviociti (Linda J. Sandell, 2001).

È importante ricordare che il condrocita in corso di osteoartrite rimane metabolicamente attivo (Claudia Grimmer, 2006) anche se non vi è una singola citochina prodotta in grado di causare tutte le reazioni metaboliche che si osservano durante la patologia. Si è visto, però, che la riduzione delle cariche negative, dovuta alla perdita di aggregano e di glicosamminoglicani avviene nello strato superficiale, mentre le cellule dello strato profondo restano attivate. L'iperattività della sintesi della matrice è ristretta ai soli condrociti dello strato intermedio e profondo, nei quali la matrice si mantiene istochimicamente ancora intatta e non si ha una grande perdita di proteoglicani. Questo spiega, almeno in parte, la perdita del contenuto in proteoglicani dello strato superficiale, soprattutto se si assume che la capacità di diffusione dei monomeri di aggregano è molto limitata e anche se aumenta la sua sintesi in un particolare strato cartilagineo, questo non può compensare la riduzione presente in altre zone (Linda J. Sandell, 2001).

È stato evidenziato che sia i condrociti sani sia quelli patologici sintetizzano la BMP-7, anche conosciuta come OP-1 o proteina osteogenica 1. Nella cartilagine osteoartritica BMP-7 si riscontra nello strato più superficiale (Linda J. Sandell, 2001).

Tra le metalloproteasi, MMP-13 è quella più espressa in corso di osteoartrite ed è in grado di degradare tanto il collagene tipo II quanto l'aggregano. Altre collagenasi quali MMP-1 e MMP-14, insieme a MMP-3 (stromalisina) e le gelatinasi (MMP-2, MMP-9) risultano essere importanti mediatori nel processo osteoartritico. In aggiunta, le aggreganasi ADAMTS-4 e ADAMTS-5 sembrano essere mediatori primari per la disgregazione dell'aggregano (Camila B. Carballo, 2017). Infine, le cisteine peptidasi catepsina L e K sono state localizzate in associazione con la

cathepsina B all'interno degli osteofiti, nelle zone soggette a rimodellamento e nei siti infiammatori (Linda J. Sandell, 2001).

Recentemente è stato dimostrato che un'alterazione del TGF- β con aumenti nelle concentrazioni di TGF- β 1 è coinvolta nella patogenesi dello sviluppo dell'osteoartrite, mentre l'inibizione del TGF- β 1 attenua la degenerazione della cartilagine. Inoltre, grazie a studi di Handorf e colleghi, è stato mostrato come il TGF- β 1 sia in grado di indurre l'espressione di Ihh in condrociti posti in coltura, suggerendo il suo ruolo sia nella cartilagine sana sia in quella patologica (Camila B. Carballo, 2017).

Anche HtrA1 (*High temperature requirement A*), una particolare *heat shock protein* resistente alle alte temperature, gioca un ruolo essenziale nelle situazioni patologiche come l'osteoartrite. Durante l'OA l'espressione di questa proteasi aumenta, determinando proteolisi dell'aggrecano ed agendo come antagonista dei segnali mediati dai membri della famiglia delle TGF- β , in quanto può indurre la degradazione dei loro recettori. La stimolazione dell'espressione di HtrA1 durante l'osteoartrite promuove lo sviluppo della malattia, in quanto aumenta il catabolismo mentre riduce la risposta anabolica da parte dei condrociti (Magali Demoor, 2014).

L'osteoartrite si classifica in:

1. Osteoartrite primaria o idiopatica: non si riscontra un'eziologia precisa, né condizioni predisponenti, processi infiammatori o traumatici. Un'ipotesi del suo sviluppo è legata alla senescenza del tessuto o predisposizioni genetiche ereditarie a carico del collagene. Dipende infatti dalla limitata capacità della cartilagine di rigenerarsi e di mantenersi funzionale. Ha rilevanza clinica nel cavallo (Borghetti Paolo, 2002);
2. Osteoartrite secondaria: si identificano cause scatenanti e predisponenti, quali stress meccanico eccessivo dovuto a intense ed esagerate attività sportive e lesioni traumatiche o alterazioni morfologiche a carico soprattutto di legamenti e menischi (Julia Dubuc, 2018), difetti genetici, metabolici, disordini nutrizionali che alterano la normale struttura e funzione della

cartilagine articolare, malattie neuropatiche o endocrine, agenti infettivi (Livia Roseti, 2019).

L'eziopatogenesi vede coinvolte due tipologie di cause distinte: cause che vanno ad alterare la cartilagine, rendendola più sensibile a uno stress meccanico fisiologico, in particolar modo nel cavallo da corsa a causa di capsulo-sinoviti acute o periartriti, e cause che determinano uno stress meccanico eccessivo su una cartilagine normale. Queste ultime sono le cause principali di osteoartrite e si possono realizzare per difetti biometrici di appiombamento, malformazione degli arti, instabilità o lesioni legamentose, incongruità articolari, incrementi ponderali eccessivi che portano a un eccesso di pressione statica e traumi da un'inadeguata attività sportiva o lavoro (osteoartrite del tarso, del nodello e del navicolare) che provocano un eccesso di forze dinamiche e da impatto. Anche un'alterazione primaria dell'osso subcondrale, come in caso di osteodistrofie, osteomieliti e sclerosi nelle aree di maggior carico (ossa del carpo e del tarso e parte dorsale dei condili del metacarpale terzo) e che lo rende rigido o indebolito contribuisce ad aumentare il carico a livello cartilagineo, in quanto l'osso alterato non è più in grado di dissipare le forze all'interno dell'articolazione. L'alterato rimodellamento determina sclerosi dell'osso subcondrale con riduzione delle sue capacità di dissipare le forze meccaniche, che si concentrano ancora di più sulla cartilagine. Traumi acuti e intensi determinano anche lesioni a carico della capsula articolare, come distensioni, distorsioni e lacerazioni, e causano processi infiammatori capsulo-sinoviali (capsulo-sinovite traumatica) (Borghetti Paolo, 2002).

6.1.1 Inizio e progressione

Nelle fasi iniziali la cartilagine dello strato superficiale si mostra meno lucida, più molle, giallastra, rugosa e irregolare, con presenza di vescicole. Si osserva poi un aumento della degradazione della ECM da parte dell'attività delle MMPs e aggrecanasi, nonché la distruzione delle reti collagene e la perdita della capacità di legare ioni per riduzione della carica negativa. Tutto ciò porta a una minore capacità della matrice di legare acqua e allo sviluppo dei tratti distintivi iniziali dell'osteoartrite: rigonfiamento dello strato superficiale per aumento del contenuto di acqua (Claudia Grimmer, 2006). Se il rigonfiamento persiste si riducono le capacità funzionali della

matrice di opporsi alle forze compressive e istologicamente si rilevano fibrillazioni tangenziali e fessurazioni longitudinali, necrosi dei condrociti e perdita di componenti della matrice, soprattutto in proteoglicani (Borghetti Paolo, 2002). Successivamente le fessurazioni assumono andamento radiale, estendendosi in profondità, anche fino all'osso subcondrale, provocandone erosione ed eventuale esposizione (Livia Roseti, 2019). Nel cavallo, le articolazioni a ginglino ad alto grado di mobilità, come quella metacarpo- e metatarso-falangea (nodello), possono mostrare evidenti solchi e fessure di diversa profondità, che decorrono parallelamente al senso del movimento articolare (*wearing lines*). Giunta all'osso la fessurazione provoca il sollevamento di lembi cartilaginei e la perdita di frammenti di cartilagine. La perdita progressiva della matrice interessa i diversi strati della cartilagine, che appaiono più sottili o frastagliati, mostrando un'erosione progressiva (Borghetti Paolo, 2002). La progressiva perdita dell'architettura della cartilagine, unita all'aumento dell'attività degli osteoclasti nell'osso subcondrale, causa l'interruzione della *tidemark* dei canali ossei che trasportano cellule infiammatorie dei vasi sanguigni. In questo modo viene superata la resistenza della cartilagine articolare alla neovascolarizzazione, come dimostrato anche dalla produzione di fattori pro-angiogenetici come il VEGF (Livia Roseti, 2019). I condrociti inizialmente rispondono alla perdita di tessuto con un aumento dell'attività proliferativa, unendosi in gruppi di *clusters* clonali nei pressi delle fessurazioni nel tentativo di riparare il danno. La risposta rimane incompleta e porta alla formazione di fibrocartilagine, un tessuto poco organizzato e più sensibile allo stress meccanico e ai danni (Borghetti Paolo, 2002). Tramite l'analisi dei livelli di mRNA nei condrociti in corso di osteoartrite si è evidenziato che essi non sono metabolicamente inerti, ma che sintetizzano attivamente proteine, tra cui proteine strutturali ed enzimi degradativi (Linda J. Sandell, 2001). Quest'attività avviene come risposta per riparare la matrice extracellulare (David Pfander, 2007), ma a un certo punto l'attività anabolica biosintetica non è più in grado di contrastare quella catabolica, esitando nella degenerazione del tessuto (Linda J. Sandell, 2001) (*Figura 5*).

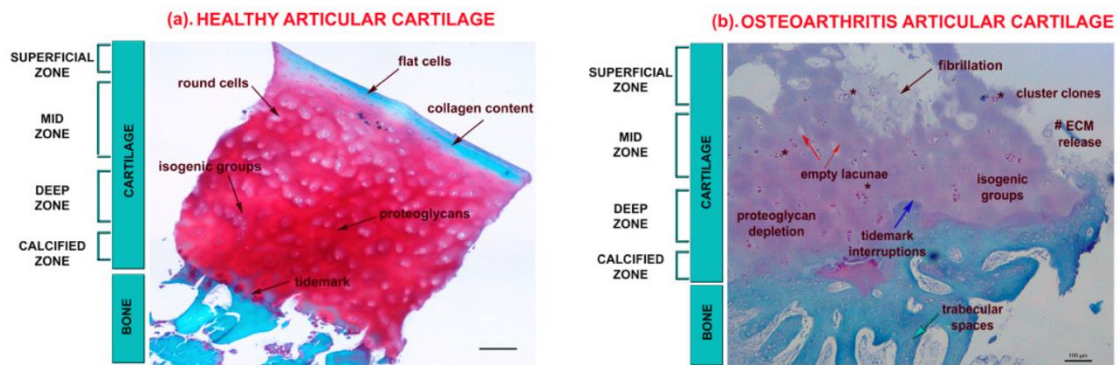


Figura 5: Rappresentazione microscopica del tessuto cartilagineo articolare sano (a) e OA (b), fissato con colorazione Safranina-O/Fast Green, tratto da archivi di laboratorio (Livia Roseti, 2019).

Ciò nonostante, i condrociti continuano a esprimere diverse componenti della matrice per cercare di riparare e restaurare la matrice persa (Claudia Grimmer, 2006) e le reazioni cellulari vengono sommariamente distinte in cinque categorie: proliferazione e apoptosi cellulare; cambiamenti nell'attività biosintetica; cambiamenti nella degradazione; modulazione fenotipica dei condrociti articolari; formazione di osteofiti. La mancanza di una risposta efficace ai segnali anabolici e catabolici e l'aumento del sequestro dei fattori di crescita nella ECM della cartilagine portano i condrociti alla perdita dell'espressione di aggrecano e collagene tipo II. Essi iniziano a esprimere collagene tipo I, tipo III e tipo V. L'alterazione irreversibile del fenotipo e la de-differenziazione si evidenziano quando non vengono più espressi i geni cartilagineo-specifici come aggrecano e collagene tipo II. L'alterazione del fenotipo rappresenta dunque un altro potenziale motivo del fallimento biosintetico condrocitario in corso di osteoartrite. I condrociti più attivi in corso di osteoartrite si rinvengono nello strato intermedio ed esprimono pro-collagene tipo IIA, che tipicamente viene espresso dalle cellule condroprogenitrici: questo indica che i condrociti articolari maturi iniziano a esprimere un fenotipo tipico delle cellule condroprogenitrici durante la degenerazione cartilaginea. Cellule che esprimono collagene tipo III (tipico di condrociti de-differenziati) si riscontrano maggiormente nella parte superficiale dello strato intermedio, mentre nello strato profondo le cellule iniziano a esprimere collagene tipo X, tipico dei condrociti ipertrofici, e a depositare calcio nella ECM, come accade durante il processo di

ossificazione endocondrale nelle fasi di accrescimento. Nessuno di questi geni viene espresso invece dai condrociti dello strato superficiale (Linda J. Sandell, 2001).

6.1.2 Evoluzione della lesione

L'erosione e la perdita di tessuto a tutto spessore non causano solo alterazioni a carico della cartilagine articolare, ma portano anche all'esposizione dell'osso subcondrale, che viene sottoposto a fenomeni di rimodellamento nelle aree che subiscono i carichi. L'osso assume un aspetto levigato e compatto in superficie (eburnizzazione) con addensamento e ispessimento osseo (sclerosi) sia perché si ha la neoformazione di lamelle ossee sia per l'ispessimento delle trabecole. Possono presentarsi anche fenomeni di riassorbimento locale con formazione di cisti ossee. Nella zona di transizione, in cui la cartilagine calcificata si congiunge con la sinoviale e il periostio, si attivano fenomeni di ossificazione endocondrale, dovuti alla presenza nel liquido sinoviale di cellule del sistema immunitario, come macrofagi e cellule T, con conseguente sviluppo di prominenti neoformazioni osteocartilaginee, dette osteofiti marginali, connesse all'osso epifisario e sporgenti verso l'interno della cavità articolare (Borghetti Paolo, 2002). La presenza di osteofiti in un'articolazione, più di ogni altro segno patologico, distingue l'osteoartrite dalle altre patologie. Gli osteofiti sembrano esser stimolati sia da fattori meccanici, quali lo scarico di forze eccessive ai margini della cartilagine, dove hanno sede le cellule osteoprogenitrici, sia da fattori umorali. Questo indica la presenza di una popolazione cellulare pluripotente che tenta di dare una risposta compensatoria alle sequele provocate da fattori meccanici e umorali, per limitare e controllare la progressione del danno cartilagineo, ampliando la superficie articolare e tentando di distribuire il carico su un'area maggiore, riducendo l'instabilità articolare (Linda J. Sandell, 2001). Fenomeni di osteofitosi marginale si verificano frequentemente nel cavallo, soprattutto nei processi osteoartritici che interessano l'articolazione metacarpo-falangea, a livello del margine cranio-proximale della prima falange, nelle articolazioni interfalangee prossimali e distali e nel margine articolare craniale delle giunture carpali. A livello delle inserzioni capsulo-legamentose l'eccesso delle forze meccaniche determina anche la formazione di osteofiti periostali (Borghetti Paolo, 2002). Le alterazioni osteocondrali sono spesso accompagnate da un'alta

quantità di *markers* biochimici tipici del tessuto danneggiato e dell'infiammazione, quali il peptide pro-collagene tipo I e tipo II (PINP, PIINP), *C-terminal cross-linking telopeptides* (CTX-II), osteocalcina (OC), piridolina urinaria totale (PYD) e sialoproteine ossee (BSP) (Livia Roseti, 2019).

Nelle fasi iniziali si ha una modesta sinovite, mentre nelle forme più avanzate e croniche si può incorrere in proliferazione polipoide e fibrosi della sinoviale, a volte con metaplasia condroide e formazione di noduli cartilaginei che possono ossificare. Alcuni di questi noduli si possono staccare e dare origine a corpi liberi articolari. Nei casi cronici si ha fibrosi della capsula articolare e più tardivamente osteoporosi epifisaria. Nei casi molto gravi l'evoluzione può esitare in gravi deformazioni delle epifisi articolari e loro collasso, alterazioni dei margini articolari con perdita di congruenza e sublussazione (artrosi deformante). La progressiva deformazione articolare e la riduzione della mobilità articolare, causata dalla fibrosi capsulare e dal suo ispessimento, può determinare anche anchilosi (osteoartrosi anchilopoietica) (Borghetti Paolo, 2002).

6.2 Importanza del meccanismo autofagico in corso di osteoartrite

I condrociti, durante il processo osteoartritico, rispondono inizialmente con un aumento dell'attività proliferativa. Quest'attività potrebbe essere dovuta a un migliore accesso dei condrociti ai fattori proliferativi di derivazione sinoviale a causa delle fessurazioni, dell'allentamento della rete collagena o del danno alla matrice stessa. In ogni caso la loro proliferazione è l'attività biologica che più probabilmente causa il "*clustering*" condrocitario, una caratteristica della cartilagine patologica. La morte cellulare programmata sembra essere l'evento dominante durante la degenerazione cartilaginea, anche se da diversi studi i risultati sono stati contrastanti (Linda J. Sandell, 2001). Da Sandell e colleghi (2001) è stato confermato che l'apoptosi avviene durante l'osteoartrite, ma a un tasso molto basso, indicando che la morte dei condrociti ha solo un impatto limitato nella progressione della patologia. L'unica zona in cui si ha un ampio numero di lacune vuote, che stanno a indicare morte cellulare, è quella calcificata. Questo suggerisce che in stadi più avanzati della patologia, essendo che le cellule apoptotiche non vengono

rimosse in modo efficiente dalla cartilagine, i loro prodotti, quali pirofosfati e precipitati di calcio, possano contribuire alla degradazione patologica della cartilagine (Linda J. Sandell, 2001).

Il mantenimento dei condrociti in condizioni fisiologiche appare quindi essere un importante fattore per la preservazione della cartilagine e per impedirne la degradazione (Yu-Sheng Li, 2015).

L'autofagia è un meccanismo dell'omeostasi intracellulare altamente conservato che interviene nella degradazione di organelli cellulari disfunzionali, macromolecole e altre componenti non necessarie o esauste. L'autofagia è implicata anche nel rallentamento dell'invecchiamento e nel mantenimento dello *steady state* del metabolismo energetico cellulare. Uno dei maggiori regolatori del processo è la proteina chinasi TOR (*target* della Rapamicina), che inibisce l'autofagia in condizioni basali. Inoltre, l'autofagia è regolata negativamente dal *pathway* P13K/Akt (fosfatidilinositolo-3-chinasi). Segnali promotori dell'autofagia sono invece AMPK e p53. L'autofagia viene considerata come un meccanismo di sopravvivenza cellulare importante, in quanto interviene proteggendo le cellule sottoposte a condizioni patologiche, come pressioni esterne eccessive, ipossia e stress; inoltre serve non solo per regolare gli stadi finali del ciclo vitale dei condrociti, ma anche la velocità con la quale essi entrano nella fase di maturazione. È quindi un meccanismo omeostatico importante nella cartilagine articolare ed è stato dimostrato che può restaurare la funzionalità dei condrociti danneggiati, alleviando e attenuando la progressione dell'OA (Yu-Sheng Li, 2015).

Recenti studi hanno dimostrato che il meccanismo di autofagia possa proteggere i condrociti dalla degradazione, ma che i suoi livelli nella cartilagine osteoartritica siano ridotti. Con la progressione dell'OA aumenta l'espressione di mTOR, che inibisce i segnali di trasduzione per l'autofagia nella cartilagine articolare, mentre promuove la degenerazione cartilaginea. Dato che è stato dimostrato clinicamente ed epidemiologicamente come l'invecchiamento cellulare sia un fattore di rischio per lo sviluppo dell'osteoartrite, è stato enfatizzato lo studio dell'autofagia e del suo ruolo nella regolazione dei processi di invecchiamento (Ran Duan, 2020). Un aumento dell'autofagia rappresenta un tentativo di risposta compensatoria a uno stress ossidativo, ma quando il danno prolungato supera le capacità di tale

meccanismo la risposta autofagica può portare a ulteriore degenerazione, provocando invecchiamento cellulare e apoptosi. L'autofagia regola i cambiamenti nell'espressione dei geni *OA-like* mediante l'eliminazione delle sorgenti intracellulari delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che promuovono lo stress ossidativo, risultato dell'accumulo di complessi infiammatori multiproteici, denominati inflammasomi. La perdita dell'interazione tra autofagia e inflammasoma contribuisce alla riduzione dell'efficienza della riparazione cartilaginea (Yu-Sheng Li, 2015). Ciò indica che l'autofagia partecipa nella prevenzione dello sviluppo dell'osteoartrite mediando l'apoptosi e la produzione di ROS. Quando viene attivata si possono rimuovere sia i mitocondri danneggiati sia i ROS intracellulari, andando a proteggere i condrociti dagli effetti negativi dell'OA. Per questo motivo si ritiene che l'autofagia giochi un ruolo indispensabile nel proteggere i condrociti dallo stress ossidativo (Ran Duan, 2020).

Esiste inoltre una relazione tra il fattore HIF-1 α e l'accumulo di proteine autofagiche, come Beclin-1, mentre è stato dimostrato *in vitro* che HIF-2 α sia un fattore soppressivo della risposta autofagica, soprattutto nei condrociti maturi, che si ritrovano in elevate concentrazioni nella cartilagine patologica. La Rapamicina attiva l'espressione dei fattori regolatori del processo autofagico e previene la morte cellulare e la perdita dei proteoglicani. Infine, anche le citochine pro-infiammatorie di derivazione sinoviale accelerano l'invecchiamento cellulare e inibiscono l'autofagia. Il blocco dell'autofagia potenzia l'attività dell'inflammasoma e l'infiammazione che ne deriva (Yu-Sheng Li, 2015).

Le anomalie del meccanismo autofagico riscontrate nella cartilagine patologica includono la riduzione nel numero e nelle dimensioni degli autofagosomi, dovuta a una diminuzione dell'espressione delle proteine promotrici, e la sovraespressione di mTOR, fattore soppressivo del processo (Ran Duan, 2020).

6.3 Ruolo dell'ipossia, di HIF-1 α e HIF-2 α in corso di osteoartrite

In corso di osteoartrite la concentrazione parziale di ossigeno nel liquido sinoviale è molto bassa, in quanto la progressiva perdita di sostanza cartilaginea porta a una

diminuzione della diffusione di ossigeno (Claudia Grimmer, 2006). È stato stabilito ormai da molto tempo che il liquido sinoviale estratto da articolazioni osteoartritiche differisca da quello normale e che contenga meno ossigeno (David Pfander, 2007).

Era stato ipotizzato anche che la proliferazione sinoviale potesse avere un effetto significativo sull'ipossia dell'articolazione, ma in uno studio condotto da Lee e collaboratori (2007), è stato dimostrato che nei pazienti affetti da osteoartrite la presenza di proliferazione della sinovia non influenza la concentrazione parziale di ossigeno dell'articolazione (Yeon-Ah Lee, 2007).

L'ipossia cronica che si realizza nelle articolazioni patologiche interessa sia le linee cellulari della sinovia sia i condrociti, che esprimono per conseguenza elevati livelli di HIF-1 e dei suoi geni *target*, come VEGF-A, leptina e iNOS. Yudoh e colleghi hanno dimostrato un aumento dei livelli di trascrizione di HIF-1 α nella cartilagine degenerata. L'accumulo e l'attività di HIF-1 α possono essere aumentati anche da altri fattori, quali la presenza di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1), variazioni dello stress meccanico e fattori di crescita quali IGF-1 e fattore di crescita derivato dalle piastrine, che condizionano anche l'istaurarsi e la progressione dell'osteoartrite (David Pfander, 2007).

HIF-2 α è un fattore di trascrizione, omologo a HIF-1 α , coinvolto nel controllo della risposta all'ipossia mediante l'attivazione di geni *target*, similmente a quanto accade per HIF-1 α . Nonostante le similitudini strutturali e funzionali, HIF-1 α e HIF-2 α possiedono effetti diversi e antagonisti sui condrociti sia in condizioni fisiologiche sia patologiche. HIF-2 α ha attività catabolica e indurrebbe direttamente nei condrociti l'espressione di geni che codificano per fattori catabolici, tra cui alcune metalloproteasi (MMP-1, MMP-3, MMP-12 e MMP-13), aggreganasi 1 (o ADAMTS4), ossido nitrico sintasi-2 (NOS-2) e prostaglandina-endoperossidosintasi-2 (PTGS2). Da alcuni studi condotti da Yang e collaboratori (2010) è stato dimostrato che HIF-2 α è anch'esso un fattore causale della distruzione della cartilagine, in quanto regolatore cruciale di geni con attività catabolica, ma non sembrerebbe controllare né l'apoptosi condrocitaria né la sintesi di ECM. L'aumento dell'espressione di HIF-2 α è stato rilevato soprattutto a livello dello strato superficiale, dove si ha una distruzione di cartilagine maggiore. La sua

espressione nella cartilagine osteoartitica è indotta sia da fattori biofisici, quali la distruzione della matrice, sia biochimici, come l'attività delle citochine proinfiammatorie (Siyong Yang, 2010).

I condrociti patologici esprimono, *in vivo*, un aumento di sintesi della prolil-4-idrossilasi tipo II, che conferma gli studi condotti sulla valutazione dell'aumento della produzione di collagene tipo II durante la patologia. L'aumento dell'attività di C-4PH dipende da una maggiore sintesi della subunità catalitica α (II) (Claudia Grimmer, 2006).

6.4 Opzioni terapeutiche per l'osteoartrite (OA)

Nonostante l'alta prevalenza dell'osteoartrite, ad oggi non vi è ancora un trattamento che risulti completamente efficace. Trattandosi di una patologia a carattere multifattoriale, è necessario un approccio multifattoriale. Sono disponibili diverse opzioni terapeutiche per trattare tale patologia nel cavallo. I trattamenti attuali sono divisi in medici e chirurgici (Livia Roseti, 2019).

6.4.1 Terapie mediche

Nella pratica equina uno dei regimi terapeutici più usati per trattare l'osteoartrite resta il trattamento medico. Il trattamento più comune per alleviare il dolore è quello farmacologico, mediante l'utilizzo di farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS), tra i quali ad oggi il più usato è il Fenilbutazone sia per la sua disponibilità sia per la sua economicità; altri FANS usati nella clinica equina sono il Flunixin meglumide, anche se più costoso, il Ketoprofene, ancora poco utilizzato ma con pochi effetti collaterali nel cavallo, il Naproxene per via orale, che possiede però efficacia inferiore al Fenilbutazone e il Carprofene, che sembrerebbe dare buoni effetti sul metabolismo dei proteoglicani (Laurie R. Goodrich, 2006). Più recentemente sono stati introdotti anche farmaci inibitori della COX-2, enzima necessario per la sintesi delle prostaglandine; questi ultimi hanno il vantaggio di causare minore tossicità, al contrario dei FANS di prima generazione, che possono provocare effetti collaterali e tossicità dopo un utilizzo prolungato (D.R. Manhart, 2009).

È diventato popolare anche il supplemento dietetico con acidi grassi polinsaturi Omega-3, che può fornire una buona alternativa nel trattamento dell'infiammazione articolare del cavallo. Un supplemento di EPA e DHA nella razione può portare a vantaggi nel mantenimento delle articolazioni, che si evidenzia con una riduzione del dolore dei livelli di infiammazione articolare. Il supplemento di EPA e DHA offre benefici soprattutto in pazienti geriatrici, ai quali permette di migliorare la qualità della vita (D.R. Manhart, 2009).

Le infiltrazioni intra-articolari (IA) di glucocorticoidi possono alleviare il dolore, mentre quelle di acido ialuronico (HA) possono restaurare la normale lubrificazione articolare (Livia Roseti, 2019). Sebbene l'utilizzo di glucocorticoidi a livello intra-articolare sia ancora ampiamente sfruttato nella clinica equina, molti *report* hanno descritto gli effetti deleteri che questi farmaci apporterebbero alla cartilagine se usati in modo continuo e ad alte concentrazioni, tra cui: riduzione della dimensione dei condrociti, perdita di glicosamminoglicani o riduzione della loro sintesi, inibizione della sintesi di proteoglicani e necrosi condrocitaria. I glucocorticoidi più usati a livello intra-articolare sono: Metilprednisolone acetato e Triamcinolone acetone (Laurie R. Goodrich, 2006), che possiede proprietà antinfiammatorie, ma che ha anche potenziali effetti deleteri sia nei confronti della cartilagine sia dell'osso subcondrale (Henrique M. Neueschwander, 2019).

Una sostanza recentemente utilizzata per le infiltrazioni intra-articolari nel cavallo è lo Stanozololo, un derivato sintetico del testosterone, che possiede effetti anabolici e androgenici; agisce tramite i recettori per gli androgeni, ma ha anche proprietà che favoriscono la riparazione tissutale ed effetti antidistrofici. Lo Stanozololo ha mostrato tramite studi *in vitro* la capacità di stimolare la produzione di ECM, mediante un meccanismo non ancora chiaro. Le sue proprietà antiinfiammatorie sono state dimostrate *in vitro*: riduce l'apoptosi condrocitaria mediante la riduzione della produzione di ossido nitrico e la stimolazione di IGF-1. Dagli studi di Falanga e colleghi è stato dimostrato che lo Stanozololo induce un aumento della produzione di collagene dose-dipendente da parte dei fibroblasti, mediante lo stimolo della sintesi di TGF- β 1. Infine, sono state dimostrate sperimentalmente anche proprietà condrogeniche: lo stanozololo promuoverebbe la proliferazione condrocitaria a livello articolare, grazie alla mediazione estrogenica (Riccardo Rinnovati, 2015).

Un nuovo approccio terapeutico venne introdotto nella pratica equina negli anni '90 e fu denominato "viscosupplementazione". L'acido ialuronico è il principale responsabile delle proprietà viscoelastiche del liquido sinoviale. L'acido ialuronico è anche una componente fondamentale della ECM e si lega con alta affinità ai recettori CD44 di membrana, espressi anche dai sinoviociti. Questi potrebbero modulare la risposta infiammatoria tramite diversi meccanismi, tra cui la *downregulation* della sintesi di prostaglandina E₂. È stato dimostrato da recenti studi che l'acido ialuronico con peso molecolare molto alto (HMW-HA) stimola i processi di guarigione, mentre quello con un peso molecolare molto basso (LMW-HA) causa infiammazione. Altman e colleghi hanno dimostrato che in vivo HMW-HA possiede maggiori effetti condroprotettori, antinfiammatori, meccanici e analgesici, inoltre attiva la sintesi di proteoglicani/glicosamminoglicani. (Henrique M. Neueschwander, 2019). Le infiltrazioni con acido ialuronico a basso peso molecolare o ad alto peso molecolare si pongono come obiettivo quello di ridurre l'infiammazione, proteggere l'articolazione e ridurre la sensibilità delle terminazioni nervose a livello della capsula articolare, tamponando la trasmissione della sensazione di dolore da parte dei nocicettori (Tytti M. Niemela, 2018).

Negli ultimi anni è in corso di studio anche l'utilizzo intra-articolare di idrogel di poliacrilamide al 4% come trattamento per l'osteoartrite. Il gel di poliacrilamide è una sostanza inerte, visco-elastica, non degradabile e non immunogena. È ancora poco studiato nella specie equina, ma potenzialmente utile a diminuire la zoppia derivante dall'osteoartrite. La viscosità del gel di poliacrilamide è simile a quella del liquido sinoviale a 37°C, perciò potrebbe correggere la sua diminuzione in corso di patologie. Inoltre, essendo la poliacrilamide non degradabile dalle metalloproteasi, i suoi effetti potrebbero risultare più duraturi rispetto a quelli dell'acido ialuronico, che invece aumenta la viscosità solo per un breve periodo. È possibile che la poliacrilamide vada anche a sostituire la perdita di lubrificina, riducendo così la perdita di lubrificazione articolare. (McClure S.R., 2017).

Tra i fattori di crescita utilizzati a scopo terapeutico il più studiato ad oggi è il PRP (*Platelet Rich Plasma*), che viene annoverato nel gruppo degli emocomponenti per uso non trasfusionale e definito come una frazione di sangue contenente una concentrazione di piastrine maggiore del normale. È un emocomponente di origine

autologa. La preparazione prevede il prelievo di sangue venoso e l'esecuzione di due centrifugazioni. Con la seconda centrifugazione si separano le piastrine, che vengono poi risospese in una piccola quantità di plasma per ottenere il PRP. Nel cavallo si usano concentrazioni di almeno 1 miliardo di piastrine per ml. Le piastrine contengono numerose proteine bioattive e fattori di crescita che hanno effetti positivi sulla guarigione dei tessuti, tra cui TGF- β 1, PDGF, FGF-2 e IGF-1. Il PRP può essere usato tal quale o può essere attivato per indurre la degranolazione delle piastrine e il rilascio dei mediatori bioattivi. Il PRP attivato può essere usato in forma liquida (infiltrazioni intra-articolari) o coagulata (gel piastrinico) (Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021). Le infiltrazioni di PRP in articolazione affette da OA hanno mostrato risultati migliori in termini di riduzione del dolore, funzionalità e qualità del tessuto rigenerato rispetto alle infiltrazioni di acido ialuronico o di corticosteroidi, in quanto il PRP inibisce i processi catabolici della formazione della cartilagine, mentre favorisce quelli anabolici, migliorando inoltre l'omeostasi e riducendo l'iperplasia della membrana sinoviale. La terapia permette infine un tempo di riabilitazione più breve e un ritorno all'attività sportiva di un maggior numero di individui. Il PRP può essere somministrato anche in associazione a MSCs/ASCs o BMC, per potenziare la rigenerazione, ma da alcuni studi sembrerebbe non apportare alcun beneficio ulteriore a quello già promosso dalle cellule staminali (Livia Roseti, 2019).

Un altro emocomponente molto utilizzato è il lisato piastrinico (PL), che si prepara come il PRP, ma seguito poi da un congelamento a -80°C per una notte e da uno scongelamento rapido a 37°C per causare uno shock termico e determinare la lisi delle piastrine. Può essere usato in clinica per infiltrazioni. (Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021)

6.4.2 Terapie chirurgiche

Gli interventi chirurgici vengono proposti nei pazienti sintomatici quando le terapie conservative risultano inefficaci. Tra i trattamenti chirurgici più popolari vi è il

lavaggio articolare per via artroscopica con *debridement* della cartilagine danneggiata. L'intervento dovrebbe alleviare i segni clinici tramite la rimozione dei detriti e delle citochine infiammatorie (Livia Roseti, 2019). L'artroscopia è divenuta la tecnica d'elezione nel trattamento di articolazioni medio-grandi, quali l'articolazione del carpo, metacarpo- metatarso-falangea e del ginocchio. L'artroscopia permette di evidenziare le strutture intra-articolari usando appositi strumenti chirurgici provvisti di visione ottica e ad oggi è una tecnica molto importante nella diagnostica delle patologie articolari dell'equino. Il vantaggio dell'artroscopia rispetto alle chirurgie tradizionali (artrotomia) risiede nella limitata ospedalizzazione del paziente e nel rapido ritorno alle competizioni sportive, a cui si aggiungono i bassi rischi di avere rigidità articolare nel post-operatorio e la possibilità di effettuare lavaggi articolari a cui si associa la rimozione di sostanze potenzialmente dannose. È noto che questo trattamento non provoca una reale rigenerazione della cartilagine ialina articolare, con una matrice contenente alte percentuali di collagene tipo II, ma nel migliore dei casi si forma una superficie fibrocartilaginea. Una considerazione differente va fatta per quanto riguarda piccole articolazioni, come l'articolazione interfalangea distale, o per quelle articolazioni il cui approccio chirurgico risulti più indaginoso. È importante enfatizzare che l'artroscopia può essere considerata molto utile per il trattamento delle patologie articolari del cavallo in quanto l'approccio convenzionale risulta difficoltoso e molto invasivo. L'utilizzo dell'artroscopia aumenta le probabilità di prognosi favorevole, in quanto si aumenta la precisione della valutazione delle strutture articolari. È importante anche ricordare che l'artroscopia permette di ottenere informazioni circa lo stato del tessuto e della struttura articolare, nonché della membrana sinoviale, che gioca un ruolo importante nella patofisiologia dell'osteoartrosi (A. Muttini, 2003).

L'artrodesi, intervento che si pone come obiettivo la fusione articolare, può essere applicata per aumentare la forza articolare e ridurre il dolore in ultima istanza. L'osteotomia coinvolge la rimozione di una piccola sezione di osso prossimalmente o distalmente all'articolazione. È finalizzata a scaricare l'area danneggiata, riducendo il dolore, e rallentando il processo degenerativo (Livia Roseti, 2019).

Tecniche di stimolazione del midollo osseo, come la perforazione meccanica dell'osso subcondrale (*Pridie drilling*), l'abrasione artroplastica o la creazione di

microfratture, consistono nella penetrazione dell'osso subcondrale per indurre emorragia e migrazione delle cellule staminali del midollo osseo verso il sito lesionato, al fine di formare un ematoma e successivamente un coagulo che possa riempire il difetto e che stimoli il naturale processo di riparazione (Andre F. Steinert, 2007). La riparazione tissutale che si ottiene da questo trattamento porta però alla formazione di tessuto fibrocartilagineo, che possiede proprietà meccaniche inferiori rispetto alla cartilagine (Livia Roseti, 2019). Questa procedura spesso riduce la sintomatologia dolorifica nel paziente e migliora la funzionalità articolare. Un altro approccio tentato è quello di cercare di promuovere la rigenerazione della cartilagine ialina mediante il trapianto di periostio, pericondrio o innesti osteocondrali (Andre F. Steinert, 2007).

7 Rigenerazione e riparazione del tessuto cartilagineo

Per rigenerazione si intende la sostituzione di un tessuto danneggiato con la stessa tipologia di tessuto, nonché il ripristino delle sue funzioni. Tale processo dipende dalla proliferazione di cellule per sostituire il tessuto danneggiato. Il potenziale proliferativo e differenziativo di un determinato tessuto dipende dalle cellule staminali presenti in esso. Quando vengono liberati segnali e fattori di crescita, queste cellule possono uscire dalla fase di quiescenza (G0) e rientrare nel ciclo cellulare replicativo in fase G1. La possibilità di ottenere una rigenerazione naturale dipende dalla quantità di tessuto danneggiato e dall'integrità dello stroma connettivale (Ronald K. Myers, 2017). Grazie a questo processo non si formano tessuti cicatriziali.

Per riparazione invece si intende la sostituzione del tessuto perso o danneggiato con uno sostitutivo di tipo cicatriziale, che altera permanentemente le normali funzioni e strutture del tessuto originale. Il processo di riparazione cura i principali tipi di danni, può ripristinare alcune delle strutture originali del tessuto danneggiato, ma può anche provocare anomalie strutturali che compromettono le funzioni organiche (Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021).

I fattori coinvolti durante il processo di rigenerazione sono:

1. HIF-1 α ed *Early Growth Response factor 1* (EGR-1): sono fattori indotti dall'ipossia che stimolano l'inizio del processo rigenerativo. Aumentano l'espressione di enzimi glicolitici, citochine, metallotioneine e VEGF (Ernestina Schipani, 2001);
2. TGF- β : favorisce la sintesi del collagene e il rimodellamento del tessuto connettivo; (Ronald K. Myers, 2017);
3. FGF: stimola l'angiogenesi (Ronald K. Myers, 2017).

Il potenziale rigenerativo del tessuto cartilagineo viene studiato in modo molto approfondito sia per ottenere la riparazione delle cartilagini patologiche e danneggiate sia per il suo utilizzo nell'ingegneria tissutale (Tuan, 2004).

Secondo gli studi riportati da Tuan e colleghi (2004) le cellule staminali mesenchimali che vanno incontro a rigenerazione nei tessuti di soggetti adulti dovrebbero idealmente ripercorrere gli stessi eventi che avvengono durante lo sviluppo embrionale; lo stesso dovrebbe valere nelle colture cellulari, nel caso si tratti di tessuti ingegnerizzati. Questi eventi dovrebbero indurre la medesima differenziazione e dare così origine a tessuti rigenerati che possiedono la stessa morfologia cellulare e la stessa attività del tessuto originale (Tuan, 2004).

La rigenerazione tissutale della cartilagine mostra molti aspetti in comune con la condrogenesi, soprattutto a livello cellulare, in quanto dipende dalle cellule progenitrici: le cellule mesenchimali staminali (MSCs), che possiedono la capacità di differenziarsi in condrociti, osteoblasti, adipociti, fibroblasti, midollo osseo e altri tessuti di origine mesenchimale. Le MSCs risiedono in diverse nicchie tissutali dell'organismo del soggetto adulto e hanno la capacità di rigenerare specifiche cellule per questi tessuti. Alcuni siti di localizzazione delle cellule staminali mesenchimali sono: adipociti, periostio, membrana sinoviale, muscoli, derma, sangue, midollo osseo, e, di più recente scoperta, osso trabecolare, placenta e cordone ombelicale (Tuan, 2004).

Il successo della rigenerazione dipende dall'efficienza del processo di replicazione della struttura e del *pattern* del tessuto originale. Questa è una sfida che si apre nello scenario di una cartilagine articolare danneggiata che va incontro a cicatrizzazione, perché il tessuto di riparazione necessario a realizzare la struttura di ciascuno dei diversi strati cartilaginei (superficiale, intermedio e profondo) dovrebbe avere la capacità di esprimere diversi fenotipi cellulari e diverse composizioni della ECM, ciascuno peculiare del proprio strato (Tuan, 2004).

Capire le basi dei meccanismi di morfo-regolazione è di fondamentale importanza nella rigenerazione tissutale, perché l'obiettivo finale dei tessuti ingegnerizzati basati sull'utilizzo di linee cellulari è quello di produrre tessuti che siano strutturalmente e funzionalmente identici a quelli originali (Tuan, 2004).

La cartilagine articolare quando è sottoposta a una patologia subisce frequentemente delle lesioni, ma possiede una capacità molto limitata di autorigenerazione. In caso di difetti condrali, in cui la lesione è contenuta nello spessore della cartilagine articolare, non vi è il coinvolgimento del sistema vascolare. Di conseguenza le cellule progenitrici presenti nel sangue e nel midollo osseo non possono raggiungere l'area lesionata per influenzare o contribuire al processo rigenerativo. I condrociti articolari residenti non sono in grado di migrare verso il sito della lesione e hanno inoltre una limitata abilità di produrre sufficiente ECM. Per questi motivi il difetto non può essere riempito o riparato ed essenzialmente resterà tal quale in modo permanente. Nei difetti osteocondrali, la cartilagine subisce un danno sia a livello condrale sia osseo. Questo causa la rottura dei vasi sanguigni, fino alla penetrazione del midollo osseo. In questo caso viene stimolata una risposta riparativa, che generalmente inizia con la formazione di un ematoma, conseguenza della perdita ematica dei vasi danneggiati. La rete di fibrina intrappola le piastrine, che rilasciano vari fattori bioattivi, tra cui il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il TGF- β , che stimolano l'invasione vascolare e la migrazione delle MSCs. Dopo diversi giorni dalla lesione, le cellule progenitrici proliferano e possono differenziarsi in condrociti che sintetizzeranno la matrice. Il tessuto che ne risulta, comunque, risulta essere scarsamente organizzato e contiene quantità significative di collagene tipo I. Questo tessuto fibrocartilagineo ha capacità meccaniche inferiori rispetto a quello cartilagineo e tende a rompersi con il tempo e sotto il carico pressorio, frammentandosi o disintegrandosi (Andre F. Steinert, 2007).

L'architettura altamente specializzata e le limitate capacità riparative della cartilagine articolare, insieme alle elevate esigenze meccaniche, rendono estremamente difficile il suo trattamento medico. Ad oggi non esistono ancora agenti farmacologici che promuovano la guarigione completa delle lesioni a carico della cartilagine articolare (Andre F. Steinert, 2007).

Il motivo principale della limitata capacità rigenerativa della cartilagine sembra essere la natura avascolare del tessuto stesso e l'impossibilità di formare il coagulo, che sta alla base del processo di guarigione. La riparazione intrinseca della cartilagine non segue gli *steps* generali che avvengono solitamente negli altri

tessuti, ossia necrosi, infiammazione, riparazione e rimodellamento. I condrociti maturi hanno anche un potenziale proliferativo limitato e una minore capacità di produrre ECM per riempire il difetto. Inoltre, vengono mobilitate diverse tipologie cellulari dopo che si instaura una lesione articolare che possono produrre matrice, ma essa sarà morfologicamente e meccanicamente diversa, nonché meno funzionale dell'originale. Le lesioni cartilaginee possono essere distinte in lesioni a spessore limitato, nelle quali la lesione non penetra fino all'osso subcondrale, ma non si risolve spontaneamente, e lesioni a tutto spessore, le quali penetrano fino all'osso subcondrale e in cui si ha un parziale potenziale riparativo, a seconda delle dimensioni e della localizzazione del difetto. È stato osservato che le cellule adiacenti ai margini della lesione vanno incontro a morte, ma si ha un aumento di proliferazione cellulare, formazione di *clusters* condrocitari e sintesi di nuova matrice, anche se il processo non riesce a riparare efficacemente il difetto. È stato inoltre documentato che le cellule provenienti dalla sinovia possono migrare nella lesione in presenza di fattori di crescita e che possono riempire il difetto con tessuto rigenerato. Una riparazione migliore si ottiene quando la lesione è parallela alla direzione del movimento articolare anziché quando è perpendicolare a esso. Il potenziale riparativo nelle lesioni a tutto spessore è dovuto all'interessamento dell'osso subcondrale, che permette l'afflusso di sangue e di cellule mesenchimali staminali, nonché la formazione dell'ematoma e del coagulo, in cui si accumulano piastrine, eritrociti e leucociti. Si è visto, ad esempio, che lesioni a tutto spessore di dimensioni inferiori ai 3 cm portano a rigenerazione spontanea. Ciò nonostante, le cellule mobilitate a formare il coagulo non sono in grado di rigenerare la cartilagine ialina originale, ma producono tessuto fibrocartilagineo, composto in proporzione da più collagene tipo I e tipo II e meno proteoglicani rispetto al tessuto cartilagineo, rendendolo meno funzionale. Ad oggi sono in corso di studio diverse tecniche chirurgiche per simulare lesioni a tutto spessore, tra cui la creazione di microfratture che penetrino fino all'osso subcondrale e che permettano la formazione dell'ematoma e la mobilitazione di cellule al sito lesionato. Nonostante lo studio di nuove terapie, ad oggi, l'impianto di condrociti autologhi rimane l'unico trattamento di medicina rigenerativa approvato dal "US Food and Drug Administration". Queste tecniche non sono ancora in grado di restaurare completamente tutto il tessuto, ma producono tessuto fibrocartilagineo, che ha capacità di resistenza ai carichi e al movimento articolare inferiore rispetto alla cartilagine (Camila B. Carballo, 2017).

8 La medicina rigenerativa come nuova opzione terapeutica per il trattamento dell'osteoartrite

Negli ultimi anni le strategie di medicina rigenerativa sono state studiate come un'alternativa ai metodi tradizionali, ponendosi come obiettivo quello di creare un nuovo tessuto che possieda caratteristiche il più simili possibili a quelle della cartilagine naturale. Dato che la composizione e l'architettura di un tessuto sono strettamente connesse alla sua funzione, l'abilità di ricreare le strutture è essenziale per permettere la rigenerazione. La medicina rigenerativa si propone di riparare, rigenerare e rimpiazzare cellule, tessuti o organi per restaurarne la struttura e le funzioni fisiologiche compromesse da lesioni, traumi, difetti congeniti o senilità. La rigenerazione della cartilagine articolare, tuttavia, rimane una delle sfide principali in campo ortopedico. Il problema principale risiede nell'avascolarità del tessuto, che limita l'infiltrazione delle cellule progenitrici e l'istaurarsi del processo rigenerativo. Quando il danno coinvolge anche l'osso subcondrale il processo riparativo inizia grazie alle cellule mesenchimali staminali di derivazione midollare, ma il tessuto risultante rimane fibrocartilagineo, un tessuto troppo povero rispetto alla cartilagine ialina. Inoltre, l'ambiente infiammatorio di un'articolazione danneggiata gioca un ruolo importante nell'influenzare il potenziale riparativo. L'approccio terapeutico degli innesti osteocondrali consiste nel ricercare di rimpiazzare l'area di tessuto danneggiato con tessuto osseo e cartilagineo autologo (mosaicoplastica) o allogenico (allograft). La tecnica presenta però dei problemi legati alla delicatezza del tessuto presente nel sito donatore, al fallimento degli innesti autologhi e alla possibile trasmissione di patologie in quelli allogenici. Più di recente sono state sviluppate strategie rigenerative che utilizzano una combinazione di diverse tecnologie che hanno portato allo sviluppo di diverse soluzioni terapeutiche e metodologie: terapia cellulare, ingegneria tissutale e terapia genica (*Figura 6*) (Livia Roseti, 2019).

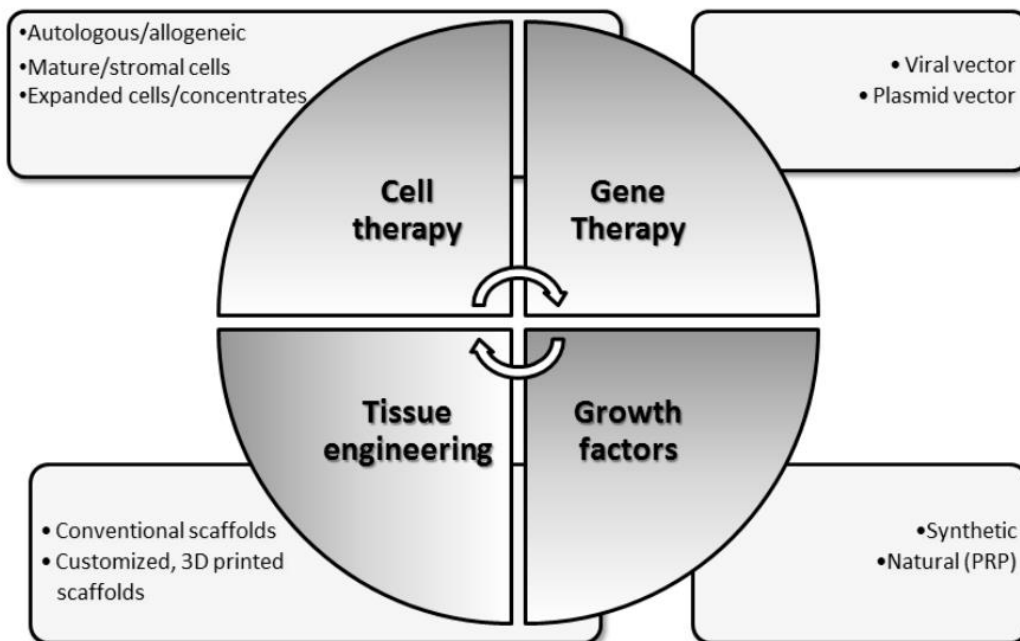


Figura 6: Rappresentazione grafica delle diverse strategie di medicina rigenerativa utilizzate nel trattamento dell'osteoartrosi (Livia Roseti, 2019).

8.1 Terapia cellulare

La terapia cellulare è un trattamento clinico che consiste nell'iniezione, innesto o impianto di cellule previamente manipolate *ex vivo*. L'inoculo può essere locale o sistemico, singolo o multiplo. Le cellule possono essere di origine autologa, il che evita eventuali risposte immunitarie e trasmissione di patologie, o allogenica (da donatori *in vivo* o *post mortem*), per massimizzarne la disponibilità. Le cellule possono essere espanse in coltura oppure no (concentrati). La scelta della popolazione cellulare migliore da usare per ricercare la rigenerazione della cartilagine resta tuttora una sfida. Idealmente la tipologia cellulare da usare dovrebbe essere: vitale, disponibile e facilmente accessibile, non immunogenica, non cancerogena, fenotipicamente stabile e responsiva ai fattori bioattivi (Livia Roseti, 2019).

8.2 Terapia genica

Negli ultimi anni si è visto un aumento degli studi condotti sulla genomica nell'osteoartrite. È diventato chiaro che alcuni geni, ciascuno con piccoli effetti, contribuiscano al rischio, sviluppo e progressione della patologia. L'origine multifattoriale e la natura localizzata dell'OA la rendono una candidata ideale per la terapia genica. Per terapia genica si intende un processo che sfrutta l'introduzione di materiale genomico (trans-geni) in specifiche cellule *target*, con lo scopo di correggere un'anomalia esistente o di fornire nuova funzionalità. Nel contesto delle patologie articolari il trasferimento dei geni può essere condotto in due modi diversi: mediante infiltrazioni intra-articolari o iniezioni intravenose o mediante l'isolamento delle cellule dal paziente e loro introduzione in un vettore. (Livia Roseti, 2019).

8.3 Ingegneria tissutale

Sia la terapia cellulare sia l'ingegneria tissutale vedono potenziati i loro effetti grazie all'aggiunta di fattori di crescita che stimolino il processo rigenerativo. L'emergenza dell'ingegneria tissutale ha dato grande speranza nel campo medico-scientifico e i suoi principi possono essere sfruttati per il trattamento delle lesioni cartilaginee (Livia Roseti, 2019).

L'ingegneria tissutale è un campo che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze verso lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinano, mantengono o migliorano la funzione dei tessuti. Grazie a questa nuova tecnica si possono creare strutture cellulari bidimensionali, tridimensionali o organoidi. I prodotti che derivano dall'ingegneria tissutale contengono o consistono in cellule o tessuti, vitali o non vitali, di origine umana o animale, in grado di sopperire alle necessità cliniche di riparazione e rigenerazione tissutale. Il prodotto può anche contenere sostanze supplementari, quali prodotti cellulari, biomolecole, biomateriali, sostanze chimiche, *scaffold* o matrici (Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021).

L'ingegneria tissutale è una tecnica promettente da utilizzare per ottenere la rigenerazione della cartilagine. La motivazione principale che ha portato a cercare nuove tecniche per riparare la cartilagine risiede nella sua incapacità di autorigenerarsi, a causa dell'assenza di vasi sanguigni. Comprende quattro elementi fondamentali, che portano alla formazione di tessuto *in vitro*: cellule, fattori di crescita, *scaffolds* e proprietà meccaniche (Yaima Campos, 2019).

8.3.1 Cellule

La fonte cellulare più adatta per l'ingegneria tissutale è quella che si può facilmente isolare ed espandere, sintetizzando le componenti della ECM. Le cellule utilizzate nell'ingegneria tissutale possono essere estratte direttamente dalla cartilagine (condrociti) o possono essere ottenute dal differenziamento delle MSCs estratte da vari tessuti mesenchimali e successivamente trattate con fattori di crescita. Il differenziamento delle MSCs nella linea condrocitaria, però, è molto complesso, perciò si è preferito optare inizialmente per l'utilizzo dei condrociti maturi. I condrociti sono una tipologia di cellule invitante da utilizzare negli *scaffolds*, perché producono ECM e permettono la formazione di collagene tipo II (Yaima Campos, 2019). La matrice extracellulare va infatti ottenuta dallo stesso tessuto di origine o decellularizzata per evitare reazioni immunologiche ed è essenziale in quanto dà supporto alle cellule, regolarizza la polarità, la divisione cellulare, l'adesione e la motilità e viene coinvolta nello sviluppo dei tessuti attraverso la migrazione cellulare, la differenziazione e il trasporto dei fattori di crescita (Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021). Queste cellule possono essere poi collezionate da regioni di cartilagine articolare sana e non soggetta a carico pressorio, per poi essere coltivate ed espanse *in vitro*. Ciò nonostante, questa procedura è soggetta a inconvenienti: quando i condrociti passano a un ambiente bidimensionale, possono perdere il loro fenotipo e differenziarsi in altre tipologie cellulari, come fibroblasti. Per la produzione di cartilagine ialina è imperativo che i condrociti mantengano il loro fenotipo e che non producano collagene tipo I. inoltre, i condrociti di soggetti anziani riducono l'attività biosintetica e mitotica, hanno una più debole risposta ai fattori di crescita e

producono meno aggregano, che risulta essere anche meno uniforme (Yaima Campos, 2019).

8.3.1.1 Trapianto di condrociti autologhi (ACI)

Il trapianto di condrociti autologhi è una procedura che è stata sviluppata e usata clinicamente già dalla fine degli anni '90 per trattare i difetti più estesi della cartilagine. Ciò nonostante, per la prima generazione di condrociti autologhi sono stati riportati diversi effetti avversi, tra i quali il fallimento dell'innesto, l'ipertrofia tissutale e lo svilupparsi di condromalacia. Per superare alcune di queste complicazioni, le moderne modificazioni della procedura hanno incluso l'imbibizione dei condrociti in una matrice tridimensionale prima dell'innesto nel difetto cartilagineo. Gli ostacoli biologici alla formazione di nuova cartilagine ialina comprendono: insufficiente differenziamento, perdita delle cellule o del tessuto innestato e fallimento nell'integrazione (Andre F. Steinert, 2007).

I condrociti sono state le prime cellule utilizzate nell'ingegneria tissutale da applicare alla cartilagine in quanto si ritrovano nel tessuto stesso. L'impianto di condrociti autologhi è una procedura che consiste nella rimozione, mediante biopsia, di una piccola quantità di cartilagine (200/300 mg) proveniente dalle aree di minor carico, seguita dall'isolamento enzimatico dei condrociti, coltura *in vitro* in monostrato dei condrociti per 2-3 settimane e poi dalla raccolta tramite sospensione e dal trapianto. La sospensione può essere iniettata nel difetto mediante una lamina di periostio oppure mediante una membrana ingegnerizzata di collagene. ACI è diventata una terapia molto applicata nel trattamento di lesioni cartilaginee in pazienti giovani sintomatici, ma, inizialmente, la presenza di osteoartrite rappresentava una controindicazione per il suo utilizzo, in quanto il microambiente degenerato poteva causare ai condrociti innestati un de-differenziamento indesiderato o indurre apoptosi. Dagli studi di Minas e colleghi, però, si è evidenziata la riduzione del dolore e un aumento della funzionalità articolare anche in soggetti con OA, ipotizzando che l'utilizzo della tecnica ACI fosse possibile anche in questi pazienti. L'avvento dell'ingegneria tissutale ha rappresentato una possibilità di superare le complicazioni della tecnica ACI, quali l'ipertrofia della lamina periostale, la delaminazione, la calcificazione e la perdita cellulare nello spazio articolare. Inoltre,

la coltura in monostrato tende a causare la perdita delle caratteristiche condrocitarie, favorendo il differenziamento in fibroblasti che porta a una biomeccanica non ottimale. Un importante aiuto è stato dato dalla possibilità di effettuare i trapianti mediante artroscopia o piccole incisioni, così da rendere la procedura meno invasiva, ma comunque esistono altri problemi legati alla tecnica stessa. Infatti, nella tecnica tradizionale, è richiesto un doppio intervento, la biopsia e l'impianto dei condrociti in sospensione, e una doppia ospedalizzazione che fanno aumentare i rischi per il paziente. In aggiunta, la fase di espansione è di lunga durata e deve essere condotta rigorosamente, seguendo i requisiti della *Good manufacturing practice* (GMP). Esistono anche impianti di condrociti autologhi matrice-indotti, di nuova generazione, che comprendono la semina di condrociti espansi *in vitro* in *scaffold* tridimensionali (3D) o matrici (Livia Roseti, 2019); in questo modo si evita la morbidità del sito donatore e si previene la dedifferenziazione dei condrociti in coltura. I vantaggi dell'uso degli *scaffold* risiedono nella possibilità di fungere da barriera nei confronti dell'impianto e di impedire così che si formi tessuto fibrotico intorno. Il tessuto ingegnerizzato viene poi tagliato della dimensione del difetto e impiantato con colla di fibrina per essere fissato. Questo approccio ha mostrato miglioramenti clinici significativi e non ha evidenziato effetti avversi. I vantaggi di questa tecnica includono la possibilità di svolgere l'impianto mediante artroscopia, bypassando l'utilizzo del foglio di periostio e di suture fissanti. L'avvento degli *scaffold* 3D ha permesso inoltre di riprodurre la ECM, consentendo così di avere un supporto per il tessuto (Livia Roseti, 2019).

8.3.1.2 Terapia con cellule staminali mesenchimali (MSCs)

A causa di alcune limitazioni degli *scaffold* a base di condrociti autologhi, quali la scarsa disponibilità delle cellule e l'instabilità del mantenimento del fenotipo nei condrociti in coltura, si sono iniziate a studiare altre tipologie cellulari e, in particolare, le cellule staminali mesenchimali di diverse origini. Le MSCs adulte hanno suscitato interesse nella medicina rigenerativa da quando sono state identificate in nicchie di molti tessuti, inoltre sono semplici da isolare e non implicano problemi etici. Come strumento terapeutico possono essere applicate o in seguito alla differenziazione o direttamente nel sito danneggiato (Centro di Referenza per i

metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021). Le prime MSCs considerate adatte per i trattamenti rigenerativi sono state quelle presenti nel midollo osseo. Inizialmente hanno dimostrato ottime proprietà di aderenza alle superfici plastiche, capacità di proliferare in colture monostrate e di mantenere la multipotenza *in vitro*; per ultimo, ma non meno importante anche la capacità di effettuare la condrogenesi. Normalmente, affinché il trattamento sia efficace anche in difetti più grandi o si possa effettuare più volte è necessaria l'espansione in coltura delle MSCs estratte dal midollo osseo, in quanto sono presenti in quantità limitate. Oltre alle MSCs del midollo osseo sono state prese in considerazione anche le cellule staminali derivanti dal tessuto adiposo sottocutaneo (ASCs o ADSCs), in quanto possiedono caratteristiche e funzioni simili alle MSCs, ma sono presenti in percentuali maggiori (5%, in comparazione allo 0,01% delle MSCs) e possono essere isolate con procedure meno invasive e a costi inferiori. L'approccio più usato nella pratica clinica ortopedica è quello di sfruttare i concentrati, mediante l'aspirazione del midollo osseo (BMC) e l'aspirazione della frazione vascolare stromale (SVF) dal tessuto adiposo che comprende cellule staminali, fattori di crescita ed ECM. Si possono ottenere con una minima manipolazione, senza la necessità di isolare ed espandere le cellule e con la possibilità di impiantarle immediatamente nel paziente. I concentrati possono essere usati da soli, o più frequentemente, con adiuvanti, come il plasma ricco di piastrine (PRP). Da studi clinici è stata riportata la sicurezza di queste tecniche e alcuni miglioramenti della funzionalità della cartilagine (Livia Roseti, 2019). Ciò nonostante la migrazione delle MSCs in un'articolazione affetta da OA è abbastanza scarsa (Vitor Hugo Dos Santos, 2019).

8.3.2 Scaffold

Gli *scaffolds* sono materiali progettati per provocare interazioni cellulari, fungono da supporto meccanico e anche come veicolo di stimolazione cellulare, al fine di formare nuovi tessuti funzionali. I supporti possono essere di materiale sintetico, come propilene, poliestere e poliammide, o naturali, come collagene, gel di fibrina e acido ialuronico. I fattori di crescita, legati a questo supporto, permettono la

crescita e il differenziamento del tessuto. I biomateriali devono essere biocompatibili, porosi, atossici, sterilizzabili, maneggevoli chirurgicamente e riassorbibili per essere rimpiazzati poi dalla matrice prodotta dalle cellule e favorire la migrazione cellulare. Generalmente si preferiscono i biomateriali per la costruzione di *scaffold* impiegati nella rigenerazione cartilaginea, grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, tuttavia i vantaggi di controllo delle proprietà meccaniche dei materiali artificiali sono maggiori. Esistono anche materiali di terza generazione, che associano materiali di sintesi con molecole rigeneratrici (biomateriali *smart*) e sono in grado di modificare le loro proprietà a seconda dell'ambiente esterno (Yaima Campos, 2019). Gli *scaffolds* agiscono non solo come un substrato per l'adesione cellulare, ma sono anche progettati per riprodurre il più fedelmente possibile la struttura della ECM e per mantenere un microambiente appropriato per la crescita cellulare e il differenziamento dei condrociti. Permettono una migliore e più stabile distribuzione delle cellule nello spazio, evitando la loro dispersione nello spazio articolare. Gli *scaffolds* differiscono per origine, composizione, struttura e stato, ma devono essere tutti in grado di trasportare le cellule da impiantare e di mantenerne il fenotipo (Livia Roseti, 2019). Gli *scaffolds* servono per dirigere la crescita delle cellule, offrire un substrato di adesione alle cellule dipendenti dall'ancoraggio, fornire cellule con un elevato potenziale di caricamento ed elevata efficienza ai siti specifici (matrici). Gli *scaffolds* utilizzati per l'ingegneria tissutale cartilaginea si basano su carboidrati (alginato, agarosio, acido ialuronico, acido poliglicolico e polilattico) e proteine (collagene e gelatina). I fattori di crescita sono usati per stimolare lo sviluppo delle cellule che saranno impiantate negli *scaffolds* e che dovranno mantenere il loro fenotipo corretto. L'obiettivo finale è quello di mimare la struttura e la funzione del tessuto originario, perciò gli *scaffolds* usati per rigenerare la cartilagine deve essere in grado di permettere la crescita e la proliferazione dei condrociti o MSCs, nonché garantirne il movimento al suo interno e mostrare proprietà meccanica simili a quelle della cartilagine ialina. Un altro fattore cruciale da considerare include la possibile degradazione degli *scaffolds* da parte del pH locale. È necessario che gli *scaffolds* siano robusti abbastanza da sopportare il carico meccanico a cui sono sottoposte le superfici articolari interessate. Una volta impiantato, lo *scaffold* deve rimanere *in situ*, infatti se viene dislocato le cellule e i fattori di crescita che trasporta saranno di minima utilità. Garantire che gli *scaffolds* cartilaginei persistano abbastanza a lungo da essere

rimpiazzati da neocartilagine è molto complicato, in quanto i *devices* devono adempiere alle richieste di due tessuti differenti: osso e cartilagine. L'osso tollera bene i dispositivi anche per lunghi periodi, ma se non si rigenera velocemente, la cartilagine sottoposta a un carico eccessivo non riuscirà a ripararsi correttamente. Infine, gli *scaffolds* per uso articolare devono possedere un'alta porosità per permettere l'adesione e la proliferazione cellulare, la produzione di ECM e le interazioni che favoriscono gli scambi di nutrienti. (Yaima Campos, 2019).

8.3.2.1 Configurazione degli scaffold

I materiali utilizzati per realizzare gli *scaffold* includono polimeri naturali, proteine, carboidrati e idrogel in quanto sono sostanze biocompatibili, biodegradabili e aiutano a mantenere il dispositivo *in situ* (Yaima Campos, 2019).

Di seguito, si elencano i principali materiali che possono essere scelti, da soli o in associazione, per produrre *scaffolds* impiegati nella rigenerazione della cartilagine articolare:

- **Acido ialuronico:** essendo un componente fondamentale della matrice della cartilagine è stato molto studiato per produrre *scaffold* che potessero riparare danni cartilaginei (Yaima Campos, 2019);
- **Collagene:** gli *scaffolds* di collagene possiedono alcuni vantaggi rispetto agli altri: per esempio, favoriscono il contatto tra le cellule trapiantate e quelle endogene localizzate nell'articolazione, nonché la proliferazione e la differenziazione cellulare. Questa tipologia di *scaffold* è stata ampiamente utilizzata anche nel cavallo (Yaima Campos, 2019);
- **Chitosano:** i proteoglicani e i glicosamminoglicani presenti nella cartilagine possiedono cariche negative e partecipano alle interazioni elettrostatiche con il chitosano, che invece possiede cariche positive. Questo fenomeno è estremamente importante per la conservazione e la concentrazione dei fattori di crescita nel sito di impianto, in quanto i fattori di crescita sono relazionati ai glicosamminoglicani (Yaima Campos, 2019);

- Alginato: l'alginato è un polimero naturale con carica negativa. È abbondante nelle alghe, da cui viene estratto. Grazie al fatto che è biocompatibile, l'alginato è comunemente usato per produrre *scaffold* per la semina di cellule. La sua carica negativa aiuta il mantenimento delle strutture tridimensionali, perché un'alta densità di cariche negative promuove l'adesione cellulare, però viene degradato lentamente (Yaima Campos, 2019);
- Elastina: l'elastina è una proteina che apporta forza e flessibilità al tessuto connettivo di cartilagine, legamenti e cute. Questi *scaffold* sono in grado di formare un reticolato di elastina che stabilizza le strutture con le molecole circostanti (Yaima Campos, 2019);
- Acido polilattico (PLA): l'acido polilattico è un polimero biodegradabile, formato a partire dall'acido lattico. Gli *scaffold* di acido polilattico possiedono proprietà meccaniche che assicurano l'ancoraggio del dispositivo al sito di impianto (Yaima Campos, 2019);
- Acido poliglicolico (PGA): questi polimeri sono tutti degradati tramite idrolisi. PGA è più cristallino e meno idrofobico del PLA, è degradato più velocemente e possiede un'elevata porosità. Le proprietà meccaniche di questi *scaffold* assomigliano molto a quelle del tessuto originario (Yaima Campos, 2019);
- Copolimero PGLA: è dato dalla combinazione di acido polilattico e poliglicolico per sfruttare al massimo le proprietà di ognuno. È altamente biocompatibile, possiede ottime proprietà meccaniche e una degradazione controllabile in base alla proporzione di entrambi i polimeri. È adatto alla condrogenesi delle cellule staminali derivanti dal tessuto adiposo e può essere trattato con fattori di crescita per migliorare la differenziazione condrogenica delle MSCs del midollo osseo (L. Zhang, 2009).

Il tipo di architettura degli *scaffold* è fondamentale per permettere una forte adesione delle cellule al biomateriale, favorendo la proliferazione e apportando proprietà meccaniche (Yaima Campos, 2019). Di seguito, un breve elenco delle architetture più studiate:

- *Scaffold* porosi: è molto importante considerare la grandezza dei pori in essi presenti, in quanto influenza la migrazione delle cellule e il rilascio di ossigeno, nutrienti e prodotti del catabolismo. Un materiale poroso può anche favorire l'integrazione dell'impianto al tessuto, aumentando la stabilità meccanica (L. Kock, 2012);
- Idrogel: nell'idrogel i condrociti non risultano adesi alla superficie dello *scaffold*, ma sono incapsulati, in quanto la morfologia stessa dello *scaffold* contribuisce a mantenere il fenotipo condrogenico evitando il fenomeno della de-differenziazione (S-H Lee, 2007);
- *Scaffol* nanostrutturali: i nanomateriali possiedono ottime capacità di stimolazione condrocitaria (Yaima Campos, 2019).

Sono stati studiati per le loro proprietà meccaniche sia *scaffold* monostrato sia multistrato. Gli *scaffold* multistrato promuovono maggiormente la crescita cellulare, guidano la rigenerazione dell'osso, ma stimolano anche la calcificazione della cartilagine. Offrono altri vantaggi in quanto richiedono una popolazione di condrociti inferiore rispetto agli *scaffold* tradizionali monostrato, sono più simili alla natura complessa della cartilagine e mimano meglio le proprietà meccaniche del tessuto in ogni suo strato (Yaima Campos, 2019).

La configurazione degli *scaffold* va a definire la forma che avrà il tessuto. Le cellule coltivate in laboratorio in ambiente controllato devono essere propagate in un terreno che riproduca il loro ambiente di crescita naturale. Ad oggi le cellule possono essere coltivate su due sistemi diversi: *scaffold* bidimensionali (2D) o *scaffold* tridimensionali (3D). Le colture bidimensionali riflettono per solo parzialmente le condizioni delle cellule *in vivo*, perché queste possiedono contatti e interazioni con la matrice extracellulare, che ne determina l'espressione di recettori, apoptosi e altre funzioni, che non si possono riprodurre *in vitro*. (Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021) Gli *scaffold* 3D sono sistemi che mimano maggiormente l'ambiente di crescita cellulare in modo ottimale, in quanto la maggior parte dei tessuti si sviluppa sulle tre dimensioni (S-H Lee, 2007). In questi sistemi la cinetica di crescita, morfologia ed

espressione recettoriale è più rispettata rispetto a quelli in 2D. Il sistema *in vitro*, così, diventa il più vicino possibile alle condizioni presenti *in vivo*, per simulare in toto la risposta che l'organismo avrebbe all'evento. I sistemi 3D permettono di avere un modello più complesso, mantenendolo comunque controllabile e modulabile. (Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 2021).

Nel caso della cartilagine un sistema 3D serve a prevenire la de-differenziazione dei condrociti che spesso avviene nelle colture in 2D. Le tecniche di fabbricazione degli *scaffold* tridimensionali con elevata porosità e una grande superficie sono varie. Una tecnica 3D di recente sviluppo, ad esempio, è quella del *bioprinting* o stampa 3D, che tramite l'impiego di *softwares* e *hardwares* progetta e produce strutture o tessuti ingegnerizzati. Questa nuova tecnica è un metodo che potenzialmente migliora le proprietà biologiche degli *scaffold* utilizzando un bio-inchiostro di alginato come *microcarrier* per trasportare le particelle biologicamente attive che stimolano l'adesione e la differenziazione cellulare (A.R. Armiento, 2018).

8.3.3 Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche, come compressione, sollecitazione promossa dal fluido sinoviale e pressione idrostatica devono essere considerate quando viene costruito un sistema per una completa sostituzione funzionale della cartilagine articolare. Le similitudini nelle proprietà meccaniche tra il materiale innestato e il tessuto originale sono cruciali per la funzionalità della nuova cartilagine. Quando si riesce a mantenere il fenotipo condrocitario *in vitro* la cartilagine riesce ad essere rigenerata semplicemente usando una combinazione appropriata da *scaffold* e cellule. Per un impianto *in vivo*, però, il materiale deve generare il fenotipo corretto restando permanentemente *in situ* e subendo i carichi meccanici indirizzati all'articolazione. Ad esempio, il solo camminare porta la cartilagine articolare a sostenere una miriade di forze cicliche, tra cui la pressione idrostatica, perciò va considerato che i condrociti vivono costantemente sotto pressione (Yaima Campos, 2019).

9 L'uso dei condrociti nella riparazione della cartilagine

Le strategie per la riparazione della cartilagine articolare si sono basate sull'utilizzo di due tipologie cellulari, i condrociti maturi e le MSCs. Il progetto verte sull'utilizzo dei condrociti e sui migliori sistemi colturali e condizioni ambientali che permettano di mantenere il loro differenziamento fenotipico. Ad oggi le difficoltà riscontrate nell'utilizzo dei condrociti maturi sono innanzitutto la loro disponibilità limitata nei siti donatori, la bassa resa dei condrociti isolati da tessuto autologo (1-5% del volume tissutale totale) e la mancanza di protocolli ottimali per la loro coltura ed espansione *in vitro* al fine di ridurre lo stato di de-differenziazione, che esita in un fenotipo fibroblastico. Durante la propagazione in sistemi monostrato la sintesi del collagene tipo II e dell'aggrecano, tipicamente molto espressi nella cartilagine ialina, si riduce, mentre aumenta la produzione di collagene tipo I e versicano. Questi cambiamenti fenotipici si associano a un'alterata organizzazione dei microfilamenti e delle fibre durante il passaggio dalla situazione tridimensionale della ECM *in vivo* a quella bidimensionale dei sistemi plastici *in vitro*. È stata quindi considerata l'importanza di avere un ambiente 3D per supportare il mantenimento del fenotipo condrocitario e si stanno studiando appositi *scaffold* biologici tridimensionali, adatti a questo scopo (A.R. Armiento, 2018).

Per sopperire a uno dei problemi del trapianto di condrociti autologhi, la poca disponibilità, si è optato anche per l'utilizzo di trapianti di condrociti allogenici, per permetterne l'impiego in difetti più ampi. Ciò nonostante, questa procedura non riesce ancora a risolvere le complicazioni legate alla mancanza di corrispondenza tra l'innesto e l'impianto e, in aggiunta, può portare alla possibilità di avere reazioni immunitarie da parte dell'ospite. Come alternativa per superare questo problema è stata adottata la mosaicoplastica, ma solo per il trattamento di difetti medio-piccoli. Nonostante i diversi problemi che ancora esistono il trapianto di condrociti autologhi è ritenuto il *gold standard* per la riparazione di grandi difetti nella cartilagine articolare (A.R. Armiento, 2018).

Nel corso degli anni sono state apportate diverse modifiche alla tecnica del trapianto dei condrociti fino ad arrivare alla seconda e terza generazione in cui si associa l'impiego di *scaffold* tridimensionali bioassorbibili a supporto della proliferazione, differenziazione e funzione cellulare e come veicolo di fattori di crescita. Per evitare

le due fasi della procedura, presenti nei trapianti di prima generazione, Lu e colleghi hanno introdotto un approccio basato sul trasporto dei condrociti dal sito danneggiato in una matrice 3D condro-induttiva e permissiva (A.R. Armiento, 2018). Il nostro esperimento sfrutta un concetto simile, ma il tessuto cartilagineo è stato raccolto meccanicamente da cadaveri freschi di cavalli adulti. È stato infatti dimostrato che ad oggi sia gli innesti di condrociti autologhi sia quelli allogenici risultano sicuri, fattibili ed efficaci essendo migliorati di generazione in generazione i difetti presenti nelle procedure.

9.1 Trapianto di condrociti allogenici

Quando la cartilagine articolare subisce una lesione ha una scarsa capacità di riparazione, dovuta all'essere priva di vasi sanguigni, per questo l'obiettivo finale di ogni trattamento è quello di restaurare la cartilagine ialina (P.R.J.V.C. Boopalan, 2019). L'utilizzo di condrociti allogenici permette di avere una fonte cellulare molto più abbondante rispetto a quella che si può ottenere mediante l'utilizzo di condrociti autologhi (Zheanto Man, 2016). Il trapianto di condrociti allogenici ha evidenziato risultati promettenti in studi su modelli animali. Nonostante l'elevata espressione di antigeni sui condrociti, è stato dimostrato che non sono immunogenici e possiedono proprietà immunomodulatorie positive. L'utilizzo di condrociti allogenici piuttosto che i condrociti autologhi prospetta alcuni vantaggi: la possibilità di raccogliere la cartilagine da soggetti di recente macellazione e di avere a disposizione un'area maggiore di cartilagine, di effettuare un solo intervento chirurgico nel paziente, che riduce i rischi intraoperatori e i costi, nonché la possibilità di infezione. Permette altresì di avere un'alta densità di semina nelle colture primitive e la riduzione della de-differenziazione delle cellule utilizzate. In aggiunta risulta una tecnica più economica e con minore morbilità se comparata al trapianto autologo. La tecnica è si compone di: espanto della cartilagine, isolamento e coltura dei condrociti e trapianto dei condrociti coltivati nel difetto articolare. Comparando i risultati ottenuti dopo i trapianti di condrociti autologhi e allogenici è stato dimostrato che l'impianto allogenico si integra con la cartilagine adiacente e che non si produce ipertrofia periostale; inoltre la rigenerazione di fibrocartilagine con predominanza di cartilagine ialina avviene in entrambi i casi, quindi il trapianto di condrociti allogenici

sembra essere efficace tanto quanto quello autologo, ma con i vantaggi di poter sfruttare una disponibilità cellulare maggiore. Dal punto di vista istologico non si evidenziano differenze significative tra le due tipologie di trapianto (*Figura 7*) (P.R.J.V.C. Boopalan, 2019).

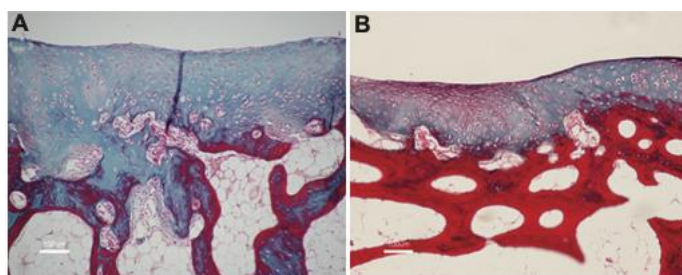


Figura 7: Istologico della cartilagine tratta con condrociti autologhi (A) e condrociti alloigenici (B) che mostra la presenza della formazione di fibrocartilagine e cartilagine ialina con una buona integrazione con la cartilagine normale adiacente (P.R.J.V.C. Boopalan, 2019).

Per determinare se compaia nel lungo periodo una risposta infiammatoria nella cavità articolare conseguente al trapianto di condrociti alloigenici, sono state determinate le infiltrazioni delle cellule infiammatorie nella membrana sinoviale: da esperimenti condotti su modelli articolari di coniglio non si è riscontrata un'evidente invasione di cellule infiammatorie. Questi risultati indicano che non avviene una risposta infiammatoria a lungo termine, mentre è possibile si verifichi un'infiammazione a breve termine. L'assenza di risposta infiammatoria avviene probabilmente perché i condrociti alloigenici non risultano immunogenici, grazie al fatto che la ECM che li circonda inibisce il rigetto contro le cellule. Se i condrociti utilizzati vengono isolati rapidamente utilizzando tripsina-EDTA si può trattenere la ECM intorno ad essi quanto più possibile. Inoltre, i condrociti in coltura, quando si propagano, non sono in grado di stimolare la proliferazione di cellule T, a causa dell'assenza di segnali costimolatori e necessari per la loro attivazione, quali CD80 e CD86 sulla superficie cellulare. Inoltre, la sintesi di condromodulina I e TGF- β può proteggere i condrociti dalla risposta immunitaria mediata dalle cellule T. Anche nella coltura dei condrociti alloigenici vengono espressi i geni utili alla rigenerazione della cartilagine (IGF-1, BMP-7 e HGF) (Zheanto Man, 2016).

9.2 Sistemi di coltura adatti per i condrociti

9.2.1 Medium

Per la coltivazione di condrociti per l'ingegneria tissutale si usano diverse condizioni di coltura e medium. I condrociti, infatti, proliferano bene in medium *serum-free*, costituito da HG-DMEM (*high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium*), ITS+ (insulina, transferrina, selenio, acido linoleico e siero albumina bovina), prolina, piruvato, desametasone, ascorbato-2-fosfato e TGF- β 1. All'HG-DMEM si può aggiungere anche bicarbonato di sodio, FBS, vitamina C, amminoacidi non essenziali, tampone HEPES (*hydroxyethylpiperazine-ethane-sulfonic acid*) e antibiotici (Zhongyi Zhao, 2020).

In alternativa si può usare il TGF- β 3 in medium composti di LG D-MEM (*low glucose D-MEM*), amfortericina B, L-prolina, siero albumina bovina, acido linoleico, insulina, transferrina, selenio, acido L-ascorbico-2-fosfato e desametasone (Zhongyi Zhao, 2020). Il desametasone è un ormone adrenocorticale che viene aggiunto ai medium di coltura o legato covalentemente nel *network* degli idrogel per indurre la differenziazione condrogenica e osteogenica delle MSCs e la formazione delle proteine cartilagine specifiche in presenza di TGF- β . Alcuni studi hanno però indicato la possibilità che il desametasone eserciti effetti soppressivi sulla sintesi dell'aggreco e sul suo accumulo. Il desametasone è comunque comunemente utilizzato come supplemento per promuovere la proliferazione cellulare (Jingzhou Yang, 2017).

Una tipologia di cartilagine ialina artificiale si ottiene coltivando i condrociti in un medium condrogenico (CM), dato da D-MEM, penicillina, streptomina, fungizone, ITS, amminoacidi non essenziali, sodio piruvato, ascorbato-2-fosfato, L-prolina e desametasone (Zhongyi Zhao, 2020).

I fattori di crescita possono essere introdotti nelle colture cellulare attraverso diversi metodi:

1. Forma libera nel medium: i risultati *in vitro* indicano che lo strato di cartilagine mostra aumenti di espressione per i geni cartilagine-specifici e per le proteine *biomarkes*. Sono necessari frequenti dosaggi dei fattori di crescita per

mantenere la concentrazione adeguata e la bioattività nel medium, aspetto che non è ottimale per una coltura a lungo termine o per la maturazione dei costrutti ingegnerizzati. Inoltre, questo metodo non è applicabile *in vivo* (Jingzhou Yang, 2017);

2. Miscelazione fisica nell'idrogel: si tratta di incapsulare i fattori di crescita nell'idrogel. Questa tecnica non richiede più somministrazioni e permette il rilascio dei fattori di crescita nel giro di alcune settimane. Questo è un vantaggio per le colture a lungo termine e per l'ingegneria tissutale. Ciò nonostante, il rilascio dei fattori di crescita dall'idrogel si riduce significativamente con il tempo, il che potrebbe limitarne l'efficacia (Jingzhou Yang, 2017);
3. Legame covalente con l'idrogel: i fattori di crescita vengono immobilizzati in un idrogel sintetico da legami covalenti per aumentare la produzione di ECM e la proliferazione dei condrociti incapsulati. Questo metodo può essere utilizzato anche *in vivo* (Jingzhou Yang, 2017);
4. Microsfere;
5. Trasporto mediante geni: si incorporano geni terapeutici nei biomateriali per facilitare la rigenerazione tissutale (Jingzhou Yang, 2017).

9.2.2 Idrogel in alginato (BEADS)

Gli idrogel sono una classe di biomateriali promettenti per la rigenerazione di tessuti duri e molli. Alcune proprietà, come la rigidità meccanica, l'elasticità, il contenuto di acqua, la bioattività e la degradazione possono essere modulate selezionando i materiali più appropriati. Gli idrogel sono biomateriali versatili, grazie alle loro proprietà simili a quelle dell'ECM naturale, come l'alto contenuto in acqua e la porosità. Gli idrogel servono come matrice attiva per controllare morfologia, proliferazione e differenziazione cellulare. Un altro parametro importante da considerare è la possibilità di manipolare la biodegradabilità degli idrogel in base al tasso di crescita cellulare. Una degradazione troppo rapida può portare a una riduzione nella ritenzione di proteine delle ECM. Mentre una degradazione troppo

lenta può ostacolare il rimodellamento cellulare e la formazione di tessuto. Gli studi sulla degradazione degli idrogel in alginato hanno dimostrato che *in vitro* gli idrogel parzialmente ossidati si degradano più velocemente (entro 9 giorni) rispetto a quelli fatti di alginato puro (almeno 1 mese) sottoposti alle stesse condizioni (Jingzhou Yang, 2017).

Gli idrogel possono essere fabbricati da diversi polimeri, naturali o sintetici, o da loro ibridi. Gli idrogel basati su polimeri naturali includono polisaccaridi (alginato, agarosio, chitosano, acido ialuronico e gomma di gellano) e proteine (collagene, gelatina e fibroina); gli idrogel ibridi sono rapidamente fabbricati combinando i polimeri naturali e quelli sintetici, fornendo maggiori possibilità nella selezione delle diverse composizioni (Jingzhou Yang, 2017).

Gli idrogel fabbricati da polimeri naturali generalmente possiedono una buona biocompatibilità, biodegradabilità e scarsa risposta immunitaria (Jingzhou Yang, 2017). Le colture in idrogel che utilizzano l'alginato o l'agarosio forniscono una matrice artificiale, permeabile ai nutrienti e forzano i condrociti a mantenere o a riacquisire la loro morfologia rotondeggiante, che si associa a un assemblaggio corretto del citoscheletro (Shulze-Tanzil, 2009).

Essendo stato approvato dalla *US Food and Drug Administration*, l'alginato è diventato uno dei biomateriali più usati (Zhongyi Zhao, 2020). Una proprietà unica dell'alginato è la capacità di effettuare *crosslink* con cationi bivalenti come quelli Ca^{2+} a temperatura ambiente. Gli idrogel in alginato inoltre hanno dimostrato di supportare sia la crescita che la proliferazione dei condrociti in essi incapsulati, come anche di mantenerne il fenotipo (Jingzhou Yang, 2017). L'alginato offre molti vantaggi rispetto agli altri biomateriali: i condrociti possono essere omogeneamente dispersi ed incapsulati nelle *beads* e coltivati per più di 8 mesi senza nessuna apparente perdita fenotipica; le *beads* di alginato permettono la ricostituzione di ponti tridimensionali molto simili a quelli della matrice cartilaginea; i condrociti coltivati esprimono proteoglicani, soprattutto aggregano, e collagene tipo II, ma non il tipo I; i condrociti incapsulati sono comunque in grado di rispondere ai fattori di crescita e alle citochine che abitualmente influiscono sul loro metabolismo; le *beads* sono strutture facili da maneggiare, e molte applicazioni molecolari, biochimiche e biologiche sono compatibili con questa modalità di coltura; le cellule possono essere

recuperate dalle *beads* tramite una semplice chelazione degli ioni bivalenti di Calcio con EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*), seguita da centrifugazione (Frédéric De Ceuninck, 2004).

Le colture in *beads* di alginato sono anche utili per re-differenziare condrociti che si sono de-differenziati durante l'espansione in colture bidimensionali (Frédéric De Ceuninck, 2004). Nelle colture 3D di alginato l'attività proliferativa dei condrociti però viene ridotta, ma i contatti cellula-cellula e cellula-matrice promuovono la re-differenziazione, grazie alla formazione di *gap junctions*. Infatti, il complesso cellule-idrogel può essere trapiantato nel sito danneggiato solo dopo che si sono formati i legami trasversali per formare una specifica forma *in vitro* (S-H Lee, 2007). Le condizioni di bassa tensione di ossigeno supportano il re-differenziamento dei condrociti nelle colture in idrogel. Le *beads* di alginato e gli *scaffold* in microfibra hanno ottenuto un'attenzione particolare negli esperimenti di ingegneria tissutale per la riparazione della cartilagine articolare. Nelle colture in idrogel di alginato i condrociti sono circondati da fluido artificiale che contiene una matrice permeabile. I condrociti possono esibire la loro tipica forma rotondeggiante a cui si associa il processo di differenziazione funzionale (Shulze-Tanzil, 2009). (Figura 8).

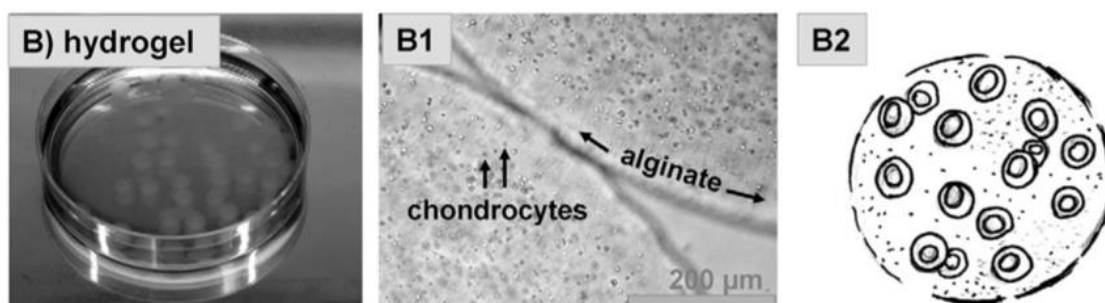


Figura 8: (B): Coltura in idrogel in cui i condrociti sono sospesi nell'alginato), successivamente polimerizzato in Cloruro di Calcio; (B1): nel dettaglio visione di due beads di alginato in cui sono contenuti i condrociti; (B3): rappresentazione grafica della morfologia condrocitaria mantenuta all'interno delle beads di alginato (Shulze-Tanzil, 2009).

Nonostante abbiano trovato grande applicazione, gli *scaffold* a idrogel presentano delle limitazioni, come la diffusione dei fattori di crescita, che essendo particelle molto piccole riescono a penetrare la rete dell'idrogel e ad uscirne troppo rapidamente. Per superare questo problema si introducono nell'idrogel delle microparticelle che contengono i fattori di crescita, così da rallentarne la dispersione

(S-H Lee, 2007). Altre limitazioni includono il fatto che nel tempo i legami generati fisicamente dall'idrogel di alginato si perdono e gradualmente si riduce la stabilità meccanica e la scarsa capacità di adesione per le cellule dei mammiferi. Per sopperire a ciò si è introdotto un peptide che favorisce l'adesione cellulare che ha implementato il supporto alla funzione cellulare (Jingzhou Yang, 2017).

9.2.2.1 Protocollo standard di preparazione degli Idrogel in Alginato di Sodio

Il metodo originale per la coltivazione dei condrociti in *beads* di alginato fu sviluppato a fine degli anni '80 da Guo e colleghi e da allora è stato impiegato e migliorato da molti ricercatori (Frédéric De Ceuninck, 2004). Per la preparazione delle *beads* si possono seguire due meccanismi, quello fisico o quello chimico (Jingzhou Yang, 2017). Il metodo usato routinariamente in laboratorio prevede l'espianto di cartilagine da una superficie articolare intatta, la separazione dalla matrice cartilaginea mediante digestione mediata da collagenasi con l'aggiunta di una soluzione al 1,25% di acido alginico fino a quando non si ottiene una sospensione omogenea. La sospensione viene versata in una siringa e spinta delicatamente attraverso un ago, in modo che le gocce cadano in una soluzione di Cloruro di Calcio. Le *beads* si formano istantaneamente e polimerizzano dopo 5 minuti nella soluzione di Cloruro di Calcio. Possono essere coltivati con questa tecnica i condrociti di qualsiasi specie. Con queste condizioni i condrociti riescono a mantenere un alto grado di differenziazione. Grazie alla semplicità con cui le *beads* possono essere dissolte, i condrociti possono essere recuperati e separati dalla matrice tramite centrifugazione (Frédéric De Ceuninck, 2004) (*Figura 9*).

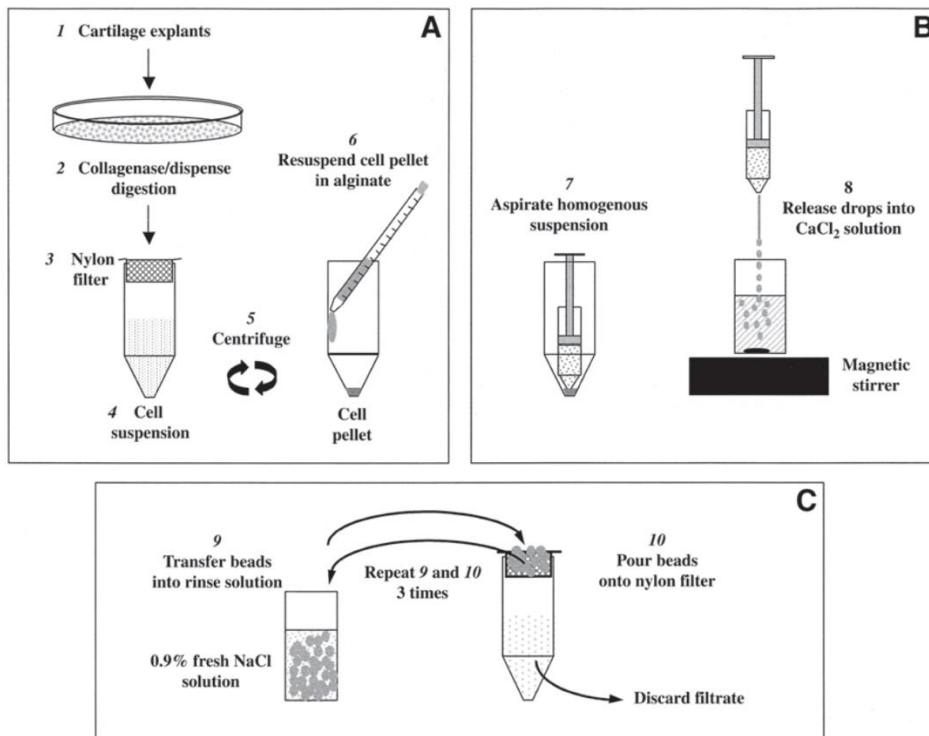


Figura 9: Schema del metodo di incapsulamento dei condrociti nelle beads di alginato. (A): Sospensione del pellet e aggiunta di un volume di soluzione di alginato. (B): Spingere gentilmente la siringa in modo che la soluzione sia rilasciata e le gocce cadano nella soluzione di polimerizzazione (Frédéric De Ceuninck, 2004).

RAZIONALE

1 Principali complicazioni relative alla coltivazione *in vitro* dei condrociti

Nonostante i continui avanzamenti nel campo della medicina rigenerativa, la riparazione dell'interfaccia osteocondrale e dei difetti a tutto spessore della cartilagine articolare resta una sfida aperta. Il fallimento origina soprattutto dall'assenza di una matrice artificiale appropriata che possa rimpiazzare le regioni danneggiate e promuovere la rigenerazione tissutale. Le condizioni più difficili da ricreare *in vitro* sono le funzioni uniche e specifiche che ricopre la cartilagine articolare, in quanto è un tessuto altamente complesso nella composizione e nella struttura dei singoli strati. L'obiettivo essenziale è individuare biomateriali appropriati che possano formare una ECM artificiale in grado di facilitare la crescita cellulare, la proliferazione e la differenziazione nell'area danneggiata, lasciando la rigenerazione della cartilagine articolare e dell'osso subcondrale ai processi biologici e promuovendo interazioni tra le cellule e le biomolecole. In questi casi i materiali della matrice non devono essere meccanicamente forti come il tessuto naturale, in quanto servono solo temporaneamente come microambiente per le cellule progenitrici che devono generare cartilagine e tessuto osseo. (Jingzhou Yang, 2017).

La strategia migliore per ricreare un ambiente favorevole al mantenimento dei condrociti articolari è quella di utilizzare la matrice extracellulare de-cellularizzata. Il processo di de-cellularizzazione dovrebbe rimuovere tutte le cellule e gli antigeni cellulari, mantenendo però le sostanze bioattive residenti nella ECM. Il processo di de-cellularizzazione, però, compromette le funzioni meccaniche degli *scaffold* derivati dalla ECM, quindi per limitare questa condizione essi sono stati associati al collagene o a polimeri sintetici (A.R. Armiento, 2018).

Al posto degli *scaffold* derivati dalla ECM possono essere anche utilizzati i condrociti, previo isolamento, in combinazione con matrici 3D che ricompongono le strutture e le funzioni basiche della ECM. Ricordiamo che i condrociti all'interno della cartilagine articolare sono racchiusi nelle lacune in cui mantengono una morfologia sferica e non producono fibre di F-actina (fibre da stress). L'espianto dei condrociti

e la semina in strutture bidimensionali provocano un cambiamento fenotipico associato a modificazioni del citoscheletro, in cui compaiono le fibre di F-actina (A.R. Armiento, 2018). Il processo di de-differenziazione si caratterizza per un completo cambiamento nel profilo sintetico dei condrociti. Si osservano diversi e rapidi cambiamenti anche al primo passaggio in coltura monostrato, anche se le alterazioni fenotipiche più pronunciate appaiono verso il terzo passaggio. Al quarto passaggio si giunge a una de-differenziazione irreversibile. Nelle colture monostrato i condrociti alterano la loro morfologia passando da una forma rotondeggiante a una forma sempre più mesenchimale e simile a quella dei fibroblasti, sviluppando un profilo sintetico non specifico. Il diametro delle cellule generalmente diviene più allungato, accompagnato anche da cambiamenti nell'assemblaggio del citoscheletro. Si formano le fibre di F-actina e aumentano le adesioni focali, aspetti che non sono evidenti nelle colture 3D. Gli inibitori del citoscheletro, come le staurosporine, sono in grado di sopprimere la formazione delle fibre di F-actina e il de-differenziamento associato allo *shift* sintetico. È stato riportato inoltre una diminuzione dell'espressione di proteine segnale del citoscheletro durante la de-differenziazione, quali tensina, talina, paxilina e *focal adhesion* chinasi (FAK). La sintesi di collagene tipo II e tipo IX e di aggrecano si riduce rapidamente durante l'espansione condrocitaria in sistemi monostrato. In aggiunta, le COMP, le proteine dello strato superficiale, come la lubricina, la condromodulina e il fattore di trascrizione Sox-9 diminuiscono. Al contrario piccoli proteoglicani come la decorina, il biglicano e grandi proteoglicani come il versicano e la fibronectina sono *up* regolati dai condrociti. Aumenta anche la sintesi di collagene tipo I, che normalmente non è espresso nella cartilagine, e di tipologie di collagene interstiziale (tipo III e tipo IV) (Shulze-Tanzil, 2009). È proprio questo uno dei parametri principali che indica la perdita delle caratteristiche primitive dei condrociti (Zhongyi Zhao, 2020). I recettori che interagiscono con le componenti specifiche della ECM cartilaginea sono di conseguenza *down* regolati (recettori per le α -1 integrine); in particolare questi vengono *down* regolati negli ultimi passaggi in coltura (P3 e P4), lasciando supporre che i segnali mediati dalle integrine giochino un ruolo importante nella generazione e nel mantenimento del fenotipo condrocitario durante la differenziazione condrogenica. A supporto dell'ipotesi che i condrociti de-differenziati alterino il loro fenotipo verso uno più mesenchimale e precondrogenico vi è l'espressione da parte di questi ultimi di *markers* di superficie tipici delle cellule staminali, anche se i

condrociti articolari de-differenziati si possono chiaramente distinguere dalle MSCs del midollo osseo analizzando l'espressione di CD90 e CD14 (glicoproteine di adesione di superficie) e CD105 (glicoproteina facente parte del complesso del TGF- β) (*Tabella 1*) (Shulze-Tanzil, 2009).

DEDIFFERENZIAZIONE	DIMINUZIONE	AUMENTO
TIPOLOGIA DI COLLAGENE	II, IX, X, XVIII, Q	I, III, IV, IX
PICCOLI E GRANDI PROTEOGLICANI	Aggrecano	Versicano, decorina, biglicano
GLICOPROTEINE	COMP, lubricina, condromodulina	Fibronectina
ALTRE PROTEINE DELLA ECM, PROTEINE SEGNALE, FATTORI DI TRASCRIZIONE	S100 (<i>Ca²⁺ binding protein</i>), Sox-9, ERK1, ERK3	<i>Link protein</i>
RECETTORI DI SUPERFICIE CELLULARE	ICAM-1, V-CAM-1	CD90, CD166, CD44, CD10, CD26, CD151, CD81
INTEGRINE	α 1	β 1, β 3, β 5, α v, α 2b, α 3, α 5, TIMP-2, TIMP-3
PROTEINASI	MMP-3, MMP-9, MMP-13, ADAM-TS-4, ADAM-TS-5, IGF-1, VEGF, TGF- β 2	IL-1, TGF- β 3, TGF- β 4, IGF-BP3, TNF-R1
CITOCHINE, FATTORI DI CRESCITA DEL CITOSCHELETRO	Tensina, talina, paxilina, FAK	

Tabella 1: principali fattori che vengono interessati durante l'alterazione fenotipica dei condrociti in corso di de-differenziazione (Shulze-Tanzil, 2009)

I condrociti de-differenziati possono essere re-differenziati usando *scaffold* in 3D che somigliano maggiormente all'ambiente *in vivo*; essi vanno a mimare le condizioni che naturalmente avvengono nella cartilagine in modo più stretto. I condrociti re-differenziati esprimono di nuovo il loro programma condrogenico (Shulze-Tanzil, 2009). Il fenotipo condrocitario non è influenzato solamente dalla composizione del materiale, ma anche dalla configurazione dello *scaffold*, dalla sua porosità e dalla dimensione delle sue fibre. Per capire l'influenza della dimensione delle fibre sul fenotipo condrocitario si sono comparati *scaffold* di microfibre e nanofibre composti dagli stessi materiali: il risultato dimostra che negli *scaffold* di nanofibre i condrociti mantengono la loro sfericità, restano racchiusi nelle lacune e mostrano un *pattern* di fibre di actina privo di fibre da stress. L'utilizzo di condroitin-solfato negli *scaffold* porosi previene la de-differenziazione dei condrociti, ma è importante ricordare che il maggiore ostacolo nella scelta di un materiale piuttosto che un altro non risiede tanto nella capacità di sostenere la proliferazione e la differenziazione cellulare, ma di permettere l'adesione e l'integrazione con il tessuto nativo adiacente (A.R. Armiento, 2018).

Una tipologia di *scaffold* attualmente studiata per il trapianto dei condrociti allogenici a livello articolare è quella degli *scaffold* ibridi di idrogel di chitosano (CS) e matrice ossea demineralizzata (DBM), in quanto si fissano in modo omogeneo al difetto grazie al chitosano, mentre la DBM aumenta le forze meccanica dello *scaffold*. Inoltre, il chitosano è importante per gli scambi nutrizionali tra i condrociti e per l'integrazione del tessuto rigenerato nella cartilagine adiacente. Grazie al chitosano, infatti, questi *scaffold* possiedono una buona biocompatibilità, biodegradabilità, attività intrinseca antibatterica e bassa immunogenicità, ma le proprietà meccaniche sono molto scarse e questo ha pregiudicato negli anni il loro utilizzo; per questo si sono studiate diverse associazioni con altri biomateriali, tra cui appunto la DBM, il collagene e la seta, per aumentare le proprietà meccaniche (Zheanto Man, 2016).

Le valutazioni condotte *in vivo* hanno indicato che i condrociti incapsulati negli idrogel possono rigenerare la cartilagine ialina (Jingzhou Yang, 2017).

2 Utilizzo dell'ipossia nell'ingegneria tissutale per la rigenerazione del tessuto cartilagineo

Come descritto in precedenza, la cartilagine è probabilmente il tessuto dell'organismo che sopporta la più bassa concentrazione di ossigeno, in quanto avascolarizzata. I condrociti vivono e sono adattati a un ambiente ipossico. Gli effetti che l'ipossia ha sul differenziamento delle MSCs in condrociti risultano essere ancora controverso. Livelli di ipossia inferiori al 2% inibiscono la condrogenesi delle MSCs derivate da tessuto adiposo animale, mentre sembrerebbero permissivi in caso di MSCs di origine umana. L'ossigeno gioca un ruolo importante nell'iniziazione del processo di migrazione delle MSCs e delle cellule progenitrici nei siti di lesione. Però in condizioni di ipossia aumenta anche l'attività di NADPH-ossidasi, che promuove la sintesi di ROS da parte delle cellule staminali e intensifica l'invecchiamento cellulare. Molti dati continuano a sostenere che l'ipossia abbia un ruolo vitale nel processo di differenziamento condrocitario (Magali Demoor, 2014).

Una delle sfide ancora aperte dell'ingegneria tissutale cartilaginea è la prevenzione o l'inibizione della sintesi di procollagene tipo I a livello genico, come anche la sua deposizione nella nuova ECM. Una strategia proposta è quella di re-differenziare i condrociti di origine equina in idrogel di alginato di Sodio (Yang Shi, 2015).

Essendo che i segnali inviati da HIF risultano coinvolti nel mantenimento del fenotipo, del metabolismo e del differenziamento condrocitario mediante la regolazione di HIF-1 α e HIF-2 α , questo progetto si pone come obiettivo quello di dimostrare gli effetti positivi dell'ipossia sul mantenimento delle funzioni specifiche dei condrociti (Yang Shi, 2015). Per esplorare gli effetti della tensione di ossigeno sul mantenimento del fenotipo condrocitario sono state seminate colture primarie di condrociti in adesione su plastica e in idrogel di Alginato di Sodio in condizioni di normossia (20% di ossigeno) e ipossia (5% di ossigeno). Si è successivamente valutata la proliferazione dei condrociti sotto tali condizioni.

In questo progetto è stata analizzata, mediante tecnica di Real-Time PCR, l'espressione genica di alcuni *markers* di differenziamento e de-differenziamento condrocitario, sottoponendo le colture condrocitarie alle condizioni micro ambientali sopra citate.

Tra i *markers* di differenziamento sono stati studiati:

1. Collagene tipo II: presente nella cartilagine matura;
2. Aggrecano: indica la presenza di GAGs;
3. HIF-1 α : fattore di trascrizione che si attiva in condizioni di ipossia;
4. Sox-9: fattore di trascrizione fondamentale in tutte le fasi della condrogenesi.

Tra i *markers* di de-differenziamento sono stati analizzati:

1. Collagene tipo I: indica un de-differenziamento verso la linea *fibroblast-like* da parte del condrocita;
2. Runx-2: fattore di trascrizione indicativo di un fenotipo ipertrofico e di un de-differenziamento della cartilagine.

Si è valutato se i condrociti coltivati mediante tecnica di adesione su plastica e idrogel di alginato di Sodio in una delle due condizioni ambientali (normossia o ipossia) in terreno D-MEM arricchito con FCS10% e in terreno D-MEM privo di FCS10% mantenessero, aumentassero o diminuissero l'espressione dei geni della matrice e dei geni di regolazione, per studiare le combinazioni ottimali atte a mantenere al massimo grado il differenziamento condrocitario e il loro potenziale rigenerativo, al fine di trattare alcune patologie articolari presenti nella specie equina.

Dagli studi effettuati l'attesa era quella di trovare le cellule coltivate a basse tensioni di ossigeno con una vitalità e una proliferazione maggiore rispetto a quelle coltivate a normali condizioni di ossigeno. L'ipossia è un fattore richiesto per la sopravvivenza dei condrociti, ma da solo risulta insufficiente a sostenere il differenziamento fenotipico dei condrociti seminati, in particolare in strutture monostrato. Per queste ragioni nei campioni di condrociti seminati in terreno D-MEM è stata inserita un'altra variabile: presenza o assenza di siero fetale bovino al 10%.

Secondo gli studi effettuati l'espressione genica del Collagene tipo II e dell'aggrecano dovrebbero aumentare nelle colture seminate in strutture tridimensionali su terreno arricchito e in ipossia, mentre l'espressione genica del

Collagene tipo I dovrebbe diminuire, suggerendo che le strutture tridimensioni combinate con l'ipossia riducano la de-differenziazione dei condrociti espansi verso il fenotipo fibroblastico.

MATERIALI E METODI

1 Campionamento e preparazione degli arti

Per gli esperimenti sono stati utilizzati, come fonte per l'espianto di cartilagine, arti di cavalli adulti regolarmente macellati. L'arto è stato tagliato a livello di tibia e fibula per liberarlo dal tronco e rendere più agevole lo scuoiamento, mantenendo integra l'articolazione metatarso-falangea, dalla quale è stata espantata la cartilagine articolare.

L'articolazione metatarso-falangea come base ossea è compresa tra l'estremità distale delle ossa metatarsali e l'estremità prossimale della prima falange, possiede una capsula unica ed è mantenuta dai legamenti collaterali mediali e laterali, che vanno dall'estremità distale dell'osso metatarsale all'estremità prossimale della prima falange. Oltre a questi è mantenuta unita sul piano superficiale, medio e profondo dai legamenti sesamoidei propriamente detti (o intersesamoidei) (Barone, 2012).

Gli arti sono stati scuoiati: si è eseguito un primo taglio della cute in direzione prossimo-distale dalla tibia fino all'ungula, si è continuato a scollare la cute e il sottocute radialmente, quindi, a scuoiamento completato, si è sezionato cute e sottocute con taglio trasversale appena prossimalmente all'ungula, in modo da rimuovere il tutto. Si è proceduto isolando e rimuovendo i tendini del muscolo flessore superficiale e profondo, ruotando l'arto in posizione palmare. Tramite palpazione si sono identificati i tendini e si è inciso lateralmente e medialmente al punto di massimo spessore per liberarli dalla loro guaina senza superare il piano muscolare, evitando accuratamente di penetrare in articolazione. Si è completato lo scollamento prossimo-distale e si è eseguita una sezione trasversale distalmente per rimuovere il tutto. Ogni arto è stato successivamente tagliato con sega rotante a livello dei segmenti ossei prossimali e dell'ungula distalmente, lasciando intatta l'articolazione metatarso-falangea, nonché i suoi monconi ossei. Per pulire e sterilizzare, ogni arto è stato lavato con H₂O, cosparso con alcool denaturato al 95% e sterilizzato mediante flambatura. Infine, ogni arto è stato avvolto con pellicola di alluminio e trasportato in laboratorio per effettuare l'espianto della cartilagine articolare.

2 Espianto della cartilagine articolare

Ogni arto è stato posto sotto cappa a flusso laminare e liberato dall'involucro di alluminio in sterilità. Si è proceduto all'apertura dell'articolazione incidendo con un bisturi lama 21 la capsula articolare ed esponendo le due superfici articolari. Dopo l'osservazione delle superfici articolari sono stati esclusi dall'esperimento alcuni arti in quanto mostravano gravi segni di lesioni intra-articolari cronicizzate, compatibili con osteocondrosi.

La cartilagine è stata bagnata ripetutamente con *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Tabella 2) arricchito di fungizone e penicillina/streptomicina per mantenere idratata la cartilagine che sotto la cappa a flusso si seccerebbe rapidamente. Successivamente si è incisa la cartilagine articolare con bisturi a lama 11, formando un reticolato che arrivasse in profondità fino all'osso subcondrale. Utilizzando il bisturi ruotato lateralmente sono stati sollevati uno ad uno i rettangoli di cartilagine articolare a tutto spessore scalzandoli dall'osso, fino a completa esposizione dell'osso subcondrale sottostante. L'utilizzo del reticolato è risultato utile per ottenere già in primo passaggio pezzetti di cartilagine più piccoli, rendendo più agevole la successiva digestione enzimatica. La cartilagine, una volta espantata, è stata immediatamente posta in piastre Petri da 57 cm² contenenti PBS1X e antibiotici (2X). La cartilagine espantata è stata lavata rimuovendo il PBS 1X ed effettuando 2 lavaggi seriali con PBS. Quindi ai pezzetti di cartilagine è stato aggiunto medium *Dulbecco Eagle* modificato (D-MEM) (glucosio 4,5 g/L) (Tabella 3), antibiotici e siero (FBS) e le piastre sono state incubate in termostato a 37°C con 5% di CO₂ per 24/48 ore in modo da valutarne eventuali contaminazioni.

PBS

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
KCl	0,2 g/L
KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
NaCl	8 g/L
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L
H ₂ O DW	1L

Tabella 2: Composizione PBS.

D-MEM (Sigma Aldrich)

D-Glucosio	4,5 g/L
L-Glutamina	0,58 g/L
H ₂ O DW	1 L
NaHCO ₃	0,84 g/L
HEPES	25 ml/L
Antibiotici 100X	10 ml/L
Fungizone 100X	10 ml/L
FCS	10%

Tabella 3: Composizione D-MEM modificato per colture cellulari primarie di condrociti.

3 Digestione della matrice e isolamento dei condrociti

3.1 Controllo delle contaminazioni microbiche dei condrociti

Prima di procedere con l'isolamento si è effettuata un'osservazione macroscopica e microscopica dei condrociti incubati. Macroscopicamente si è valutato il colore e la torbidità del medium. Microscopicamente, mediante microscopio ottico con ingrandimento 20X e 40X, si è ricercata la presenza di eventuali muffe, individuabili per la presenza delle ife, o batteri, che portano il medium a virare di colorazione (acidità) e a diventare più torbido.

La contaminazione da batteri, funghi e lieviti rappresenta infatti il tipo di contaminazione più frequente nelle colture cellulari. La contaminazione da parte di questi microrganismi può essere dovuta non solo a un errata manipolazione, ma anche alla loro eventuale presenza nell'organo di origine.

In assenza di contaminazioni si procede eliminando il medium ed effettuando due lavaggi consecutivi con PBS 1X per eliminare eventuali residui di medium e soprattutto del siero contenuto in esso. Una volta effettuati i lavaggi si trasferisce il tutto in provette da 50 ml.

3.2 Digestione enzimatica della matrice cartilaginea

La digestione della matrice cartilaginea comprende due fasi fondamentali:

1. Prima digestione da parte delle proteasi;
2. Seconda digestione da parte delle collagenasi.

3.2.1 Preparazione della soluzione di proteasi 0,1% (pronasi) e prima digestione della cartilagine

Proteasi in polvere ricavata da *Streptomyces griseus* è stata sciolta in D-MEM sterile senza siero (il siero inibisce gli enzimi) mediante agitatore magnetico (*Tabella 4*). Il tutto è stato filtrato con filtri con pori da 0,2 μm di diametro.

SOLUZIONE DI PROTEASI 0,1%

Proteasi (Sigma)	0,1 g
D-MEM senza siero	100 ml

Tabella 4: Soluzione di proteasi 0,1%.

Alla provetta contenente la cartilagine è stata quindi aggiunta la soluzione di proteasi. La provetta è posta in bagnetto per 1 ora a 37°C. La soluzione di proteasi, in questo lasso di tempo, taglia le parti proteiche della matrice.

3.2.2 Preparazione della soluzione di collagenasi 0,2% e seconda digestione della cartilagine

Trascorsa 1 ora si rimuove la soluzione di proteasi e si trasferisce la cartilagine in beute con magnete e si aggiunge una soluzione di collagenasi 0,2%.

La soluzione di collagenasi 0,2% è stata preparata partendo da una polvere di collagenasi ricavata da *Clostridium histolyticum* sciolta in D-MEM senza siero su agitatore magnetico e filtrata con due filtrazioni successive: la prima con filtri con pori da 0,45 μm di diametro e la seconda con filtri con pori da 0,2 μm (*Tabella 5*). La seconda digestione ad opera delle collagenasi taglia il collagene, aprendo la rete della matrice e liberando le cellule.

SOLUZIONE DI COLLAGENASI 0,2%

Collagenasi (Sigma)	0,24 g
D-MEM senza siero	120 ml

Tabella 5: Soluzione di collagenasi 0,2%.

Le beute contenenti cartilagine e collagenasi sono state poste in una stufa con piano oscillante per 2 ore a 37°C. Al termine della digestione restano comunque presenti alcuni frammenti di tessuto, per non effettuare una digestione completa per evitare di danneggiare anche le cellule liberate.

A questo punto è necessario separare le cellule dai restanti frammenti di cartilagine.

3.3 Isolamento dei condrociti

Al termine della digestione la soluzione è stata filtrata utilizzando una garza posta su un imbuto. La soluzione è stata prelevata con una pipetta dalla beuta e filtrata sulla garza, effettuando una prima grossolana filtrazione che intrappola i frustoli più grandi di cartilagine non digerita. Successivamente si esegue una seconda filtrazione con filtri sterili da 20 µm. Il filtro elimina i grappoli più grandi di condrociti. Una volta eseguita la filtrazione viene aggiunto medium e FCS per inattivare l'enzima.

Per separare la collagenasi dalle cellule la sospensione cellulare è stata centrifugata per 7 minuti a 2.000 xg. Si elimina il sovrnatante che contiene l'enzima e il pellet è risospeso in medium con FCS fresco mediante pipetta per lavare le cellule.

3.3.1 Valutazione numerica della sospensione cellulare mediante reticolo di Burker

Prima di procedere con la semina delle cellule è necessario contarle e valutarne la vitalità.

Un'aliquota della sospensione cellulare è stata diluita con un pari volume di *Trypan Blue* e risospesa accuratamente. Una goccia della sospensione cellulare colorata è stata posta in corrispondenza del margine tra copri oggetto e reticolo della camera di Burker. Il liquido per capillarità penetra nello spazio compreso tra vetrino copri oggetto e reticolo, contraddistinto da volume definito e noto. Al microscopio ottico con ingrandimento 25X (*Figura 10*) si procede alla conta delle cellule.

Per rendere il conteggio statisticamente significativo bisogna contare le cellule contenute in almeno 3 dei 9 quadranti del reticolo, ognuno delineato da una triplice linea. Per ogni quadrante vanno incluse nel conteggio le cellule comprese nel campo, oltre alle cellule sovrapposte alla linea interna ed a due lati della linea mediana. Va contata ogni cellula che risulti facilmente distinguibile negli agglomerati come singola, mentre va contata come una singola cellula l'agglomerato in cui le cellule non risultano facilmente distinguibili.

Si calcola il numero di cellule nella sospensione mediante la seguente formula:

$$\text{n}^\circ \text{ cellule/ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cellule totale}}{\text{n}^\circ \text{ quadrati contati}} \times 10^4 \times \text{diluizione}$$

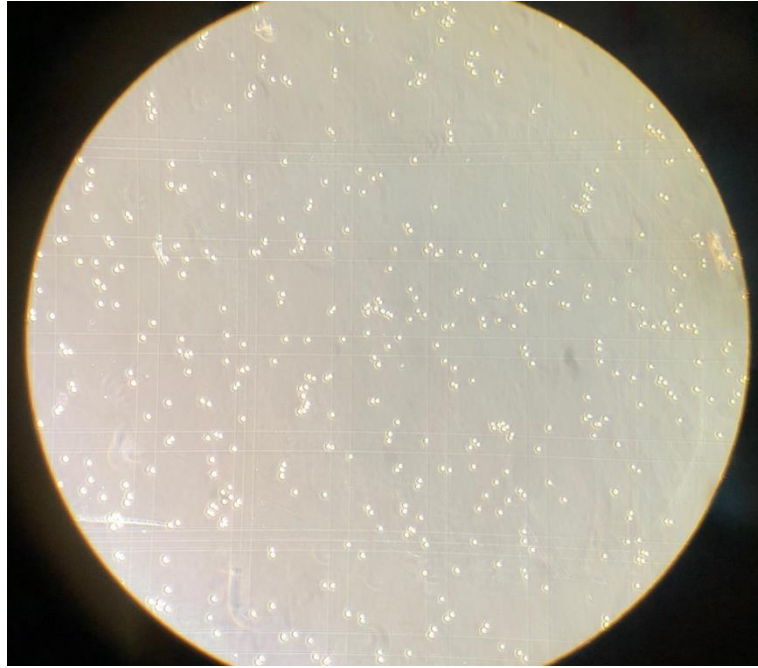


Figura 10: Foto al microscopio ottico della valutazione numerica della sospensione di condrociti mediante camera di Burkert. Si possono osservare chiaramente le cellule singole e gli agglomerati cellulari di bianco brillante. Si evidenziano anche le linee dei diversi quadranti che compongono la camera di Burkert.

Dopo la conta cellulare si esegue una seconda centrifugazione di 7 minuti a 2.000 xg.

4 Sistemi di coltura

4.1 Semina in adesione su plastica

I condrociti isolati sono stati seminati in piastre Petri da 21 cm² alla densità di 2×10^4 cell/cm² (*low density*) in medium D-MEM senza FCS o in D-MEM con 10%FCS ed incubati in termostato a 37°C/5% di CO₂ con ossigeno al 20% (normossia) o a 37°C/5% di CO₂ con ossigeno al 5% (ipossia).

4.2 Semina in Beads di alginato di Sodio

I condrociti isolati sono stati coltivati in una matrice gelatinosa tridimensionale (*beads* di alginato). Le *beads* sono strutture tridimensionali gelatinose in cui vengono poste le cellule una volta isolate. La soluzione di Alginato di Sodio inizialmente liquida, viene successivamente polimerizzata usando Cloruro di Calcio (agente polimerizzante) in sfere con inglobati al loro interno i condrociti.

4.3 Soluzioni

Le soluzioni necessarie per la preparazione delle *beads* di alginato di sodio sono:

1. NaCl 0,9%;
2. Alginato di Sodio 1,2%;
3. Acido ascorbico 50 µg/ml. L'acido ascorbico è fondamentale per favorire la sintesi del collagene;
4. CaCl₂ 102 mM.

Per preparare le *beads* in alginato di sodio è stata innanzitutto preparata una soluzione di NaCl 0,9% (soluzione fisiologica), sciogliendo 0,9 g di NaCl in 100 ml di H₂O.

Per la preparazione della soluzione di alginato di Sodio 1,2% sono stati pesati 240 mg di alginato di sodio in polvere da aggiungere lentamente in 20 ml di NaCl 0,9%. Innanzitutto, è stata scaldata la soluzione di NaCl 0,9% a 37°C e poi è stata aggiunta la polvere di alginato lentamente nella soluzione di NaCl 0,9% e sciolta mediante agitatore magnetico riscaldato, lasciandola in agitazione per 1-2 ore. La soluzione è stata poi filtrata con filtro con pori da 0,2 µm per renderla sterile.

Per la preparazione della soluzione di Cloruro di Calcio sono stati sciolti 600 mg di polvere di $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 40 ml di H_2O .

4.4 Preparazione delle Beads di Alginato di Sodio

Per formare le *beads* di alginato è necessario innanzitutto pellettare le cellule mediante centrifugazione ed eliminare il sovrantante, poi risospendere le cellule in alginato a 4.000.000 cellule/ml di alginato. A questo punto si deve trasferire la soluzione in una siringa sterile da 10 ml con un ago da 22G. Spingendo lo stantuffo si fa cadere la soluzione una goccia alla volta in un becher contenente la soluzione di CaCl_2 , tenuta in agitazione mediante agitatore magnetico (*Figura 11*). Una volta terminata questa fase si deve eliminare il CaCl_2 utilizzando una pipetta da 10 ml, lavare le *beads* 3 volte con NaCl 0,9% e poi 2 volte in D-MEM (per 15 secondi durante il primo lavaggio e per 3 minuti durante il secondo). A questo punto bisogna trasferire le *beads* nei *dish* contenenti D-MEM, 10%FCS e acido ascorbico 50 µg/ml.

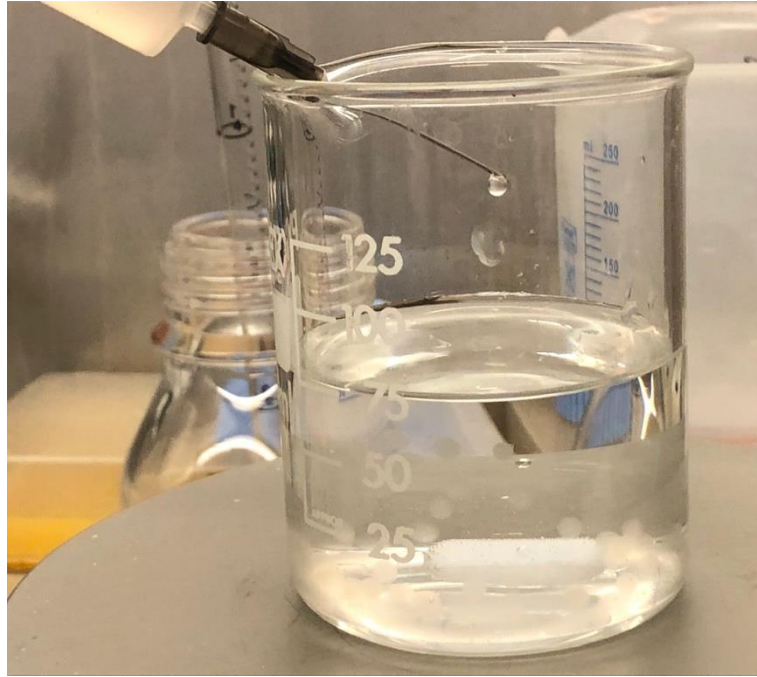


Figura 11: Formazione delle beads: mediante siringa con ago 22G viene spinta la sospensione cellulare in alginato di sodio goccia a goccia in una soluzione di cloruro di calcio. Si evidenzia la polimerizzazione istantanea delle beads in tale soluzione.

4.5 Condizioni di coltura

Le *beads* di alginato contenenti i condrociti e le cellule in adesione sono state coltivate in due medium differenti:

1. D-MEM privo di FCS10%;
2. D-MEM arricchito con FCS10%;

Ognuno dei sistemi di coltura è stato posto in due condizioni differenti: normossia (20% di ossigeno) e ipossia (5% di ossigeno), per un totale di 4 condizioni colturali differenti. Le colture cellulari sono state incubate per 15 giorni, cambiando il medium due volte a settimana.

5 Conservazione delle cellule a basse temperature

La conservazione delle colture cellulari è stata effettuata mediante congelamento in due passaggi successivi: dapprima in congelatori raffreddati meccanicamente a -80°C, in cui le cellule sono state conservate per 24 ore, e successivamente in congelatori raffreddati passivamente dall'azoto liquido a -196°C. Mediante la crioconservazione in azoto liquido è stato possibile permettere il mantenimento vitale delle cellule per un periodo illimitato. Per permettere la crioconservazione cellulare è necessario conservare le colture ad una temperatura inferiore a -130°C, impiegare un sistema che permetta il recupero veloce senza compromettere la temperatura del restante materiale e utilizzare contenitori dotati di sistemi atti a rilevare alterazioni della temperatura.

È stato scelto il congelamento in azoto liquido in quanto rappresenta il metodo più valido e sicuro. Ciò nonostante, se una soluzione viene congelata troppo rapidamente si formano cristalli di ghiaccio. Al contrario, se si congela lentamente l'acqua fuoriesce dalle cellule per osmosi in quanto la pressione osmotica aumenta nel liquido in cui le cellule sono sospese. Per questo motivo è stato necessario aggiungere una sostanza crioprotettrice, nel nostro caso il Dimetilsolfossido (DMSO), che aumenta il numero delle cellule vitali, in quanto altera le proprietà fisiche della soluzione in cui le cellule sono sospese e stabilizza le membrane cellulari. Il DMSO può essere sterilizzato sia mediante filtrazione con filtri da 0,2 µm sia mediante sterilizzazione in autoclave a 0,6 atmosfere per 20 minuti. Si distribuisce a piccole aliquote e si conserva a temperatura ambiente. L'aggiunta del DMSO al terreno è effettuata al momento dell'uso.

5.1 Congelamento delle cellule

È necessario risospendere il pellet cellulare in terreno di congelamento costituito da terreno colturale arricchito con 20% di siero animale e 10% di DMSO. Va valutato il numero di cellule e successivamente esse vanno risospese alla concentrazione di $5-6 \times 10^6$ cellule/ml. Vanno aliquote in fiale in ragione di 1 ml di sospensione cellulare/fiala, contrassegnando le fiale con la tipologia di coltura cellulare e la data

di congelamento. Le fiale vengono poste in contenitori per congelamento *Mr. Frosty*, progettati per raffreddare a 1°C/minuto grazie all'intercapedine di isopentano, prima a -20°C e poi a -80°C per 24 ore e quindi trasferite in azoto liquido.

5.2 Scongelamento delle cellule

Si preleva la fiala dal contenitore di azoto liquido e si immerge immediatamente in bagnomaria a 37°C. Dopo lo scongelamento, la fiala va diluita in terreno colturale D-MEM 10%FCS fresco e centrifugata a 800-1.000 rpm./6 minuti per eliminare tutto il DMSO presente nel medium di congelamento. Si risospende nuovamente in medium fresco e poi si contano le cellule mediante camera di Burker. Per valutare la vitalità cellulare si mescola la sospensione cellulare e si trasferisce 10µl in una provetta contenente 20 µl di colorante *Trypan Blue* allo 0,5% (diluizione 1:3). Il colorante vitale *Trypan Blue* penetra le membrane cellulari non integre, colorando di blu le cellule morte e non vitali. Si agita e si pone una goccia di tale sospensione colorata in corrispondenza del margine compreso tra copri oggetto e reticolo e si procede calcolando il numero di cellule, scartando quelle colorate dal *Trypan Blue*.

6 Analisi molecolare

L'analisi molecolare è stata eseguita per determinare l'espressione genica di alcuni *markers* specifici del differenziamento condrocitario per verificare il mantenimento del fenotipo e la riduzione del de-differenziamento, confrontando diversi sistemi di coltura a diverse concentrazioni di ossigeno.

6.1 Estrazione dell'RNA messaggero (mRNA)

Per l'isolamento e la separazione dell'RNA dalle cellule si è utilizzato il metodo con *Kit Tri-Reagent*. Le cellule in adesione sono state solubilizzate aggiungendo il Trizol direttamente nelle piastre dopo aver eliminato il medium. Le cellule in *beads* sono state trasferite in provettoni e sono stati aggiunti 3 volumi di *Citrato Buffer* (citrato di Na 55mM, EDTA 50 nM, NaCl 0,15M a pH 7,4), pari a tre volte il volume occupato dalle *beads*, per permetterne la dissoluzione. Si è agitato il tutto gentilmente e si è aspettato che le *beads* si sciogliessero (circa 15 minuti). Si è poi centrifugato a 1.800 rpm per 10 minuti, si è rimosso il surnatante e si è lavato il pellet due volte con PBS.

Per l'estrazione dell'RNA si è seguito il seguente protocollo:

1. Omogenizzazione: per omogenizzare le cellule si è aggiunto 1 ml di *Trizol Reagent* ogni $5-10 \times 10^6$ cellule alla piastra per le cellule in adesione e al pellet per le cellule recuperate dalla dissoluzione delle *beads*;

Il *Trizol Reagent* è un reagente pronto all'uso, destinato all'isolamento di alte quantità di RNA derivante da cellule o tessuti animali in un'ora. Si tratta di una soluzione monofasica di fenolo, guanidina isotiocinato e altre componenti che facilitano l'isolamento dell'RNA. Trizol mantiene l'integrità dell'RNA, grazie all'inibizione dell'azione dell'RNAsi (enzimi che degradano l'RNA) che invece romperebbe le cellule e le dissolverebbe durante la fase di omogenizzazione. Permette inoltre di effettuare precipitazioni sequenziali di RNA, DNA e proteine dal campione.

2. Incubare l'omogenato per 5 minuti a temperatura ambiente;

3. Centrifugare a 12.000 x g per 10-15 minuti a 4°C e trasferire la fase acquosa in una provetta pulita;
4. Aggiungere 0,1X del volume iniziale di BPC (100 µl);
5. Mescolare vigorosamente per circa 15 secondi e incubare per 8 minuti a temperatura ambiente;
6. Centrifugare a 12.000 x g per 12 minuti a 4°C, in quanto una centrifugazione a temperature maggiori di 8°C causerebbe la ripartizione di una parte di DNA nella fase acquosa;
7. Trasferire la fase acquosa incolore in cui si trova l'RNA in una provetta nuova, il DNA e le proteine rimangono in un'interfase biancastra, mentre nella fase fenolica organica inferiore (rossa) si trovano proteine, acidi grassi, polisaccaridi e detriti cellulari. L'interfase non va toccata (*Figura 12*);
8. Aggiungere 0,5X del volume iniziale di isopropanolo, vortexare e incubare per 5-10 minuti a temperatura ambiente (500µl);
9. Centrifugare a 12.000 x giri a 4°C per 8 minuti e poi porre in ghiaccio, in modo tale da far rimanere le provette a temperatura di refrigerazione;
10. Eliminare il sovrantante, facendo attenzione allo spostamento del pellet;
11. Lavare il pellet con 1X del volume di partenza di etanolo 75% (1 ml);
12. Centrifugare a 8.000 x giri per 5 minuti a 4-25°C. Se l'RNA non forma un pellet compatto ripetere la centrifugazione a 12.000 x giri per 5 minuti per consolidare il pellet sul fondo della provetta;
13. Eliminare il sovrantante e far asciugare il pellet per 3-5 minuti, ma senza lasciare che l'RNA asciughi completamente;
14. Risospendere 5µl di RNA in 65 µl di acqua DEPC (Di-Etil-Piro-Carbonato) senza RNAsi per l'analisi spettrofotometrica. Vortexare brevemente o pipettare ripetutamente per aiutare la ri-sospensione;
15. Congelare per conservare a -80°C.



Figura 12: Foto raffigurante la separazione in fase acquosa incolore (parte trasparente) contenete l'RNA, interfase, contenente le proteine denaturate e fase fenolica (parte rosa), contenente proteine solubili e DNA.

6.1.1 Quantificazione dell'RNA e valutazione della purezza

La quantificazione dell'mRNA ottenuto è un passaggio di valutazione fondamentale, che va effettuato prima della retrotrascrizione. L'mRNA è stato valutato mediante spettrofotometro, uno strumento che legge la densità dell'RNA e la converte direttamente in mg di RNA.

È stato utilizzato uno spettrofotometro a goccia *BioSpectrometer (Eppendorf)*. Ad ogni dosaggio è stata innanzitutto pulita la superficie superiore e inferiore dell'ottica del sistema pipettando 2-3 ml di acqua deionizzata pulita. È stato quindi chiuso il braccio di leva per far entrare in contatto l'acqua deionizzata con le superfici. Successivamente il braccio è stato sollevato e si sono pulite entrambe le superfici ottiche con carta pulita e asciutta. A questo punto si è potuto aprire il *software* e selezionare l'applicazione per l'acido ribonucleico. Si è eseguita una prima misurazione a vuoto pipettando 1 μ l di H₂O sulla superficie inferiore dell'ottica, quindi si è selezionato "vuoto" e si è fatta partire la misurazione. Una volta che la misura vuoto è stata completata, si sono pulite nuovamente le superfici ottiche con la carta

e si è proseguito con le misurazioni dei campioni di RNA, scegliendo una costante (40) per calcolare la concentrazione.

Si sono dispensati 2 μl di campione di RNA sul piedistallo più basso e si è chiuso il braccio. Come bianco è stata usata solo H_2O DEPC. La misura ottenuta è volume indipendente, per cui il campione ha solo bisogno di colmare il divario tra le due superfici ottiche. Si è poi selezionato “misura”, così che il *software* potesse calcolare i rapporti di concentrazione e purezza dell'RNA. A seguito della misurazione si è controllata l'immagine spettrale per valutare la qualità del campione.

Per valutare accuratamente la purezza del campione devono essere analizzati i rapporti tra assorbanza (A) 260/280, che è un indice della contaminazione da proteine, in combinazione con la complessiva qualità spettrale. Un corretto rapporto di assorbanza 260/280 per l'RNA è compreso tra i valori 1,80 e 2,00. Rapporti di purezza significativamente differenti indicano la presenza di proteine o altri contaminanti che assorbono fortemente a 280 nm. La purezza di tutti i campioni da noi ottenuti è stata nel *range* atteso.

6.2 Retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA

Prima di procedere con la Real Time PCR è necessario eseguire la retrotrascrizione dell'mRNA, che consente di ottenere DNA complementare (*complementary DNA*) a singolo filamento (cDNA), che verrà utilizzato nella reazione di Real Time PCR, mediante trascrittasi inversa (una DNA polimerasi RNA-dipendente). La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita usando il kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem)*.

Il protocollo usato per eseguire la retrotrascrizione è stato il seguente:

1. Risospendere 1 μg di mRNA in H_2O DEPC per ottenere un volume finale di 10 μl , a cui si aggiungono 10 μl di *Master Mix*, contenete l'enzima DNA polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa o retrotrascrittasi), insieme a buffer di reazione (soluzione tampone), mix dei dNTPs (deossiribonucleotidi

trifosfato) e sequenze di *random primers* che fungono da innesco (Tabella 6);

2. Prima fase in termociclatore per 10 minuti a 25°C, per consentire l'appaiamento dei *primers* con le sequenze complementare dell'mRNA (fase di *annealing*);
3. Seconda fase in termociclatore per 2 ore a 37°C, per favorire le reazioni di polimerizzazione ad opera della trascrittasi inversa;
4. Terza fase in termociclatore per 5 minuti a 85°C per ottenere la denaturazione dell'enzima e terminare la retrotrascrizione;
5. Quarta fase per 5 minuti a 4°C;
6. Congelamento a -20°C una volta ottenuto il cDNA.

Componenti della Master Mix	Concentrazione
10X RT Buffer	2µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8µl
10X RT Random Primers	2µl
Multiscribe Reverse Transcriptase	1µl
RNase Inhibitor	0,2µl
Nuclease-free H ₂ O	4µl
Totale Master Mix	10µl

Tabella 6: composizione delle Master Mix.

6.3 Real Time PCR (Real Time - Polymerase Chain Reaction) o qPCR (PCR quantitativa)

La Real Time PCR o PCR quantitativa (qPCR) è un metodo di analisi molecolare che serve per amplificare e quantificare un campione di DNA, grazie alle reazioni a catena della DNA-polimerasi. Con la Real Time PCR siamo in grado di quantificare i livelli di espressione di specifici RNA per misurare l'espressione relativa di un determinato gene in un tempo specifico all'interno di una cellula di un particolare tipo di tessuto.

Il numero di copie di cDNA viene amplificato ad ogni ciclo di reazione in modo esponenziale, ma l'efficienza di tale reazione tende a diminuire nelle fasi più tardive delle reazioni, in quanto si esauriscono le disponibilità dei reagenti, fino ad arrivare a una fase di plateau in cui il cDNA non viene più amplificato (*Figura 13*).

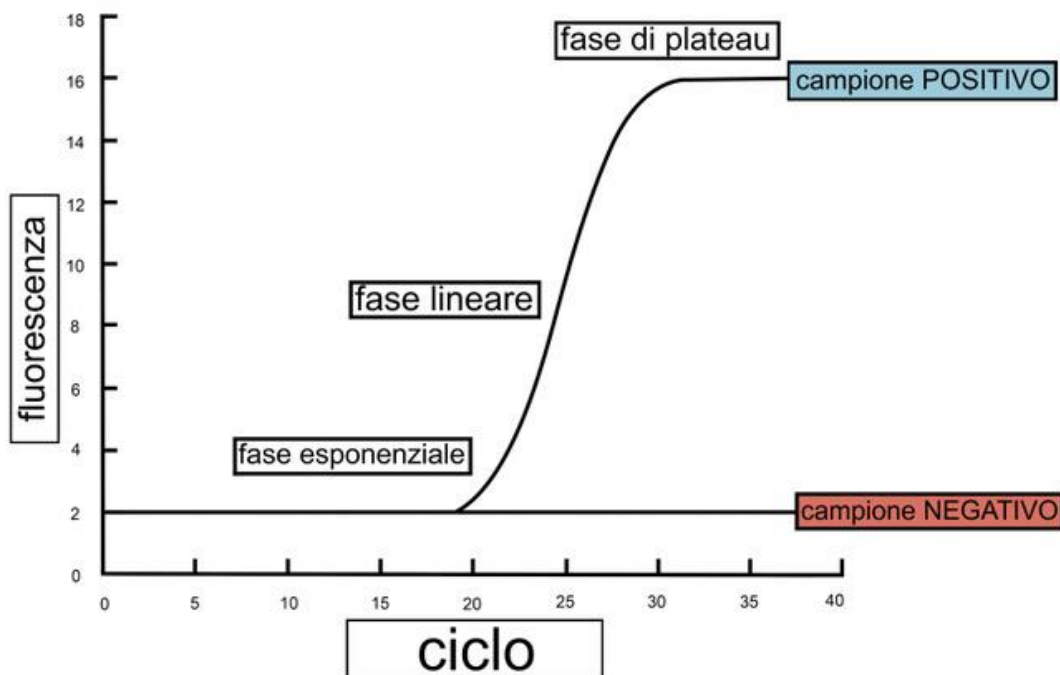


Figura 13: Esempio di curva logaritmica indicante le fasi che avvengono durante la reazione di amplificazione (ad ogni ciclo). Sull'asse delle ascisse si hanno i numeri di cicli, mentre su quella delle ordinate il grado di fluorescenza. Un campione risulta negativo quando non si ha reazione di amplificazione in nessun ciclo e quindi non si ha una lettura del segnale di fluorescenza. Un campione risulta positivo quando passa per una fase esponenziale, fase lineare, fino a raggiungere, con l'avanzare dei cicli, la fase di plateau (Liberamente tratto da (Life technologies corporation, 2012).

6.3.1 Reagenti per la rivelazione (fluorescenza)

Per permettere la quantificazione del DNA bisogna includere l'uso di coloranti fluorescenti che si intercalano nel dsDNA. Viene quindi incorporato un *marker* fluorescente nel prodotto della PCR che invia un segnale proporzionale al numero di molecole di amplicone generate nella fase esponenziale. Nel nostro esperimento è stato utilizzato il reagente *SYBR Green*, un colorante per DNA a doppio filamento. Emette fluorescenza solo quando si lega al dsDNA, assorbendo luce blu a lunghezza d'onda di 488 nm ed emettendo luce verde a una lunghezza d'onda di 522 nm. L'intensità del segnale di fluorescenza dipende dalla quantità di dsDNA presente ed è proporzionale alla concentrazione di dsDNA. Tuttavia, può rivelare anche prodotti aspecifici, infatti possiede altri picchi di assorbimento, seppure più deboli, nella regione dell'ultravioletto (284 nm e 382 nm).

6.3.2 Fasi della Real Time PCR

I principi fondamentali di analisi e i principali vantaggi della Real Time PCR sono la possibilità di monitorare e quantificare le reazioni in tempo reale, ossia ad ogni ciclo di amplificazione, nonché di determinare in modo quantitativo la fase esponenziale di amplificazione, inoltre ha una maggiore sensibilità e un minore possibilità di errori rispetto alla PCR standard. È possibile determinare la quantità iniziale di gene *target* in maniera molto precisa.

La reazione della PCR è data da cicli termici ripetuti con lettura del segnale di fluorescenza che porta ad accumulo del prodotto di amplificazione (amplicone). La reazione è costituita da tre fasi, ripetute per 40 cicli:

1. Fase di denaturazione o *melting* (dissociazione): è la fase iniziale e dura 1 minuto a 95°C. Durante questa fase i due filamenti del DNA si dissociano. Durante la prima fase di denaturazione i campioni vengono mantenuti a 95°C per 20 secondi, in modo da permettere alla DNA-polimerasi di attivarsi;
2. Fase di *annealing*: è la fase di appaiamento dei *primers*. Ha una durata di 20 secondi a una temperatura di 60°C. La temperatura di questa fase si basa sulla T_m dei *primers* -5°C. Durante la fase di *annealing* vengono utilizzati i due *primers* (*Forward* e *Reverse*) che si legano ai loro siti specifici. I *primers*

che si appaiano con il filamento stampo formano legami più stabili. In questo tratto di doppia elica si lega la DNA-polimerasi, che inizia a copiare il filamento stampo;

3. Fase di estensione o di amplificazione: per 60 secondi a 70-72°C. La temperatura dipende dalla DNA-polimerasi. In questa fase la DNA-polimerasi estende i *primers* aggiungendo le basi complementari all'estremità 3', formando due copie di DNA a doppio filamento;
4. Al termine della fase di estensione si ha la lettura del segnale di fluorescenza, che avviene ad ogni ciclo. Il singolo ciclo termina e inizia il successivo. La quantità di DNA ottenuto si misura dopo ogni ciclo grazie ai marcatori fluorescenti.

La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando il kit *Power Up SYBR Green Master Mix* in aggiunta ad ogni set di *primers* specifico per ogni *marker* (Tabella 7) nel termociclatore *StepOne*. I campioni di reazione sono composti da 8µl di cDNA a cui sono stati aggiunti 12µl di *Master Mix* con una miscela di *primers forward* e *reverse* di ciascun gene alle concentrazioni indicate in Tabella 7.

Nel nostro caso si è effettuata una Real Time PCR *fast*, in cui le fasi di *annealing* e di estensione si eseguono alla stessa temperatura, di 60°C.

Gene	Sequenza Primer	Concentrazione
GAPDH	FWD: CAAGGCTGTGGGCAAGGT REV: GGAAGGCCATGCCAGTGA	300 nM
ACAN	FWD: GACCACTTTACTCTTGCCGTTTG REV: GTCAGGGTCTGAAACGTCTACTGA	500 nM
COL2A1	FWD: CTGGTGATGATGGTGAAG REV: GTAACCTCTGTGACCTTTG	300 nM
COL1A1	FWD: AGAAGAAGACATCCCAGCAGTCA REV: CAGGGCTCGGGTTTCCATA	500 nM
HIF1a	FWD: AAGCTTTGGATGGTTTTGTTA REV: GTACTTCCATGTTGCAGACTTTAT	300nM
SOX9	FWD: CAGGTGCTCAAGGGCTACGA REV: GACGTGAGGCTTGTTCTTGCT	300 nM
RUNX2	FWD: CCCGTGGCCTTCAAAGTG REV: TGACAGTAACCACAGTCCCATCTG	300 nM

Tabella 7: Dettagli delle sequenze dei primers utilizzati.

Al termine di ogni ciclo di PCR viene eseguita dal sistema una *Melting curve analysis*.

6.3.3 Melt curve

La curva di Melting (o curva di dissociazione) è una curva che fornisce un profilo del segnale di fluorescenza in funzione della temperatura. Indica in che ciclo e a che temperatura avviene l'*annealing* e se sono avvenuti distacchi e attacchi su siti aspecifici con conseguente formazione di dimeri. Permette di riconoscere la presenza di strutture a doppio filamento che non corrispondono all'amplicone di interesse. Le temperature di melting delle strutture secondarie risulteranno differenti e inferiori rispetto a quelle dell'amplicone di interesse. Al termine dei 40 cicli di PCR si innalza la temperatura da 60°C a 95°C in modo da ottenere eventuali curve differenti da quella desiderata (Figura 14).

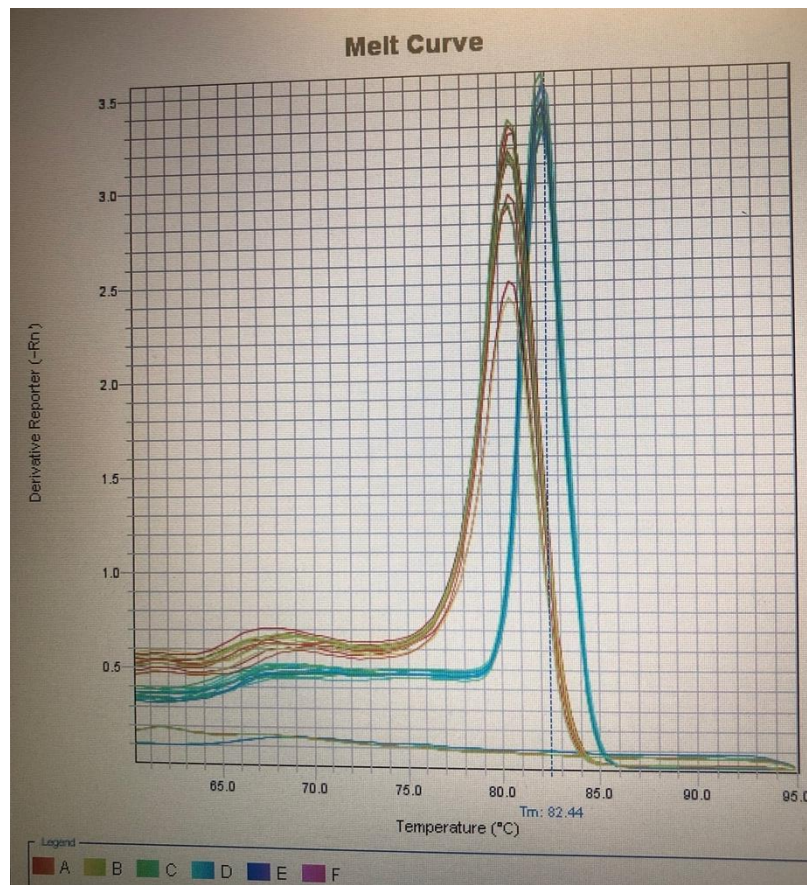


Figura 14: Immagine rappresentativa di una Curva di Melting da risultati ottenuti mediante RT-PCR dall'esperimento oggetto di questo studio.

6.3.4 Sistema $\Delta/\Delta C_t$

La quantificazione usata è quella relativa, ossia la quantificazione dell'espressione genica del campione in relazione all'espressione genica in un campione di riferimento, utilizzando un gene "*housekeeping*" per la normalizzazione e per controllare la variabilità sperimentale. In questo modo possiamo determinare l'incremento o il decremento (*fold change*) dell'espressione del gene di interesse.

Risulta essere fondamentale che le efficienze (E) di amplificazione, ossia le capacità delle reazioni di amplificazione di procedere con un raddoppiamento del numero di molecole ad ogni ciclo durante la fase esponenziale (2^n), del gene target e del gene HK siano comparabili. È necessario quindi generare e valutare due curve standard, una per il gene target e una per il gene HK.

Le due curve standard vengono valutate secondo i seguenti parametri:

1. Pendenza (*slope*): la pendenza della fase logaritmica-lineare della reazione di amplificazione, da cui si definisce l'efficienza (100%). Per essere definita efficiente la reazione di amplificazione deve possedere $90\% < E < "110\%"$, che corrisponde a $-3.58 (-3.34) < slope \text{ del gene di interesse} < 3.10 (-3.31)$;
2. Coefficiente di correlazione (R^2): è la misura dell'interpolazione dei dati sulla retta. Se risulta 1 è perfetto, ma vengono accettati anche valori tendenti a 1 ($>0,96$).
3. Efficienza (E): viene accettata un'efficienza di $90\% < E \text{ del gene di interesse} < "110\%"$.

Bisogna inoltre valutare le differenze tra le curve standard (ΔC_t), rilevabili nel parametro della pendenza. La differenza di pendenza ideale sarebbe 0, ma normalmente si considerano valide anche pendenze ≤ 0.1 o ≥ 0.1 .

I geni "*housekeeping*" non devono variare significativamente al variare delle condizioni sperimentali. Nel presente studio il livello di espressione di ogni gene è stato normalizzato per la quantità di GAPDH espresso come "*Relative Quantity*" (RQ), calcolato in relazione al controllo senza siero in normossia dello stesso esperimento.

La quantificazione (C_t) indica a quale ciclo il *primer* inizia ad amplificare. Per avere elevata accuratezza l'amplificazione deve avvenire nella parte precoce della fase esponenziale, in cui tutti i reagenti sono in eccesso, la DNA-polimerasi è altamente efficiente e il prodotto di DNA amplificato non compete con i *primers*. Il gene viene considerato non espresso quando il *primer* inizia ad amplificare dal ciclo numero 35 o superiore.

Per determinare la concentrazione del gene di interesse mediante quantificazione relativa o comparativa è necessario avvalersi del metodo del $\Delta/\Delta C_t$. Bisogna precisare che si tratta di una quantificazione accurata, ma non ad elevata stringenza, in quanto non dipende dalla curva standard.

Per eseguire le analisi si è proceduto nel seguente modo:

1. Si è calcolata la media dei C_t del gene target e del gene HK (GADPH);
2. Si è calcolato il ΔC_t campione e riferimento;
3. Si è calcolato il $\Delta\Delta C_t$ mediante apposita formula, facendo la differenza tra ΔC_t a ciascun passaggio e ΔC_t del passaggio di riferimento:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{campione}) - \Delta C_t(\text{riferimento}),$$

$$\text{dove } \Delta C_t(\text{campione}) = C_t(\text{gene target}) - C_t(\text{gene HK})$$

$$\text{e } \Delta C_t(\text{riferimento}) = C_t(\text{gene target}) - C_t(\text{gene HK})$$

4. Si è calcolata la "Relative Quantity" mediante la formula $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$.

6.3.5 Analisi statistica dei dati

I dati sono stati presentati come media \pm deviazioni standard (SDs) mediante foglio di lavoro Excel ed analizzati con *Student's t-test*. Le differenze tra i campioni sono state considerate statisticamente significative per $p < 0,05$, relativamente alle condizioni +FCSN, +FCSI, -FCSN e -FCSI (normossia N e ipossia I). Non è stato possibile invece effettuare una comparazione tra le due differenti metodiche di semina.

RISULTATI

1 Valutazione dell'espressione genica di markers differenziativi/sdifferenziativi in condrociti seminati in adesione su plastica

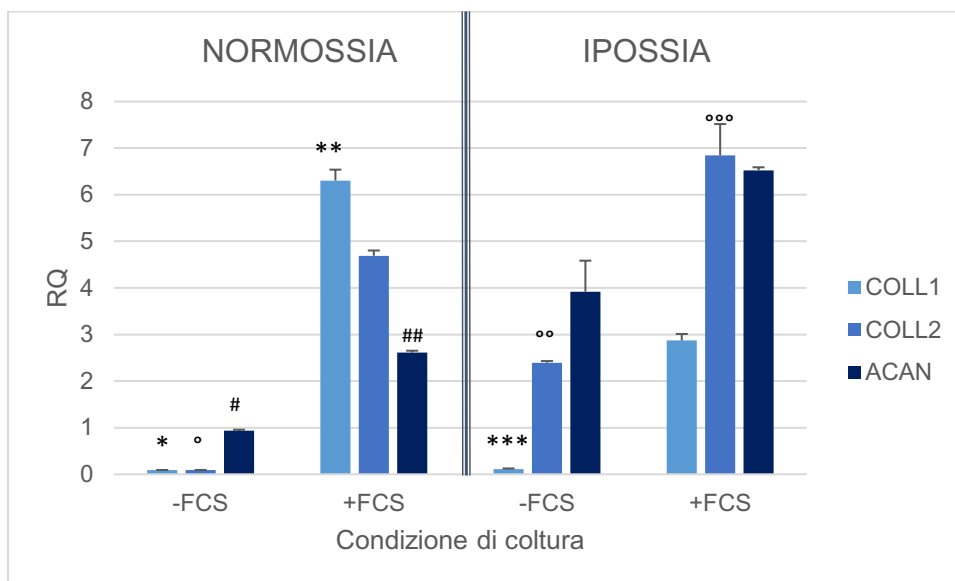


Grafico 1: Espressione di Collagene tipo I, Collagene tipo II e Aggrecano in condrociti seminati in adesione su plastica in normossia (20% di ossigeno) e ipossia (5% di ossigeno) in assenza e in presenza di FCS10% dopo due settimane di coltura.

*COLL1: -FCSN Differenze statisticamente significativa verso +FCSN

**COLL1: +FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

***COLL1: -FCSI Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

°COLL2: -FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSN

°°COLL2: -FCSI Differenza statisticamente significativa verso -FCSN

°°°COLL2: +FCSI Differenza statisticamente significativa verso -FCSI

#ACAN: -FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSN

##ACAN: +FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

L'espressione del Collagene tipo I in presenza di FCS10% è più elevata nella condizione di coltura in normossia rispetto alla condizione di ipossia, mentre si riduce drasticamente in assenza di FCS, tanto in normossia quanto in ipossia, senza differenze sostanziali tra le due condizioni (*Grafico 1*).

Il Collagene tipo II è maggiormente espresso in ipossia, rispetto alla normossia, sia in presenza che in assenza di FCS10%; inoltre, in assenza di FCS10% il Collagene tipo II è meno espresso rispetto alla condizione con FCS10% in entrambe le condizioni (*Grafico 1*).

L'Aggrecano è maggiormente espresso in condizioni di ipossia rispetto alla normossia, sia con che senza FCS; anche in normossia l'espressione di Aggrecano è più elevata quando vi è l'aggiunta di FCS10% rispetto a quando esso non viene aggiunto al sistema di coltura (*Grafico 1*).

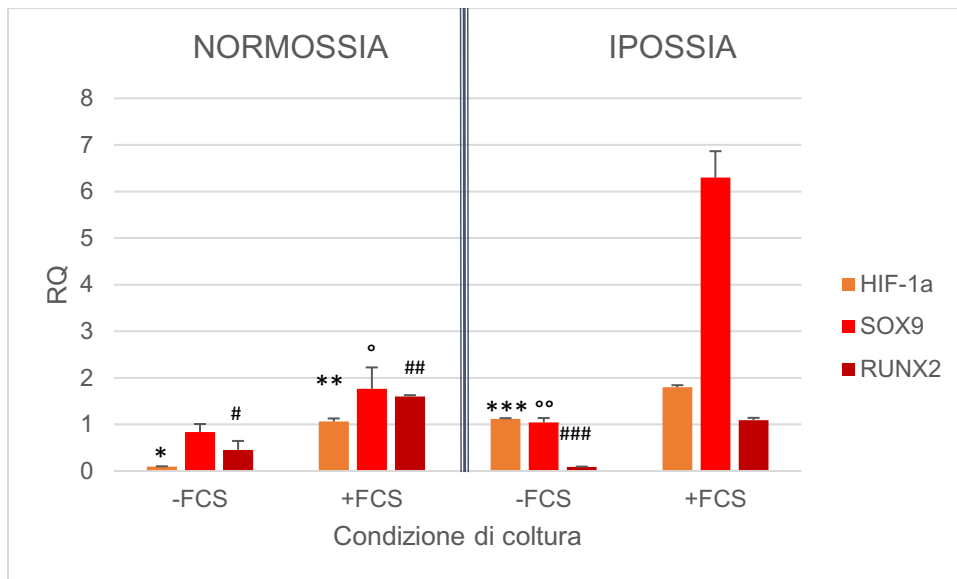


Grafico 2: Espressione dei markers HIF-1 α , Sox-9 e Runx-2 in condrociti seminati in adesione su plastica in normossia (20% di ossigeno) e ipossia (5% di ossigeno) in assenza e in presenza di FCS10% dopo due settimane di coltura.

*HIF-1 α : -FCSN Differenza statisticamente significativa verso -FCSI

**HIF-1 α : +FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

***HIF-1 α : -FCSI Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

°SOX9: +FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

°°SOX9: -FCSI Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

#RUNX2: -FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSN

##RUNX2: +FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

###RUNX2: -FCSI Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

L'espressione genica di HIF-1 α in presenza di FCS10% è maggiore nella condizione di ipossia rispetto alla normossia e rispetto alla condizione di ipossia in assenza di siero. In normossia HIF-1 α è scarsamente espresso in assenza di FCS10%, mentre in presenza di FCS10% mantiene livelli simili a quelli presenti in assenza di FCS nella condizione di ipossia (Grafico 2).

L'espressione di Sox9 in terreno arricchito con FCS10% in ipossia è molto elevata e maggiore rispetto a tutte le altre condizioni, decresce invece in normossia.

L'espressione di Sox9 è molto bassa in assenza di FCS, senza differenze significative tra normossia e ipossia (*Grafico 2*).

Runx2 è scarsamente espresso in assenza di FCS, rispetto alla condizione con FCS10%; Runx2 si esprime maggiormente in normossia rispetto all'ipossia, dove raggiunge livelli molto bassi (*Grafico 2*).

2 Valutazione dell'espressione genica di markers differenziativi/sdifferenziativi in condrociti seminati in idrogel di alginato di Sodio (beads)

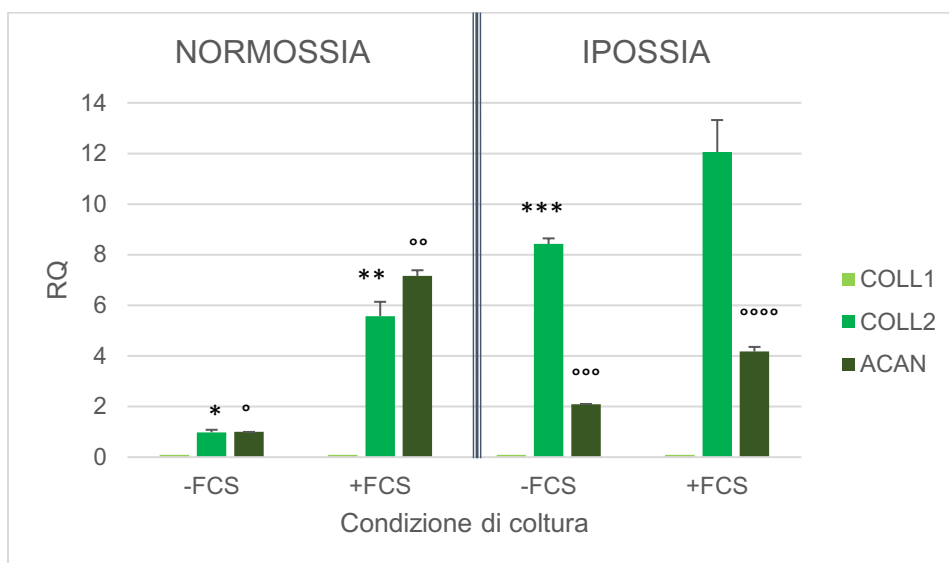


Grafico 3: Espressione di Collagene tipo I, Collagene tipo II e Aggrecano in condrociti seminati in idrogel di alginato di Sodio (beads) in normossia (20% di ossigeno) e ipossia (5% di ossigeno) in assenza e in presenza di FCS10% dopo due settimane di coltura.

*COLL2: -FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSN

**COLL2: +FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

***COLL2: -FCSI Differenza statisticamente significativa verso -FCSN

°ACAN: -FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSN

°°ACAN: +FCSN Differenza statisticamente significativa verso -FCSI

°°°ACAN: -FCSI Differenza statisticamente significativa verso -FCSN

°°°°ACAN: +FCSI Differenza statisticamente significativa verso +FCSN

L'espressione di Collagene tipo I è pressochè assente in tutte le condizioni di coltura (Grafico 3).

L'espressione del Collagene tipo II è maggiore nelle condizioni di ipossia rispetto alla normossia, sia in assenza che in presenza di FCS, in particolare raggiunge una più elevata espressione in presenza di FCS10% in rapporto alla stessa condizione in assenza di siero. In normossia l'espressione di Collagene tipo II in presenza di FCS10% è molto più elevata che in assenza di FCS (*Grafico 3*).

L'Aggrecano è maggiormente espresso nelle in presenza di FCS10% in condizione di normossia, mentre decresce nelle altre condizioni, rispettivamente in ipossia con e senza FCS10% e in normossia in assenza di siero, dove raggiunge i valori più bassi. In assenza di FCS l'espressione di Aggrecano risulta maggiore in ipossia rispetto alla normossia (*Grafico 3*).

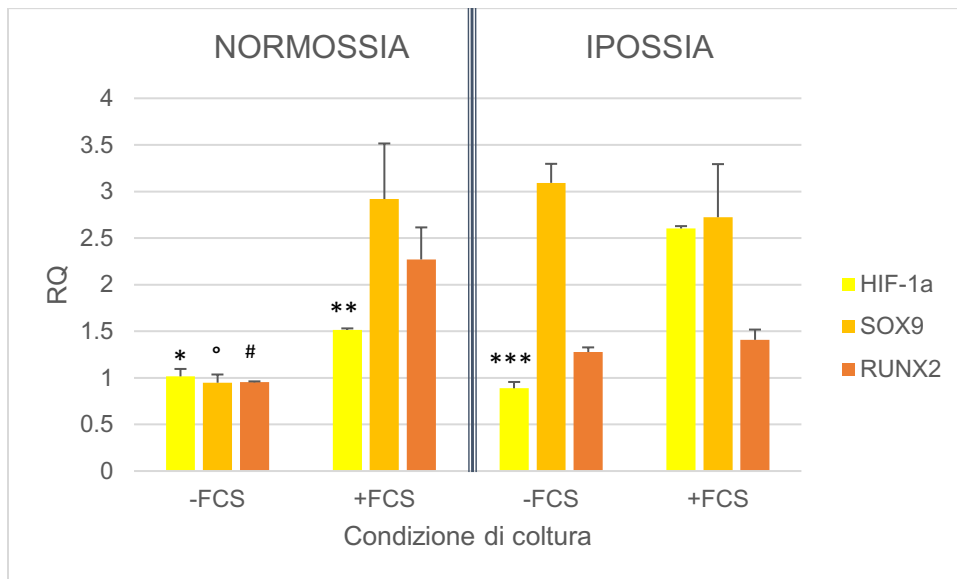


Grafico 4: Espressione di HIF-1 α , Sox-9 e Runx-2 in condrociti seminati in idrogel di alginato di Sodio (beads) in normossia (20% di ossigeno) e ipossia (5% di ossigeno) in assenza e presenza di FCS10% dopo due settimane di coltura.

*HIF-1 α : -FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSN

**HIF-1 α : +FCSN Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

***HIF-1 α : -FCSI Differenza statisticamente significativa verso +FCSI

°SOX9: -FCSN Differenza statisticamente significativa verso -FCSI

#RUNX2: -FCSN Differenza statisticamente significativa verso -FCSI

HIF-1 α in presenza di FCS10% risulta essere maggiormente espresso in condizione di ipossia rispetto alla normossia, mentre senza FCS l'espressione di HIF-1 α presenta valori minori rispetto ad entrambe le condizioni con FCS, con valori più elevati in normossia che in ipossia (Grafico 4).

L'espressione di Sox9 si mantiene a livelli elevati e senza differenze significative in tutte le condizioni, ad eccezione di quella in normossia in assenza di FCS, che risulta significativamente inferiore. Infatti, in assenza di FCS l'espressione di Sox9 aumenta in ipossia rispetto alla normossia (Grafico 4).

Runx2 si esprime maggiormente nella condizione di normossia con FCS10% e decresce in ipossia con FCS10%, mentre in assenza di FCS si mantiene più elevata in ipossia che in normossia (Grafico 4).

DISCUSSIONE

In corso di patologie che determinano danno cartilagineo, con il termine “riparazione tissutale” si intende il ripristino di alcune funzioni proprie della cartilagine, mediate dall’interposizione di un tessuto neoformato di diversa natura che riempie il sito di lesione (Liije Zhang, 2009). Nel caso della cartilagine articolare, il tentativo riparativo porta alla formazione di tessuto fibrocartilagineo, che possiede scarse capacità meccaniche, insufficienti a sopportare le forze compressive e meccaniche che vengono esercitate sulle articolazioni.

Per contro, il termine “rigenerazione” definisce un processo che non solo porta al ripristino delle normali funzioni della cartilagine articolare lesionata, ma che esita anche nella formazione di un nuovo tessuto che è indistinguibile da quello originale (Liije Zhang, 2009).

La cartilagine articolare, tessuto oggetto del presente studio, possiede una scarsa capacità di rigenerazione tissutale, soprattutto a causa della mancanza di vascolarizzazione, che impedisce la migrazione delle cellule progenitrici nonché dei condrociti residenti nel sito danneggiato (C. Vinatier, 2016); inoltre, quando i condrociti sono indotti a proliferare in vitro tendono a perdere il loro fenotipo specifico.

L’utilizzo di impianti di condrociti autologhi (ACI) in ambito equino e, in particolar modo, nel cavallo sportivo, rappresenta una tecnologia che sta prendendo sempre più piede ed è molto promettente per la riparazione della cartilagine danneggiata in corso di patologie articolari.

La tecnica ACI consiste nell’impianto di condrociti autologhi che vengono espianati da un’area articolare sana e di non carico dello stesso paziente e poi amplificati *in vitro*. Questo permette di ottenere una quantità elevata di condrociti partendo da un piccolo prelievo di tessuto. I vantaggi che questa tecnica ha portano risiedono principalmente nella possibilità di riparare un difetto cartilagineo con cartilagine di tipo ialino e non con tessuto fibrocartilagineo.

Però, durante le fasi di espansione *in vitro*, la tendenza dei condrociti è quella di de-differenziarsi verso un fenotipo *fibroblast-like*, perdendo le loro caratteristiche di sintesi di matrice specifica all'aumentare dei passaggi in coltura.

Quindi, considerando le caratteristiche della tecnica ACI, è evidente che un limite importante di tale terapia è dovuta proprio al fatto che, durante l'espansione dei condrociti *in vitro* in strutture monostrato, la popolazione cellulare tenda a perdere il suo fenotipo caratteristico; ciò può influenzare in maniera importante la qualità del tessuto neoformato dopo l'impianto delle cellule.

Per questo motivo si è successivamente sviluppata la tecnica di impianto dei condrociti all'interno di strutture tridimensionali, o *scaffold*, di biomateriali che favoriscano la distribuzione dei condrociti, che fungano da supporto meccanico e anche da stimolo differenziativo ai condrociti articolari (C. Vinatier, 2016).

La perdita del differenziamento è valutabile in base al cambio nell'espressione del collagene, che passa dal tipo II al tipo I e III. Ciò nonostante, è possibile ottenere il re-differenziamento dei condrociti espansi ricollocandoli in *scaffold* tridimensionali o modulando il microambiente in cui vivono i condrociti in coltura, simulando il più possibile le condizioni chimico-fisiche del microambiente naturale.

Le ultime ricerche nel campo dell'ingegneria tissutale per il trattamento dei difetti cartilaginei hanno inoltre dimostrato che l'espressione dei geni della matrice, in particolare, vengono influenzati dai biomateriali usati come matrici, dalle condizioni delle cellule in coltura e da fattori correlati alle citochine (Peter Bernstein, 2009).

Il presente studio è stato condotto sulla base della conoscenza delle condizioni fisiologiche in cui il tessuto cartilagineo articolare si trova *in vivo*. La cartilagine articolare è un tessuto avascolarizzato, per cui l'apporto di ossigeno derivato dalla diffusione tramite il liquido sinoviale e dell'osso subcondrale, e quindi il tessuto funziona a concentrazione di ossigeno più bassa rispetto al resto dei tessuti (Sirong Shi, 2016).

Quindi, sulla base della considerazione che l'ECM in cui vivono i condrociti nel tessuto nativo contiene solo bassi livelli di ossigeno, molti studi colturali sono stati

condotti in condizioni di ipossia, considerandola una strategia utile alla restaurazione del fenotipo differenziato (Elise Duval, 2009).

Negli ultimi anni, un crescente numero di evidenze scientifiche ha dimostrato come una condizione di ipossia e il fattore inducibile dall'ipossia (HIF-1 α) giochino un ruolo fondamentale sia nella condrogenesi sia nella sopravvivenza e nel mantenimento fenotipico dei condrociti, tanto *in vivo* come *in vitro*, mediante la risposta trascrizionale all'ipossia. Unendo insieme queste conoscenze, si suppone che l'ipossia sia un fattore significativo per il mantenimento del fenotipo condrocitario (Sirong Shi, 2016).

L'ipotesi di lavoro è che la tensione di ossigeno potesse influenzare in modo positivo il potenziale differenziativo dei condrociti, dato che, *in vivo* la cartilagine articolare è un ambiente adattato alle basse tensioni di ossigeno.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di esaminare gli effetti prodotti da una concentrazione di ossigeno del 5% sulla produzione dei geni della matrice (Coll1, Coll2, Aggrecano, HIF-1 α , Sox9 e Runx2) in condrociti maturi isolati da cartilagini articolari di cavallo e coltivati sia in monostrato che in strutture tridimensionali (*beads*), in comparazione con gli effetti prodotti dalla normale tensione di ossigeno atmosferica, ossia il 20%, usata nei comuni incubatori cellulari. Nel nostro studio abbiamo analizzato diversi *markers* di fattori di crescita, correlati all'ipossia, alla differenziazione cellulare e alla condrogenesi, secreti dai condrociti.

L'ipotesi di lavoro si è basata sui risultati di diversi studi riguardanti le condizioni e l'effetto dell'ipossia nella cartilagine articolare. Secondo Grimshaw e Mason (2000) la concentrazione si aggira intorno al 7%, ma i *ranges* variano dal 3% al 9% in un liquido sinoviale non patologico; mentre il *range* può abbassarsi ulteriormente negli strati più profondi dell'articolazione, vicino alla cartilagine articolare. negli strati più profondi della cartilagine articolare, la disponibilità di ossigeno dipende infatti non solo dalla densità dei condrociti, che costituiscono solo l'1-2% della cartilagine articolare nella specie equina, ma anche dal gradiente di diffusione dell'ossigeno (Nicole Schneider, 2007). Nonostante ciò, è stato evidenziato come una concentrazione del 5% di ossigeno sia quella che approssimativamente si avvicina di più ai normali livelli presenti *in vivo* e che non influenza l'omeostasi del pH

condrocitario; al contrario tensioni inferiori al 5% provocano una caduta del pH intracellulare, con conseguente acidificazione (P. I. Milner, 2006). Inoltre, è stato dimostrato da diversi studi che quando i livelli di ossigeno vengono ridotti al 5%, viene inibita anche l'idrossilasi, in questo modo HIF-1 α non viene degradato e può eterodimerizzare liberamente con la subunità HIF- β . Successivamente il complesso può traslocare nel nucleo, legandosi a specifiche sequenze consenso (-RCGTG-) all'interno del promotore dei suoi geni *target* e così attivare la loro trascrizione. Infine, è dimostrato che in condizioni di tensione di ossigeno al 5% si hanno effetti benefici sul differenziamento condrocitario, che risulta molto più rapido rispetto a quando una coltura è esposta al 20% di ossigeno. Inoltre, le basse tensioni di ossigeno stimolano anche la formazione delle reti di Collagene tipo II, uno dei principali *markers* cartilagine specifici (Christopher L. Murphy, 2009).

Esistono molti studi condotti sulla capacità dei condrociti di sopravvivere a diverse tensioni di ossigeno con una eterogeneità di risultati che può essere parzialmente spiegata a causa delle origini differenti delle cellule o della scelta di usare condrociti derivati da cartilagine immatura e non adulta (Nicole Schneider, 2007). Ad esempio, Domm e colleghi hanno utilizzato condrociti di bovino, mentre Duval e colleghi si sono serviti di condrociti di origine umana, mentre il nostro esperimento è stato condotto su condrociti di origine equina (Elise Duval, 2009).

Nel nostro studio, la valutazione del differenziamento o de-differenziamento condrocitario si è basata sull'analisi molecolare dell'espressione genica di *markers* specifici condrocitari, piuttosto che sulla valutazione morfologica delle cellule.

Le colture cellulari sono state seminate sotto due diverse tensioni di ossigeno, normossia (20%) e ipossia (5%), in accordo con gli studi precedenti, su terreni D-MEM semplici e arricchiti di siero fetale bovino al 10%.

Lo studio ha previsto la semina dei condrociti in idrogel di Alginato di Sodio (coltura tridimensionale) e la semina in adesione su plastica e formazione di monostrato, condizione, quest'ultima, che permette la proliferazione dei condrociti.

Infatti, dalle ricerche di ingegneria tissutale è stato dimostrato come le colture di condrociti articolari all'interno di *beads* di alginato offrissero molti vantaggi rispetto

alle colture in monostrato, uno tra i più importanti dovrebbe essere quello di mantenere il fenotipo per lunghi periodi di tempo.

Infatti, quando i condrociti vengono liberati dalla loro matrice e seminati è imperativo controllare molto attentamente le condizioni di coltura per evitare il de-differenziamento. I condrociti, infatti, formano la matrice nella cartilagine articolare e ne depositano strati nei compartimenti pericellulare, territoriale ed interterritoriale. Quando i condrociti vengono separati dalla matrice mediante digestione enzimatica e incapsulati nelle *beads*, vanno a riformare la matrice eterogenea in quantità simili a quelle presenti *in vivo* (Susan Chubinkaya, 2001).

La coltura in monostrato, invece, favorisce la proliferazione condrocitaria e l'espansione numerica dei condrociti, soprattutto in presenza di FCS, ed è la condizione intrinseca della tecnica ACI per avere un adeguato numero di cellule per l'impianto; tale condizione colturale, però, soprattutto se protratta per successive sottocolture, determina una instabilità fenotipica, che con i vari passaggi colturali può portare alla perdita del differenziamento (de-differenziamento) della cellula condrocitaria verso un fenotipo *fibroblast-like*.

Infatti, dai dati generali di confronto tra i due sistemi colturali, come ci si attendeva, si è riscontrato che nella coltura in adesione su plastica si verifica una maggiore espressione dei *markers* de-differenziativi, quali Collagene tipo I e Runx2, e che ciò era più marcato nel campione con il 10% di FCS e in condizione di normossia.

Nel sistema in adesione i risultati ottenuti hanno confermato che i *markers* del fenotipo condrocitario vengono maggiormente amplificati in PCR in terreni arricchiti di siero fetale bovino e in condizione di ipossia.

Ricordiamo che il Collagene tipo II e l'Aggrecano sono i principali componenti della ECM nella cartilagine articolare matura, mentre il Collagene tipo I viene prodotto dalle cellule mesenchimali progenitrici e dagli osteoblasti, quindi un suo aumento nell'espressione genica è indice di de-differenziamento condrocitario (Linda J. Sandell, 2001).

In particolare, per il *marker* Collagene tipo II, è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i campioni espansi in normossia in presenza di FCS

con quelli espansi in normossia, ma in assenza di FCS. Anche in assenza di FCS, il Collagene tipo II mostra un'espressione genica molto maggiore rispetto alla rispettiva condizione in normossia.

L'analisi dei *markers* de-differenziativi ha riportato i seguenti risultati significativi: il Collagene tipo I è stato maggiormente espresso dalle cellule poste in normossia e in presenza di FCS, calando invece in quelle sottoposte all'ipossia. In assenza di siero, tanto in normossia quanto in ipossia, il collagene tipo I non è stato praticamente espresso.

Entrambi i risultati dimostrano come l'ipossia sia uno stimolo molto importante nell'espressione genica di *marker* differenziativi e soprattutto sia limitante l'espressione di *markers* di perdita del differenziamento.

Il marker Aggrecano ha rivelato differenze statisticamente significative per i campioni espansi in normossia senza FCS e quelli espansi in normossia con FCS. Inoltre, si è riscontrata una correlazione altamente significativa tra i campioni espansi in terreni arricchiti con FCS in normossia e quelli espansi in presenza di FCS, ma in ipossia. Una riduzione nell'espressione dell'Aggrecano nelle condizioni senza FCS potrebbe essere correlata al fatto che, in adesione su plastica, gli stimoli siano più di carattere proliferativo piuttosto che differenziativo. Il fatto che anche l'Aggrecano si esprima maggiormente in ipossia invece che in normossia conferma come l'ipossia agisca come fattore positivo sul differenziamento e sul mantenimento del fenotipo condrocitario.

L'analisi dell'espressione genica di HIF-1 α ha evidenziato differenze estremamente significative nei campioni coltivati in normossia e quelli in assenza di FCS in ipossia. Dai risultati ottenuti possiamo evidenziare come l'espressione di HIF-1 α sia dipendente dalla presenza dell'ipossia. Essendo stata esplicita ampiamente l'importanza di tale fattore nel differenziamento del condrocita, risulta evidente che mediante l'utilizzo di sistemi di coltura in ipossia si possa favorirne l'espressione e migliorare la stabilità fenotipica delle cellule condrocitarie.

Dallo studio di Sox9 sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i campioni coltivati in terreni in presenza di FCS in normossia e quelli coltivati in

presenza di FCS in ipossia e tra i campioni seminati in ipossia in assenza di FCS e quelli seminati in ipossia, ma in presenza di FCS.

Infine, Runx2, altro *marker* di de-differenziamento, è stato espresso molto meno, se comparato agli altri *markers*. È stato espresso maggiormente nei campioni coltivati in normossia e in presenza di FCS.

Per quanto riguarda i dati ottenuti dalle analisi dei condrociti seminati in *beads* dai grafici è possibile notare che il Collagene tipo I non è stato praticamente espresso in nessuna delle quattro condizioni sperimentali, mentre il Collagene tipo II è risultato estremamente espresso.

Il Collagene tipo II, infatti, ha restituito un'amplificazione molto elevata nei campioni +FCSI e -FCSI, riducendosi invece in quelli seminati in normossia. Questo dato contribuisce a confermare l'ipotesi dell'importanza dell'ipossia nel mantenimento fenotipico del condrocita.

Entrambi i risultati vanno a supporto dell'ipotesi iniziale, che sosteneva che mediante incapsulamento in *beads* i condrociti riescono a mantenere il proprio fenotipo molto meglio rispetto a quando vengono seminati in adesione. I condrociti coltivati mediante supporto tridimensionale hanno evidenziato un aumento nell'espressione del Collagene tipo II, il che testimonia come tale sistema colturale fornisca un ottimo ambiente per il mantenimento del fenotipo del condrocita.

Runx-2 è stato invece espresso maggiormente nei campioni coltivati in normossia e in presenza di FCS rispetto a quelli coltivati in ipossia, con differenza statisticamente significativa solo per i campioni -FCSN e -FCSI. La sua espressione è meno elevata rispetto ai *markers* differenziativi, fatto che è dovuto alla tipologia di sistema di coltura. Utilizzando un sistema tridimensionale, in questo caso *beads* di alginato di sodio, il microambiente diviene molto più favorevole alla colonizzazione e differenziazione condrocitaria. Tali sistemi tridimensionali favoriscono quindi l'espressione dei *markers* differenziativi rispetto a quelli de-differenziativi, nel nostro caso esemplificati dal Collagene tipo I e da Runx2, entrambi poco espressi.

HIF-1 α è stato maggiormente espresso nei campioni sottoposti a ipossia e alla presenza di FCS, come ci si attendeva. Differenze statisticamente significate si sono

evidenziate tra i campioni -FCSN e +FCSN, tra +FCSN e +FCSI e tra -FCSI e +FCSI.

La sua espressione, nei campioni coltivati in *beads*, è maggiore, a testimonianza di come la struttura tridimensionale permetta di mimare il più possibile le condizioni microambientali presenti nella cartilagine articolare in vivo. In questo modo i *markers* specifici del differenziamento condrocitario riescono a esprimersi meglio. Questi risultati suggeriscono che l'espressione di HIF-1 α sia strettamente influenzata dalle basse condizioni di ossigeno e che, in condizioni di ipossia, esso sia necessario a mantenere il programma di differenziamento condrocitario.

L'Aggrecano, al contrario di quanto avvenuto nei condrociti seminati in adesione, è stato espresso maggiormente in quelli in normossia piuttosto che in quelli in ipossia. Gli studi hanno rivelato differenze statisticamente significative per i campioni -FCSN e +FCSN, -FCSN e -FCSI.

Infine, per Sox-9 l'unico dato statisticamente significativo che si è riscontrato in questa analisi è valido per i campioni -FCSN e -FCSI. L'espressione di Sox-9 è molto importante, poiché una sua perdita si traduce in una concomitante riduzione dell'espressione degli altri *markers* di differenziamento condrocitario, quali Collagene tipo II e Aggrecano (Roy Amarillo, 2007).

Da alcuni studi condotti da Amarillo e colleghi (2007) è stato evidenziato come la regolazione di Sox-9 da parte di HIF-1 α sia necessaria alle cellule precondrogeniche per differenziarsi in condrociti in condizioni di ipossia. In condizioni di ipossia l'espressione di Sox-9 si riduce o viene meno quando si ha una delezione di HIF-1 α (Roy Amarillo, 2007).

Il meccanismo in cui HIF-1 regola l'espressione di Sox-9 è stato studiato in considerazione del fatto che *in vivo* l'espressione di Sox-9 si potesse ridurre insieme a quella dei suoi geni *target*. Si è evidenziato che in ipossia, quando si esegue una deplezione di HIF-1 α , avviene una riduzione nell'espressione di Sox-9 pari al 29%; nelle colture di controllo invece avviene un raddoppio nell'espressione di Sox-9.

Questi risultati indicano che HIF-1 α regola in modo diretto l'espressione di Sox-9. In aggiunta, questa regolazione è necessaria per mantenere l'espressione di altri

markers differenziativi non analizzati nel nostro studio, Sox-5 e Sox-6, in condizioni di ipossia (Roy Amarillo, 2007). Nel nostro esperimento HIF-1 α è stato espresso, sebbene in quantità diverse, in tutte le condizioni di coltura, tanto in adesione quanto in *beads*, e anche Sox-9. In particolare, nei condrociti seminati in *beads* nella condizione +FCSI HIF-1 α e Sox-9 sono espressi nelle stesse quantità.

I risultati ottenuti confermano alcuni studi condotti da Duval e colleghi nel 2009, il cui studio era stato condotto su colture cellulari di condrociti di origine umana seminate in plastica in condizioni di ipossia (5% di O₂); tale studio dimostra come la bassa tensione di ossigeno favorisce il re-differenziamento dei condrociti, dopo che questi erano stati portati al de-differenziamento mediante coltivazione in monostrato al 21% di tensione di Ossigeno. Il dedifferenziamento era stato reso evidente dalla diminuzione di due markers specifici dei condrociti: il Collagene tipo II e l'Aggrecano. Con l'inibizione della degradazione di HIF-1 α era stata promossa la sintesi dei *markers* cartilaginei e prevenuto il dedifferenziamento condrocitario.

Il nostro studio si allinea a tali risultati, in quanto i dati dimostrano che le colture sottoposte a ipossia, in terreni arricchiti con siero, vedono aumentare l'espressione dei *marker* per il Collagene tipo II e l'Aggrecano.

È importante evidenziare che altri esperimenti condotti precedentemente, quali quelli di Grimshaw e Mason (2001) hanno dimostrato invece che il collagene tipo II veniva downregolato in condizioni di ipossia, mentre l'aggrecano non subiva variazioni. Le differenze riscontrate tra i risultati ottenuti potrebbero essere però attribuite alla tipologia di cellule usate per l'esperimento, il momento in cui sono state valutate e la densità cellulare. Infatti, sia il nostro esperimento che quello di Duval e colleghi hanno valutato il grado di differenziamento dopo diverse settimane, mentre Grimshaw e Mason hanno studiato gli effetti della tensione di ossigeno solo dopo 7 giorni di incubazione (Elise Duval, 2009).

Nel nostro esperimento con condrociti che sono stati seminati ed espansi con tecnica di adesione su plastica si conferma l'importanza che ha l'ipossia nel mantenimento del fenotipo specifico condrocitario. Infatti, il Collagene tipo I è stato espresso in maniera molto elevata nelle condizioni +FCS in normossia rispetto alla condizione +FCS in ipossia; al contrario il Collagene tipo II è stato espresso

maggiormente nella condizione di ipossia, confermando l'importanza dell'ipossia nella sopravvivenza condrocitaria e dimostrando come sotto normali condizioni di ossigeno (20%) le cellule tendano a de-differenziarsi e a mostrare un fenotipo tipicamente fibroblastico.

Bisogna far notare come, mediante i nostri esperimenti, si confermi anche l'importanza di associare all'ipossia un terreno arricchito con siero fetale bovino e quindi con fattori di crescita, difatti l'espressione tanto di Collagene tipo I quanto di Collagene tipo II nella condizione -FCSN e -FCSI è nettamente inferiore a quella delle cellule coltivate rispettivamente nelle condizioni +FCSN e +FCSI (*Grafico 1*).

Passiamo ora a una descrizione più dettagliata dei risultati ottenuti dall'espressione genica degli altri *markers* oggetto di studio.

Nell'indagine sull'espressione genica del Collagene tipo II e di Sox-9, abbiamo rilevato che l'ipossia ne determina una sovraespressione, mentre, per quanto riguarda concerne l'aggrecano (ACAN), i risultati ottenuti si sono scostati dalle ipotesi iniziali, in particolare nei condrociti seminati e coltivati nelle *beads*.

Analizzando i dati ottenuti dall'espressione di Aggrecano in condrociti coltivati in adesione su plastica si osserva come la massima espressione del gene si ottenga sempre in condizione +FCS, riducendosi in caso di ipossia in mancanza di siero, fino ad essere quasi non espresso in -FCSN.

Per entrambi i *markers* il nostro esperimento ha riportato risultati in accordo con quanto evidenziato dagli studi condotti da Duval e in disaccordo con quelli di Grimshaw e Mason.

L'espressione genica di HIF-1 α aumenta in modo significativo la sua espressione a basse tensioni di ossigeno in comparazione con i livelli ottenuti in normossia. Questo dato trova conferma nel lavoro di Gelse e colleghi (2008), in cui si pone il razionale che la condrogenesi venga facilitata negli strati più profondi di tessuto cartilagineo riparato, ossia quelli soggetti a ipossia e che fosse stimolata da fattori di crescita che potenziano l'attività di HIF-1 α (Sirong Shi, 2016).

Perciò l'ipossia sembra effettivamente avere un effetto benefico sul mantenimento del fenotipo condrocitario; in tal senso è stato dimostrato che HIF-1 α può mediare l'espressione di altri *markers* coinvolti nella condrogenesi, in particolare Sox9 in particolare (Sirong Shi, 2016).

Schneider e colleghi (2007) hanno invece condotto studi di sopravvivenza cellulare *in vitro* utilizzando condrociti di origine equina, coltivandoli in *beads* di alginato per 11 giorni. Oltre all'ipossia hanno ipotizzato che la sopravvivenza e il mantenimento condrocitario potesse derivare anche da altri fattori associati, quali la concentrazione di glucosio. L'esperimento ha dimostrato che nei condrociti coltivati in *medium* con tensione parziale del 5% e del 21% di ossigeno e con concentrazioni di glucosio di 0,0, 1,0 e 4,5 g/L il tasso di consumo fosse indipendente dalla presenza stessa dell'ossigeno, mentre che a concentrazioni di ossigeno ancora inferiori (1%) la stabilità cellulare fosse ottenuta con 1 g/L di glucosio piuttosto che con un suo eccesso (Nicole Schneider, 2007).

Nelle nostre analisi non sono state contemplate valutazioni sul consumo dell'ossigeno, rifacendoci al fatto che, alle condizioni ambientali e anche secondo quanto evidenziato in letteratura, il tasso di consumo di ossigeno fosse indipendente dalla presenza del glucosio.

Per quanto concerne Sox-9 la sua variabilità nell'espressione potrebbe essere dovuta ad alcune variazioni dell'ambiente cellulare. Inoltre, da studi condotti da Shi e colleghi (2016), è stato evidenziato come l'espressione di Sox9 aumenti in maniera tempo-dipendente (Sirong Shi, 2016).

Runx-2 è espressione di de-differenziamento condrocitario ed è anche uno dei geni coinvolti in alcuni aspetti patogenetici dell'osteoartrite, in quanto viene up-regolato nei condrociti della cartilagine patologica. Runx-2 viene comunque espresso nei condrociti, ma in quantità molto scarse nei condrociti dei siti di riserva e in quelli nello strato proliferativo; al contrario è sovraespresso nei condrociti presenti nello strato pre-ipertrofico della cartilagine. La sua sovraespressione viene anche mantenuta nei condrociti presenti nello strato ipertrofico e terminale. I condrociti proliferanti, invece, sono caratterizzati dall'espressione di Col2a1, come descritto in precedenza (Komori, 2018).

Quindi Runx2 regola positivamente la maturazione degli osteoblasti *in vivo*, mentre inibisce la differenziazione dei condrociti. In conclusione, Runx2 ha funzioni positive nell'osso, ma negative nelle articolazioni di animali adulti (Komori, 2018). Per questi motivi il fatto che si esprima maggiormente nei campioni incubati in normossia piuttosto che in quelli incubati in ipossia permette di gettare le basi per analisi future sulla possibilità di ridurre al minimo l'espressione e in tal modo inibire/rallentare il de-differenziamento dei condrociti coltivati in adesione ai fini della loro espansione per il trapianto.

Le colture espanse di condrociti che vengono incapsulate in *beads* di alginato dovrebbero produrre una matrice simil-cartilaginea, e mantenere il fenotipo stabile per lunghi periodi di tempo. L'ipossia potrebbe essere un ulteriore fattore micro-ambientale che favorisca il persistere di un fenotipo ottimale nelle cellule da impiantare.

CONCLUSIONI

Questo studio si è posto come obiettivo quello di rispondere alle seguenti domanda: “Quanto influisce l’ipossia sul mantenimento del fenotipo condrocitario in colture *in vitro*? L’incubazione in ipossia ha effetti positivi sul differenziamento del condrocita rispetto a quella in normossia?”. A tal fine, è stata condotta un’indagine sperimentale attraverso l’utilizzo di due diverse metodiche di semina, adesione su plastica e *beads* di alginato di sodio, per valutare l’influenza di vari fattori (normossia, ipossia, presenza e assenza di siero fetale bovino al 10%) sull’espressione di *markers* specifici e indicativi del differenziamento o sdifferenziamento condrocitario.

I condrociti, nella cartilagine articolare, si trovano sottoposti a due condizioni permanenti, stress meccanico e ipossia. Sebbene sia ormai accertato che la compressione e il carico applicato alla cartilagine siano potenti regolatori della fisiologia del condrocita, il ruolo dell’ipossia è stabilito con minor certezza.

È stato riscontrato che i condrociti articolari rispondono all’ambiente ipossico con l’*upregulation* dell’espressione dei geni della matrice cartilaginea, a conferma che l’ipossia sia un fattore significativo nel mantenimento del fenotipo condrocitario.

I risultati ottenuti dai diversi esperimenti si dimostrano coerenti con l’aspettativa inizialmente espressa nell’elaborato, secondo la quale l’utilizzo dell’ipossia per l’incubazione di condrociti maturi mediante le nuove tecnologie di ingegneria tissutale permette anche a tali cellule di mantenersi differenziate per tempi più prolungati, rispetto alle comuni condizioni di incubazione. Questo permetterebbe di facilitare l’utilizzo delle tecniche di impianti di condrociti autologhi e allogenicici nel trattamento dell’osteoartrite del cavallo, nonché di ridurre alcuni fattori di rischio, quali il de-differenziamento fenotipico a fibroblasti, cellule di scarsa utilità nella rigenerazione della cartilagine articolare.

I risultati ottenuti dal nostro lavoro di ricerca, sebbene preliminari, sono stati incoraggianti e rispecchiano gli studi precedenti, fondati su ricerche ed esperimenti che sono iniziati già dalla fine del 1900 e che continuano ancora oggi, dato il continuo aggiornamento dei metodi di analisi e il miglioramento delle strutture

colturali in cui è possibile espandere i condrociti, al fine di ottenere un substrato che sia il più simile possibile alle condizioni in cui si trovano *in vivo*.

Il presente studio integra la letteratura già esistente riguardante le nuove tecnologie di ingegneria tissutale e i diversi scopi terapeutici a cui si aspira mediante la coltivazione di condrociti *in vitro*, poiché studi precedenti avevano già fornito una definizione del concetto di ambiente cartilagineo e di rigenerazione cartilaginea. Sulla base di questo studio, si potrebbe procedere con ulteriori prove, rivolte per esempio all'analisi di nuovi *markers* specifici o all'estensione di campioni incubati sotto altre condizioni, per poter essere in grado, infine, di sfruttare al massimo il potenziale rigenerativo condrocitario nella pratica clinica.

Tuttavia, è importante tenere presente che questa ricerca si è concentrata esclusivamente sull'espressione dei principali *markers* che influiscono sul differenziamento condrocitario dei campioni *target*. Variando altri fattori, quali l'origine dei condrociti, la tipologia di *medium*, i tenori di glucosio, la configurazione dello *scaffold* e le influenze crociate tra alcuni fattori di trascrizione studiati, i risultati potrebbero variare.

I risultati ottenuti possono fungere da base per studi futuri incentrati sull'espressione genica di ulteriori *markers*, quali ad esempio Sox-5, Sox-6 e HIF-2 α , in condrociti coltivati in *beads* di alginato di sodio e sottoposti a condizioni di ipossia (5% di ossigeno) su terreni D-MEM arricchiti con FCS al 10%.

Anche i recenti studi di Stegen e colleghi, incentrati sugli effetti metabolici di HIF-1 α a livello condrocitario, offrono spunti di riflessione interessanti; nonché quelli di Schneider, che con la sua ricerca sull'utilizzo del glucosio da parte dei condrociti al di sotto del 5% di ossigeno offre una nuova prospettiva per studi futuri.

Una raccomandazione per ulteriori ricerche future potrebbe essere quella di realizzare uno studio simile a quello presentato per determinare però eventuali differenze di crescita ed espressione genica confrontando le due tecniche di semina: adesione su plastica e *beads* di alginato, analizzabili mediante PCR assoluta, così da concentrarsi su questo elemento specifico per valutare quale struttura favorisca maggiormente l'espressione genica dei *markers* specifici del differenziamento condrocitario.

BIBLIOGRAFIA

A. Muttini C. Vantini, A. Cuomo Arthroscopy in the horse [Articolo] // Veterinary Research Communications. - settembre 2003. - p. 79-83.

A.R. Armiento M.J. Stoddart, M. Alini, D. Eglin Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: learning from biology [Rivista] // Acta Biomaterialia. - 2018. - p. 1-20.

Adamo Sergio Capitolo 7, Tessuto Cartilagineo [Sezione di libro] // Istologia di V. Monesi Sesta edizione / aut. libro Sergio Adamo Paolo Comoglio, Amelio Dolfi, Mario Molinaro, Gianpaolo Papaccio, Gregorio Siracusa, Mario Stefanini, Elio Ziparo. - Padova : Piccin Nuova Libreria S.p.A, 2012.

Andre F. Steinert Steven C. Ghivizzani, Axel Rethwilm, Rocky S. Tuan, Christopher H. Evans, Ulrich Noth Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage [Articolo] // Arthritis Research & Therapy. - 5 giugno 2007.

Barone Robert Anatomia comparata degli mammiferi domestici, Volume 2 - parte 1, Artrologia [Sezione di libro] // Anatomia comparata dei mammiferi domestici. - Milano : Edagricole - edizioni Agricole de Il Sole 24 Ore S.p.a, 2012.

Bhattacharya A. Rahman M., Banu J., Lawrence RA., McGuff HS., Garrett IR, Fischbach M., Fernandes G., Manhart DR, Scott BD, Gibbs PG, Coverdale JA, Eller EM, Honnas CM, Hood DM, Woodward AD, Nielson BD, O'Connor CI, Webel SK, Orth MW. Evidenze scientifiche. Funzione articolare ed esercizio fisico nel cavallo atleta: possibili effetti dell'impiego di acidi grassi omega 3 [Online] // NBF LANES Horse Line. - <https://www.nbflaneshorse.com/funzione-articolare-ed-esercizio-fisico-nel-cavallo-atleta-possibili-effetti-dellimpiego-di-acidi-grassi-omega-3>.

Borghetti Paolo Martini Filippo Maria Patologia sistematica veterinaria [Sezione di libro] // Patologia sistematica veterinaria / aut. libro Marcato Paolo Stefano. - Milano : Edagricole - Edizioni Agricole di New Business Media srl, 2002.

Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [Articolo] // Journal of molecular endocrinology (25). - 2000. - p. 169-193.

C. Vinatier J. Guicheux Cartilage tissue engineering: from biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments [Articolo] // Annals of Physical and Rehabilitation Medicine, 59. - 9 marzo 2016. - p. 139-144.

Camila B. Carballo Yusuke Nakagawa, Ichiro Sekiya, Scott A. Rodeo Basic Science of Articular Cartilage [Online] // sportsmed.theclinics.com. - 2017. - <http://dx.doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.001>.

Centro di Referenza per i metodi alternativi, benessere e cura degli animali da laboratorio dell'istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" Cellule in vitro: uno strumento diagnostico e di terapia avanzata [Online] // Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini" ente sanitario di diritto pubblico. - 25 gennaio 2021. - <https://fad.izsler.it/course/view.php?id=64>.

Chris Kiani Liwen Chen, Yao Jiong Wu, Albert J. Yee, Burton B. Yang Structure and function of aggrecan [Articolo] // Cell research. - 12 marzo 2002. - p. 19-32.

Christopher L. Murphy Brendan L. Thomas, Rasilaben J. Vaghjiani, Jérôme E. Lafont HIF-mediated articular chondrocyte function: prospects for cartilage repair [Articolo] // Arthritis Research & Therapy. - 5 febbraio 2009. - p. 11:213.

Claudia Grimmer Nadine Balbus, Ute Lang, Thomas Aigner, Thorsten Cramer, Lutz Muller, Bernd Swoboda, David Pfander Regulation of Type II collagen synthesis during osteoarthritis by Prolyl-4-hydroxylases [Articolo] // The American Journal of Pathology. - 2 agosto 2006. - p. 491-502.

Cosimo De Bari Francesco Dell'Accio, Przemyslaw Tylzanowski, Frank P. Luyten Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane [Articolo] // Arthritis & Rheumatism. - 8 agosto 2001. - p. 1928-1942, vol. 44.

D.R. Manhart B.D. Scott, P.G. Gibbs, J.A. Coverdale, E.M. Eller, C.M. Honnas, D.M. Hood Markers of inflammation in arthritic horse fed omega-3 fatty acids [Articolo] // The professional animal scientist 25. - 2009. - p. 155-160.

David Pfander Kolja Gelse Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments [Articolo] // Current opinion in Rheumatology. - settembre 2007. - p. volume 19, issue 5, 457-462.

Dipartimento di Medicina Sperimentale - Università di Genova Atlante di istologia: il tessuto connettivo [Online] // istologia.unige.it. - 2011-2019. - <http://www.istologia.unige.it/page13/page35/page41/>.

Donald A. Fowler Hans C.E. Larsson The tissue and regulatory pattern of limb chondrogenesis [Articolo] // Developmental Biology. - 15 maggio 2020. - p. 124-134.

Elise Duval Sylvain Leclercq, Jean-Marc Elissalde, Magali Demoor, Philippe Galéra, Karim Boumédiene Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type II collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation [Articolo] // Arthritis & Rheumatism. - 10 ottobre 2009. - p. 3038-3048.

Ernestina Schipani Heather E. Ryan, Susanna Didricson, Tatsuya Kobayashi, Melissa Knight, Randall S. Johnson Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocytes growth arrest and survival [Articolo] // Genes & development. - 10 settembre 2001. - p. 2865-2876.

Frédéric De Ceuninck Christophe Lesur, Philippe Pastoureau, Audrey Caliez, Massimo Sabatini Culture of chondrocytes in alginate beads [Sezione di libro] // Methods in molecular Medicine, volume 100: Cartilage and Osteoarthritis, Volume 1: Cellular and molecular Tools / aut. libro F. De Ceunink P. Pastoureau, M. Sabatini. - Totowa, NJ : Humana Press Inc., 2004.

Frédéric De Ceuninck Sophie Gauffillier, Anne Bonnaud, Massimo Sabatini, Christopher Lesur, Philippe Pastoureau YKL-40 (Cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes [Articolo] // Biochemical and Biophysical Research Communications. - 27 luglio 2001. - p. 926-931.

Gabriele Bertoni Nicoletta Gagliano, Laura Vizzotto Variazione morfologica e strutturale lungo il decorso della parete aortica umana e di ratto, con particolare riferimento alla componente proteoglicanica altamente solforata della matrice extracellulare [Online] // air.unimi.it. - 2011. - https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/168393/168528/phd_unimi_R08120.pdf.

Henrique M. Neueschwander Juliana J. Moreira, Cynthia P. Vendruscolo, Joice Fulber, Sarah R.T. Seidel, Yara M. Michelacci, Raquel Y.A. Baccarin Hyaluronic acid has chondroprotective and joint-preserving effects on LPS-induced synovitis in horses [Articolo] // Journal of Veterinary Science. - 20 novembre 2019.

Jan Bondeson Arjen B. Blom, Shane Wainwright, Clare Hughes, Bruce Caterson, Wim B. van den Berg The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis [Articolo] // Arthritis & Rheumatism. - 3 marzo 2010. - p. 647-657.

Jingzhou Yang Yu Shrike Zhang, Kan Yue, Ali Khandemhosseini Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering [Articolo] // Acta Biomaterialia. - 15 luglio 2017. - p. 1-25.

Julia Dubuc C. Girard, H. Richard, J. De Lasalle, S. Laverty Equine meniscal degeneration is associated with medial femorotibial osteoarthritis [Articolo] // Equine Veterinary Journal. - gennaio 2018. - p. 133-140.

Komori Toshihisa Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation [Articolo] // Histochemistry and Cell Biology. - 22 Gennaio 2018. - p. 149:313-323.

L. Haywood D.A. Walsh Vasculature of the normal and arthritic synovial joint [Rivista] // Histology and Histopathology. - 2001. - p. 277-284.

L. Kock C.C Van Donkelaar, K. Ito Tissue engineering for articular cartilage: the current status [Rivista] // Cell Tissue Res. - 2012. - p. 613-627.

L. Zhang J. Hu, K.A. Athanasiou The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration [Rivista] // Crit Rev Biomed Eng. - 2009. - p. 1-57.

Laurie R. Goodrich Alan J. Nixon Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review [Articolo] // The Veterinary Journal. - 2006. - p. 51-69.

Life technologies corporation Real-time PCR handbook [Online] // gene-quantification.de. - 2012. - <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.

Liije Zhang Jerry Hu, Kyriacos A. Athanasiou The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration [Articolo] // Critical reviewa in biomedical engineering, volume 7. - 2009. - p. 1-57.

Linda J. Sandell Thomas Aigner Articular cartilage and changes in arthritis an introduction: cell biology of osteoarthritis [Articolo] // Arthritis research. - 22 gennaio 2001. - p. 107-113.

Livia Roseti Giovanna Desando, Carola Cavallo, Mauro Petrella, Brunella Grigolo Articular cartilage regeneration in osteoarthritis [Articolo] // Cells. - 23 ottobre 2019.

Magali Demoor David Ollitrault, Tangni Gomez-Leduc, Mouloud Bouyoucef, Magalie Hervieu, Hugo Fabre, Jérôme Lafont, Jean-Marie Denoix, Fabrice Audigié, Frédéric Mallein-Gerin, Florence Legendre, Philippe Galera Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction [Articolo] // Biochimica et Biophysica Acta. - 6 marzo 2014. - p. 2414-2440.

Mary B. Goldring Kaneyuki Tsuchimoci, Kosei Ijiri The control of chondrogenesis [Articolo] // Journal of cellular Biochemistry. - 2006. - p. 33-44.

McClure S.R. Wang C. A preliminary field trial evaluating the efficacy of 4% polyacrilamide hydrogel in horses with osteoarthritis [Articolo] // Journal of Equine Veterinary Science. - 2017. - p. 98-102.

Nicole Schneider Ange Mouithys-Mickalad, Jean-Philippe Lejeune, Claire Duyckaerts, Francis Sluse, Ginette Deby-Dupont, Didier Serteyn Oxygen consumption of equine articular chondrocytes: influence of applied oxygen tension

and glucose concentration during culture [Articolo] // Cell biology international. - 18 febbraio 2007. - p. 878-886.

Nigel Mabvuure Sandip Hindocha, Daniel Jordan, Wasim S. Khan Chondrogenesis and developments in our understanding [Articolo] // Current Stem Cells Research & Therapy. - 29 aprile 2012. - p. 243-259.

P. I. Milner T. P. A. Fairfax, J. A. Browning, R. J. Wilkins, J. S. Gibson The effect of O₂ tension on pH homeostasis in equine articular chondrocytes [Articolo] // Arthritis & rheumatism. - 11 novembre 2006. - p. 3523-3532.

P.R.J.V.C. Boopalan Viju Daniel Varghese, Solomon Sathishkumar, Sabareeswaran Arumugam, Vijayaraghavan Amarnath Similar regeneration of articular cartilage defects with autologous & allogenic chondrocytes in a rabbit model [Rivista] // Indian Journal of Medical Research. - 2019. - p. 650-655.

Peter Bernstein Meng Dong, Sylvi graupher, Denis Corbeil, Michael Gelinsky, Klaus-Peter Gunther, Stefan Fickert Sox9 expression of alginate-encapsulated chondrocytes is stimulated by low cell density [Articolo] // Journal of biomedical materials research part A. - dicembre 2009. - p. 92 (3): 910-8.

Ran Duan Hui Xie, Zheng-Zhao Liu The role of autophagy in osteoarthritis [Articolo] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. - 25 novembre 2020. - p. vol. 8.

Riccardo Rinnovati Noemi Romagnoli, Alessandro Spadari Dose-finding study for intraarticular treatment with Stanozolol in horses [Articolo] // Journal of Equine Veterinary Science. - 6 agosto 2015. - p. 1-5.

Richard Kelwick Ines Desantis, Grant N. Wheeler, Dylan R. Edwards The ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family [Articolo] // Genome Biology. - 30 maggio 2015. - p. volume 16, articolo numero 113.

Ronald K. Myers M. Donald McGavin Le risposte cellulari e tissutali ai danni [Sezione di libro] // Patologia generale veterinaria / aut. libro M. Donald McGavin James F. Zachary. - Milano : Edra S.p.A, 2017.

Roy Amarillo Sergey V. Viukov, Amnon Sharir, Idit Eshkar-Oren, Randall S. Johnson, Elazar Zelzer HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis [Articolo] // Development 134. - 2007. - p. 3917-3928.

S. Stegen K. Laperre, G. Eelen, G. Rinaldi, P. Fraisl, S. Torrekens, R. Van Looveren, S. Loopmans, G. Bultynck, S. Vinckier, F. Meersman, P. H. Maxwell, J. Rai, M. Weis, D. R. Eyre, B. Ghesquière, S. M. Fendt, P. Carmeliet, G. Carmeliet HIF-1 α metabolically controls: collagen synthesis and modification in chondrocytes [Articolo] // Nature. - gennaio 2019. - p. 565 (7740): 511-515.

S-H Lee H. Shin Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering [Rivista] // Advanced drug delivery reviews. - 2007. - p. 339-359.

Shulze-Tanzil Gundula Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair [Rivista] // Annals of Anatomy. - 2009. - p. 325-338.

Sirong Shi Jing Xie, Juan Zhong, Shiyu Lin, Tao Zhang, Ke Sun, Na Fu, Xiaoru Shao, Yunfeng Lin Effects of low oxygen tension on gene profile of soluble growth factors in co-cultured adipose-derived stromal cells and chondrocytes [Articolo] // Cell Proliferation. - 28 marzo 2016. - p. (49), 341-351.

Siyong Yang Jongwan Kim, Je-Hwang Ryu, Hwanhee Oh, Churl-Hong Chun, Byoung Ju Kim, Byoung Hyun Min, Jang-Soo Chun Hypoxia-inducible factor-2 α is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction [Articolo] // Nature medicine, volume 16. - 23 maggio 2010.

Susan Chubinkaya Klaus Huch, Monika Schulze, Lori Otten, Margaret B. Aydelotte, Ada A. Cole Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads [Articolo] // The journal of Histochemistry & cytochemistry, volume 49 (10). - 2001. - p. 1211-1219.

Suzuki Fujio Roles of cartilage matrix proteins, chondromodulin-I and -II, in endochondral bone formation: a review [Articolo] // Connective tissue research, Vol. 35. - 6 febbraio 1996. - p. 303-307.

Tuan Rocky S. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis [Articolo] // Clinical orthopaedics and related research. - 2004. - p. S105-S117.

Tytti M. Niemela Riitta-Mari Tulamo, Kaisa Aaltonen, Satu M. Sankari, Anna K. Hielm-Bjorkman Changes in biomarkers in equine synovial fluid two weeks after intra-articular hyaluronan treatment: a randomised double-blind clinical trial [Rivista] // BMC Veterinary Research. - 2018.

Università del Salento Tessuti Connettivi [Online] // Cla unisalento. - https://cla.unisalento.it/c/document_library/get_file?folderId=10999060&name=DLFE-192887.pdf.

Vitor Hugo Dos Santos Joao Pedro Hubbe Pfeifer, Jaqueline Brandao De Souza, Fernanda De Castro Stievani, Carlos Alberto Hussni, Marjorie De Assis Golim, Elenice Deffune, Ana Liz Garcia Alves Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses [Articolo] // Research in veterinary science. - 24 febbraio 2019. - p. 38-45.

Yaima Campos Amisel Almirall, Gastòn Fuentes, Hans L. Bloem, Eric L. Kaijzel, Luis J. Cruz Tissue engineering: part B, volume 25 [Articolo] // Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society. - 2019.

Yang Shi Jingyun Ma, Xu Zhang, Hongjing Li, Lei jiang, Jianhua Qin Hypoxia combined with spheroid culture improves cartilage specific function in chondrocytes [Articolo] // Integrative biology, volume 7. - marzo 2015. - p. 277-374.

Yeon-Ah Lee Jung Yeon Kim, Seung-Jae Hong, Sang-Hoon Lee, Myunh Chul Yoo, Kyoung Soo Kim, Hyung-In Yang Synovial proliferation differentially affects hypoxia in the joint cavities of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients [Articolo] // Clinical Rheumatology. - 29 marzo 2007. - p. 2023-2029.

Yuki Hikari Chisa Shukunami Chondromodulin-I as a novel cartilage-specific growth-modulating factor [Articolo] // Pediatric Nephrology. - 13 december 1999. - p. 602-605.

Yu-Sheng Li Fang-Jie Zhang, Chao Zeng, Wei Luo, Wen-Feng Xiao, Shu-Guan Gao, Guang-hua Lei Autophagy in osteoarthritis [Articolo] // Joint Bone Spine. - 6 ottobre 2015. - p. 143-148, vol 83.

Zheanto Man Xiaoqing Hu, Zhenlong Liu, Hongjie Huang, Qingyang Meng, Xin Zhang, Linghui Dai, Jiying Zhang, Xin Fu, Xiaoning Duan, Chunyan Zhou, Yingfang Ao Transplantation of allogenic chondrocytes with chitosan hydrogel-demineralized bone matrix scaffold to repair rabbit cartilage injury [Rivista] // Biomaterials. - 2016. - p. 157-167.

Zhongyi Zhao Changjiang Fan, Feng Chen, Yutai Sun, Yujun Xia, Aiyu Ji, Dong-An Wang Progress in articular cartilage tissue engineering: A review on therapeutic cells and macromolecular scaffolds [Rivista] // Macromolecular Bioscience. - 2020.