



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in

Medicina Veterinaria

APPROCCIO ALLE POTENZIALITÀ DELLE MATRICI CARTILAGINEE DECELLULARIZZATE NELLA MEDICINA RIGENERATIVA IN AMBITO MEDICO VETERINARIO

POTENTIAL APPROACH OF DECELLULARIZED CARTILAGE MATRIXES IN RIGENERATIVE MEDICINE FOR THE VETERINARY FIELD

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Ravanetti Francesca

Correlatore: Chiar.mo Prof. Cacchioli Antonio

Laureando: Fambri Davide

Anno Accademico 2020/2021

Indice	
Abstract	4
Riassunto	5
Introduzione	6
Le articolazioni: generalità.....	7
Cartilagine articolare.....	7
La componente collagenica.....	8
Proteoglicani.....	10
Liquido interstiziale.....	12
Regioni della cartilagine articolare.....	12
Altre componenti delle articolazioni sinoviali.....	15
L'articolazione metatarso-falangea.....	17
Fattori predisponenti delle patologie osteo cartilaginee.....	20
Manifestazioni cliniche delle patologie articolari, Zoppia.....	21
Algia.....	23
Possibili esiti delle patologie osteo cartilaginee.....	24
Diffusione e rilevanza economica delle patologie osteo cartilaginee.....	24
Biomarker di danno cartilagineo.....	26
Risposte dei tessuti articolari agli stimoli patogeni.....	27
Meccanismi molecolari di danno cartilagineo.....	29
Osteoartrite: prevalenza e rilevanza dell'osteoartrite.....	32
Fattori predisponenti.....	34
Patogenesi e potenziali biomarker.....	36
Segni clinici e diagnosi.....	41
Opzioni terapeutiche.....	43
Materiali e metodi	48
Raccolta campioni e protocollo di decellularizzazione.....	49

Processazione istologica dei campioni.....	53
Colorazione istologica.....	53
Semina dei condrociti sulla matrice cartilaginea decellularizzata.....	55
Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM).....	55
Risultati	58
Decellularizzazione della matrice: valutazioni morfologiche.....	59
Coltura di condrociti sulle matrici decellularizzate.....	60
Discussione	63
Le matrici: decellularizzazione nella medicina rigenerativa.....	64
Matrici cartilaginee decellularizzate.....	65
Protocolli di decellularizzazione del tessuto cartilagineo.....	69
Alternative alle matrici decellularizzate: terapie cellulari.....	77
Scaffold polimerici.....	81
Conclusioni	88
Bibliografia	89

Abstract

Alterations of articular cartilage in domestic animals can derive from pathological processes or mechanic injuries. Dealing with these lesions is a complex issue because of the anatomy and physiology of the articular cartilage, which has a limited regeneration capacity, is not endowed with an own vascularization and biomechanically it must be able to sustain and generate an adequate response to external stimuli. Pathologic chronic processes affecting this tissue are in fact generally progressive. Due to these problems the researches in the field of regenerative medicine are focused on creating new and alternative therapeutic protocols. Studies of cartilage surrogates generated by decellularization of articular cartilage have the potential to consent the development of clinical applications in the future. In this project an experimental protocol of decellularization of equine cartilage was considered, in order to eliminate the chondrocytes in the tissue without altering the extracellular matrix. In a second phase, primary equine chondrocytes after two passages were used as cellular model to be seeded on the matrix and cultured in normoxic and hypoxic conditions. After 14 days results were collected by histological observation with an Optical microscope and the ultrastructure analysis was performed with a Scanning electron microscope. The results obtained confirmed the effectiveness of the decellularization treatment, in fact the microscopic analysis showed no cellular nuclei nor cellular material in the matrix and the maintenance of ECM morphology. Moreover, the chondrocytes seeded on the decellularized matrix preserved their morphology and the ability of matrix production. In order to place the experimental procedures performed in this study in the broader panorama of regenerative medicine, the decellularization protocol used was compared with the existing literature and potentialities and application of other cartilage regeneration approaches under study were discussed.

Riassunto

Negli animali domestici le alterazioni a carico della cartilagine articolare possono essere indotte da processi patologici o da eventi traumatici. Il trattamento di tali lesioni è complesso a causa dall'anatomia e fisiologia della cartilagine articolare, che presenta una limitata capacità autorigenerativa, non possiede una vascolarizzazione propria e dal punto di vista biomeccanico deve essere in grado di sostenere e rispondere adeguatamente agli stimoli. Le patologie croniche che colpiscono questo tessuto sono quindi spesso portate ad avere un andamento progressivo. In risposta a queste problematiche la ricerca nel campo della medicina rigenerativa ha acquisito un crescente interesse per lo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici da affiancare a quelli già esistenti. In questo ambito, lo studio di sostituti cartilaginei realizzati attraverso processi di decellularizzazione della cartilagine articolare presenta delle potenzialità da investigare per possibili applicazioni future a livello clinico. In questo studio è stato valutato un protocollo sperimentale di decellularizzazione della cartilagine equina, avente lo scopo di eliminare la popolazione cellulare di condrociti presente nel tessuto mantenendone al contempo la matrice extracellulare. In una fase successiva, condrociti primari equini al secondo passaggio sono stati utilizzati come modello cellulare, seminati sulle matrici e mantenuti in condizioni di normossia e ipossia. I campioni sono stati valutati dopo 14 giorni dalla semina con osservazione istologica tramite Microscopio ottico e a livello della loro ultrastruttura tramite Microscopio elettronico a scansione. I risultati ottenuti hanno confermato l'efficacia del trattamento di decellularizzazione, infatti le matrici non presentavano nuclei cellulari o materiale nucleare e all'osservazione microscopica la matrice extracellulare presentava una morfologia conservata. I condrociti seminati sulle matrici decellularizzate hanno mantenuto la loro morfologia e la capacità di produrre matrice. Per inquadrare la parte di laboratorio seguita nel più ampio panorama della medicina rigenerativa, il protocollo di decellularizzazione applicato in questo studio è stato confrontato con la letteratura presente e sono state analizzate potenzialità ed esempi applicativi di scaffolds non solo basati su matrice cartilaginea decellularizzata con altri approcci di rigenerazione cartilaginea in fase di studio.

Introduzione

Le articolazioni: generalità

L'articolazione è una struttura anatomica che congiunge due o più segmenti ossei e che ne consente in misura variabile il movimento. Dal punto di vista istologico le articolazioni vengono classificate sulla base dei tessuti che separano i capi ossei che partecipano a formare l'articolazione. Si parla quindi di articolazioni fibrose nel caso in cui il tessuto sia di tipo connettivo fibroso, di articolazioni cartilaginee quando il tessuto è di tipo connettivo cartilagineo ialino oppure fibrocartilagineo e infine di articolazioni sinoviali quando è presente una cavità articolare con liquido sinoviale. Nel corso dello sviluppo delle articolazioni la zona intermedia separante i capi ossei delle articolazioni fibrose e cartilaginee formata da tessuti diversi a seconda del tipo preso in considerazione subisce dei processi di ossificazione e l'articolazione viene quindi definita sinostosi. Non vengono coinvolte in questo processo solamente le sinfisi, il cui strato intermedio risulta essere più spesso di quello delle altre articolazioni fibrose e cartilaginee. In queste ultime i tessuti rimangono fibro-cartilaginei con delle porzioni legamentose alle estremità (Barone, 2004). A completare l'elenco dei mezzi di unione delle articolazioni fibrose e cartilaginee va riportato lo strato di tessuto connettivo fibroso a fibre parallele che riveste e congiunge gli strati periostali dei segmenti ossei facenti parte dell'articolazione. Le articolazioni sinoviali invece sono strutture anatomiche più complesse e sviluppate. Le superfici articolari coinvolte sono rivestite da uno strato di cartilagine ialina e separate tra loro dalla sinovia, che ha funzione di diminuire l'attrito presente e di trasporto delle sostanze nutritive alla sinoviale e alla cartilagine matura. Il liquido sinoviale e i capi articolari sono quindi racchiusi da una capsula articolare e possono essere presenti dei legamenti che costituiscono un ulteriore mezzo di fissità dell'articolazione, insieme alla presenza accessoria della contenzione da parte di muscoli, tendini e fasce. Inoltre tra i mezzi di fissità che si possono riscontrare si ritrovano menischi, dischi e labbri, di natura fibrosa o fibrocartilaginea (Barone, 2004).

Cartilagine articolare

Parlando nello specifico delle singole componenti, la cartilagine articolare riveste le superfici articolari dei segmenti ossei congiunti dall'articolazione, distribuendo le forze meccaniche a cui sono sottoposti in stazione e in movimento; si presenta priva di pericondrio come una superficie liscia e molto levigata, così da favorirne i movimenti di scorrimento delle superfici articolari. Lo spessore dello strato che riveste il tessuto osseo

è variabile a seconda dell'articolazione, dei punti specifici considerati, dell'età e della specie. Comprende un range di dimensioni da 0,1 a 0,3 o 0,4 mm ed è proporzionale al carico di forze che viene scaricato in ogni singolo punto. Quindi lo spessore tenderà ad aumentare nell'arto pelvico rispetto a quello toracico, così come nei grandi ungulati è maggiore per le articolazioni distali degli arti rispetto a quelle prossimali (Barone, 2004). I componenti più abbondanti della matrice extracellulare sono il collagene di tipo II e i proteoglicani (De Grauw, 2011).

La componente collagenica

Il turnover del collagene è di circa 300 giorni nel cane ed è caratterizzato da specifici meccanismi di regolazione ad opera di collagenasi prodotte dai condrociti. Il collagene cartilagineo maggiormente presente è di tipo II (90%), che forma una rete fibrillare tridimensionale. Le molecole sono costituite da tre catene polipeptidiche alfa avvolte a spirale; ogni catena si ripiega per formare a sua volta un'elica sinistrorsa. Ciascuna catena è formata da circa 1000 amminoacidi legati regolarmente secondo la sequenza x-y-Gly. x e y corrispondono solitamente a prolina e idrossiprolina (figura 1), amminoacidi ciclici che limitano la rotazione della catena e conferiscono rigidità. Un ruolo importante è quello dell'idrossilisina, amminoacido che promuove la formazione di legami tra proteoglicani e collagene. L'escrezione di idrossiprolina e idrossilisina può rappresentare un utile indice del turnover cartilagineo in quanto amminoacidi tipici del collagene.

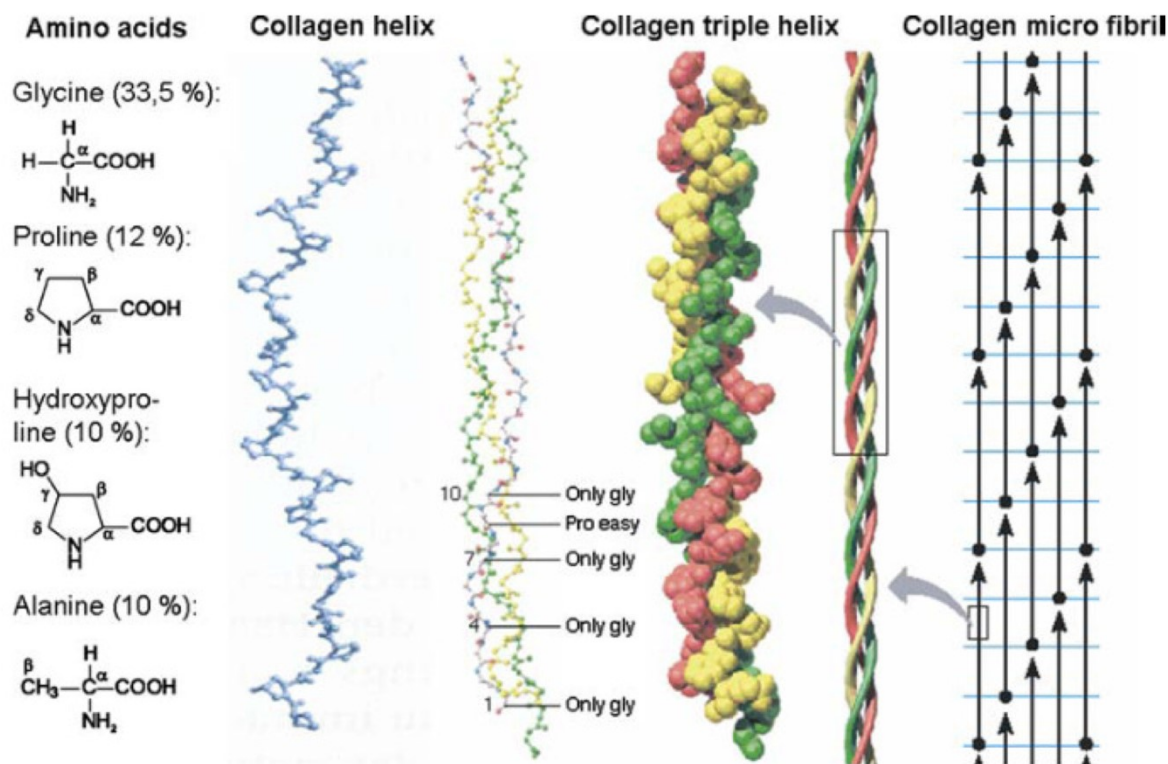


Figura 1: Struttura del collagene: dagli amminoacidi isolati alle microfibrille.

Il ruolo del collagene di tipo IX è quello di molecola di raccordo e influenza in modo significativo le proprietà biomeccaniche all'interno della cartilagine articolare, interagendo col collagene di tipo II. Generalmente si presenta all'intersezione tra le fibrille di tipo II e con buona probabilità ne controlla lo spessore. Il collagene di tipo X è presente principalmente presso la cartilagine calcificata ed è sintetizzato unicamente dai condrociti ipertrofici. Il collagene di tipo VI è abbondantemente presente nella rete pericondrocitaria. Nel complesso le fibre collagene sono orientate a seconda delle linee di forza delle pressioni a cui sono sottoposte, conferendo resistenza alle forze di taglio e trazione al tessuto oltre all'ancoraggio all'osso (Todesco e Gambari, 2002). Il collagene di tipo IV tende a formare dei complessi reticoli all'interno della matrice ed è ritrovabile esclusivamente nella matrice pericellulare della normale cartilagine articolare e nella cartilagine articolare in corso di OA della capra e dell'uomo (Foldager et al., 2014; Jeng et al., 2013; Kvist et al., 2008). Si è visto che la sovraespressione del regolatore della MMP-13 tenda ad aumentare la produzione di collagene di tipo IV nei condrociti (Wang et al., 2015). Quindi questo potrebbe essere coinvolto nel mantenimento del fenotipo dei condrociti e vitalità (Kvist et al., 2008). Il collagene di tipo XII è coinvolto nella sintesi delle fibrille, adesione cellulare, coi fenomeni di fibrosi e osteogenesi e nelle aree di forti

stress meccanici potrebbe partecipare alla protezione dell'integrità del tessuto (Chiquet et al., 2014; Arai, Nagashima et al., 2008). Inoltre è stato dimostrato in vivo il suo associarsi alla cartilagine articolare e alla cartilagine di accrescimento durante lo sviluppo dell'arto, sostenendo quindi l'ipotesi che sia necessario al microambiente in cui si sviluppa la cartilagine ialina (Taylor et al., 2015; Gregory et al., 2001). Il collagene di tipo XIV è una grande proteina non fibrillare della matrice, con una struttura simile al collagene di tipo XII. È stato ipotizzato il suo coinvolgimento nella differenziazione dei tessuti e in particolare i suoi domini FN-III sono potenti induttori della quiescenza reversibile e della differenziazione delle cellule mesenchimali nella cavia (Ruehl et al., 2005). In modo simile al collagene di tipo XII è spesso ritrovato in aree di forte stress meccanico (Hemmavanh et al., 2013) ed è coinvolto nella fibrillogenosi e nel mantenere l'integrità del tessuto.

Proteoglicani

I proteoglicani rappresentano il 30% del peso secco della cartilagine e presentano numerosi gruppi idrofilici (solfato e carbossilici). Questi contribuiscono in grande misura all'alto grado di idratazione della cartilagine, che può arrivare a un massimo dell'80%. L'aggrecano è il principale proteoglicano diffuso nella cartilagine ialina. Questo è costituito da un asse proteico a cui dei glicosaminoglicani solforati si legano come catene laterali e superano il centinaio per molecola (figura 2). Inoltre presentano un sito di legame privo di catene laterali attraverso cui formano aggregati con l'acido ialuronico. Quest'ultimo tende a legarsi con 100 molecole circa di aggrecani e formare complessi che possono arrivare a pesare 100 milioni di Dalton e contribuiscono a formare dense reti all'interno della matrice cartilaginea (Adamo et al., 2018).

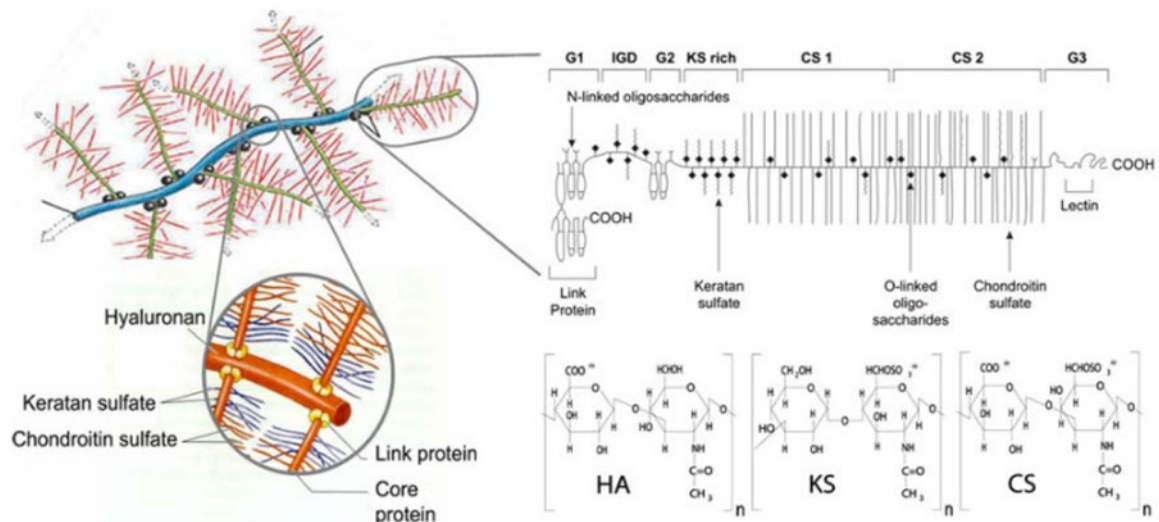


Figura 2: struttura degli aggregati presenti nella matrice cartilaginea.

Quest'ultimo è un glicosaminoglicano non solfato formato da unità di acido D-glucuronico e D-glucosamina e le possibili alterazioni che si possono avere nella sua produzione si ripercuotono a livello tissutale, data la sua capacità di aggregare e stabilizzare i proteoglicani. La lunghezza della catena è variabile e comprende valori dalle 250 fino alle 25000 unità disaccaridiche. Nei proteoglicani si riconoscono sei regioni distinte, con funzionalità diverse: G1, G2, G3, E1 ed E2. Le regioni E1 ed E2 legano le altre regioni e si inframezzano tra loro. La regione G1 è quella che si lega all'acido ialuronico in un sito di legame apposito, verso la sua estremità amino terminale. A questa regione si lega E1, che la collega a G2. Su E1 sono presenti i siti di clivaggio necessari al turnover dei proteoglicani. E2 collega a sua volta G2 e G3 e su di essa si trovano i siti di legame per i glicosaminoglicani. Infine la regione G3 presenta un'estremità carbossilica e ha ruolo attivo nell'organizzazione della matrice. Il turnover dei proteoglicani è più veloce di quello del collagene e varia dai 3,5 ai 30 giorni. Ne consegue che quando vengono coinvolti in processi patologici di degenerazione della matrice gli esiti possono essere molto più dannosi per il tessuto cartilagineo. A completare la composizione della matrice cartilaginea vi sono le proteine non collagene, che hanno funzione di mantenimento dell'integrità della matrice, e di regolazione delle interazioni tra cellule e molecole locali (Martini et al., 2006).

Liquido interstiziale

Prendendo in considerazione il liquido interstiziale della cartilagine si osserva che questo è composto per lo più da acqua, che infatti rappresenta il 60-85% del peso vivo della cartilagine, insieme a piccole proteine, gas e metaboliti. Questa è per la maggior parte legata ai GAGs presenti negli aggregati assieme ai proteoglicani. Questo viene reso possibile dalla presenza dei gruppi carbossile e solfato polianionici che determinano la pressione osmotica all'interno della cartilagine. Di conseguenza la presenza dell'acqua attirata nella matrice tende a far espandere la matrice, conferendo una grande capacità di resistenza alle forze compressive. Questa forza è detta pressione di rigonfiamento. Nel momento in cui le forze compressive agenti sulla cartilagine aumentano, la compressione tende a far fuoriuscire l'acqua trattenuta in sede dai proteoglicani. Di conseguenza le parti cariche negativamente dei proteoglicani si avvicineranno e svilupperanno delle forze di repulsione tra di loro. Di conseguenza aumenterà la pressione di rigonfiamento che si opporrà alla pressione meccanica sull'articolazione. L'effetto verrà inoltre rafforzato dall'aumento dei cationi richiamati nel tessuto necessari per riequilibrare il bilanciamento delle cariche, che a loro volta aumenteranno la pressione osmotica locale e l'attrazione delle molecole d'acqua. Nel momento in cui le forze compressive terminano l'acqua torna ad associarsi ai proteoglicani, ristabilendo l'equilibrio chimico fisico del tessuto. Durante tutto il processo i proteoglicani rimangono in sede in quanto bloccati dalla fitta rete di fibre collagene che li fissa. Il movimento ripetuto di fluidi al variare degli stimoli meccanici inoltre risulta positivo per la popolazione cellulare in quanto permette la movimentazione del liquido interstiziale e quindi delle sostanze nutritive e dei cataboliti (Martini et al., 2006).

Regioni della cartilagine articolare

All'interno della cartilagine articolare si distinguono quattro diverse zone in base alle componenti della matrice e alla disposizione di condrociti e fibre di collagene (figura 3, figura 4). Partendo dalla zona superficiale e proseguendo verso quelle più in profondità l'attività metabolica e le dimensioni dei condrociti aumentano, mentre la loro densità diminuisce (Schulz e Bader, 2007).

Dello spessore della cartilagine articolare la zona superficiale rappresenta solo il 10-20% e vi si osserva la più alta densità cellulare del tessuto (Zhang et al., 2009). Le fibre di collagene formano un sottile strato che ricopre l'articolazione. In questa zona sono

caratterizzate da un'organizzazione molto densa sebbene siano quelle più fini. I condrociti sono orientati parallelamente alla superficie e sono di forma affusolata. Inoltre un sottile film di liquido sinoviale li ricopre, che corrisponde alla lamina splendens. I GAGs nello strato superficiale sono scarsamente presenti e questo consente la libera diffusione non selettiva di acqua e ossigeno, mentre le sostanze nutritive e gli ormoni vengono selettivamente filtrati. È grazie a questa organizzazione che la superficie possiede resistenza alla frizione e alle forze di taglio (Bhosale e Richardson, 2008).

Più internamente si osserva la zona intermedia, ossia quella con la densità di proteoglicani maggiore e la più estesa. Diversamente da quelle della superficie sono metabolicamente attive e le cellule sono rotonde (Zhang et al., 2009; Bhosale e Richardson, 2008). Qui le fibre di collagene non sono orientate secondo un andamento specifico.

Nello strato profondo le fibre di collagene sono disposte perpendicolarmente alla superficie e possiedono il diametro più grande. Sono disposte nel tidemark, la zona separante la zona calcificata dallo strato profondo. I condrociti sono caratterizzati da un'attività metabolica dieci volte maggiore paragonata a quella delle cellule nella zona superficiale, nonostante posseggano solo il doppio dell'estensione rispetto ad esse. Sono disposti in colonne parallele alle fibre di collagene definite gruppi isogeni assiali (Schulz e Bader, 2007).

Nella zona più profonda si ritrova la cartilagine calcificata, ancorata all'osso subcondrale. I condrociti sono scarsamente presenti e inerti. Esclusivamente in questa zona è presente collagene di tipo X che stimola la mineralizzazione della cartilagine e ne garantisce l'integrità.

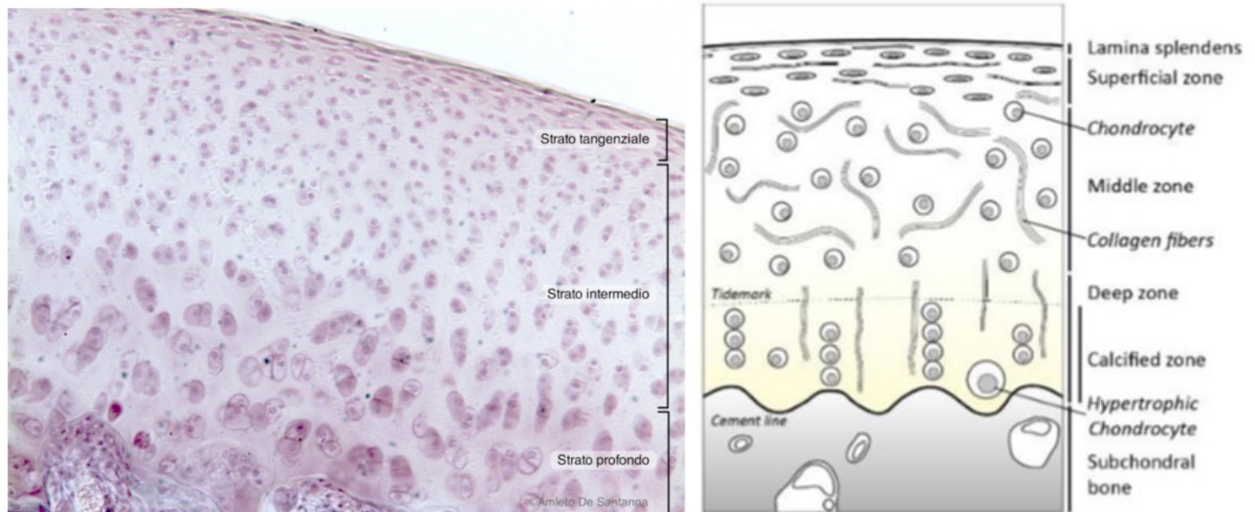


Figura 3: a sinistra: alcune delle zone della cartilagine articolare (colorazione EE). A destra: da Thielen et al., 2019; uno schema riassuntivo della microstruttura della cartilagine articolare

Vanno inoltre distinte le zone della matrice pericellulare, in cui la densità di proteoglicani e il loro turnover è maggiore, con corti filamenti di fibre collagene. Queste caratteristiche conferiscono particolare resistenza agli stimoli meccanici e hanno la funzione di proteggere le cellule dallo stress meccanico (Martini et al., 2006).

La disposizione delle fibre collagene e delle cellule è il motivo per cui la cartilagine articolare possiede proprietà di grande elasticità e resistenza, a cui partecipano anche gli aggregati di proteoglicani e acido ialuronico.

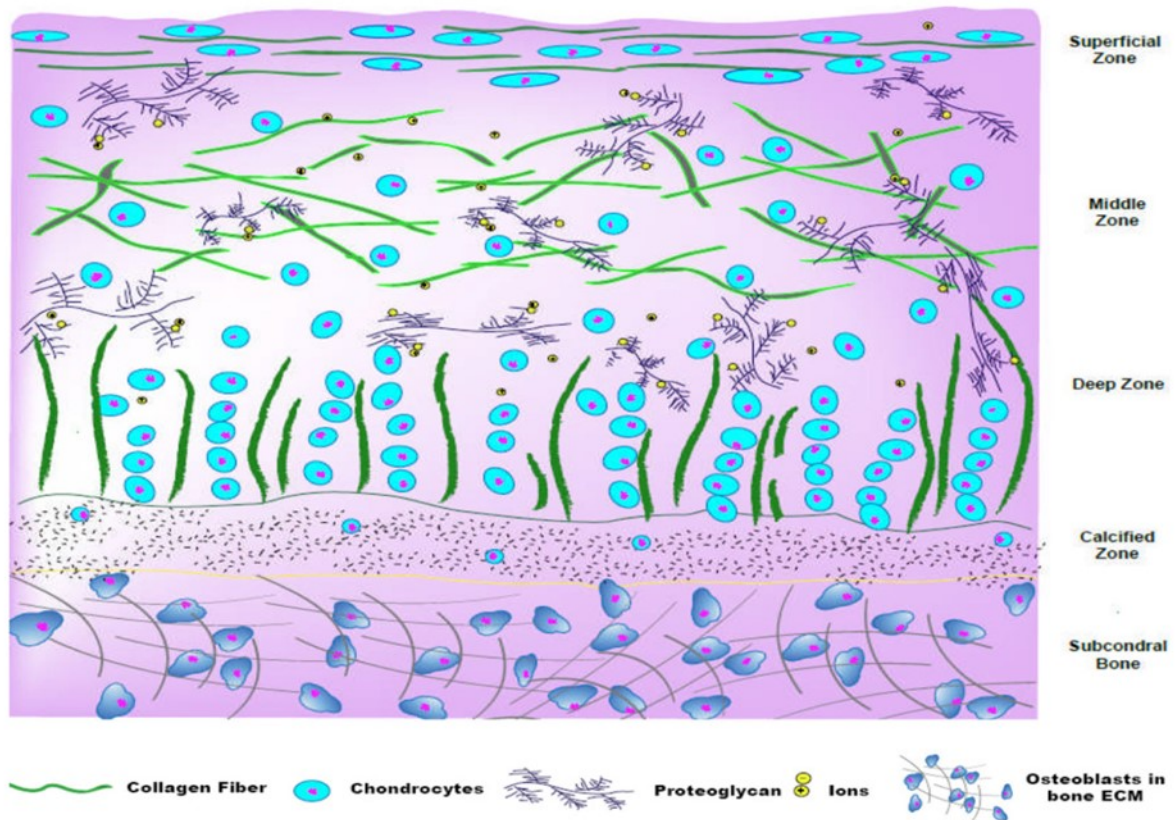


Figura 4: schema ulteriore della microstruttura della cartilagine articolare e della sua stratigrafia.

Alla periferia la cartilagine articolare si raccorda con la membrana sinoviale e con il periostio. Nella zona di passaggio è presente un anello vascolare che segna la distinzione tra tessuto osseo e cartilagine, che è caratterizzata dall'assenza di vascolarizzazione sanguigna e linfatica, oltre che da innervazione (Yu et al, 2020). La nutrizione è assicurata principalmente dal liquido sinoviale mediante diffusione e secondariamente, per gli strati più profondi, dai vasi provenienti dal sottostante osso subcondrale.

Altre componenti delle articolazioni sinoviali

Proseguendo, la membrana sinoviale fa anch'essa parte delle articolazioni sinoviali. Essa è costituita da due strati, uno profondo e a contatto col liquido sinoviale e uno superficiale in continuità con la capsula fibrosa. Quello profondo è detto lamina propria e tende ad essere più spesso e lasso nelle zone meno soggette a intensi stimoli meccanici, con poche fibre collagene non orientate e presenza di fibre elastiche. Nelle zone più soggette a sforzi, sui tendini e sui legamenti articolari possiede caratteristiche opposte. I tipi cellulari presenti sono fibrociti, mastociti e adipociti. Le reti capillari sono abbondanti e la parte linfatica contribuisce alle capacità di assorbimento di liquidi nella cavità sinoviale.

Lo strato superficiale presenta variazioni di spessore simili a quelle dello strato profondo, inoltre nei punti a bassa stimolazione meccanica la densità cellulare è maggiore. Qui la popolazione cellulare è composta da sinoviociti, che si dividono in sinoviociti secretori e sinoviociti istiocitari. Per quanto riguarda la sua distribuzione la sinoviale riveste tutta la superficie interna dell'articolazione, tranne la cartilagine articolare e i menischi quando presenti. Il suo profilo è irregolare ed è sollevata in pieghe e villi che aumentano l'area di contatto col liquido sinoviale e le sue capacità di assorbimento (Barone, 2004).

Un'altra componente delle articolazioni sinoviali è il liquido sinoviale. Questo riempie la cavità sinoviale ed ha la funzione di veicolare per diffusione nella matrice extracellulare le sostanze nutritive e i cataboliti delle cellule della cartilagine articolare. In condizioni fisiologiche mantiene una composizione stabile e non varia in quantità. Ciò è reso possibile grazie alla presenza dei capillari sinoviali fenestrati e all'assenza di giunzioni intercellulari tra i sinoviociti e di una membrana basale sub intimale. Di conseguenza vi è continuità tra il liquido sinoviale, il liquido interstiziale e il sangue e di conseguenza la suscettibilità di questi alle infiammazioni sistemiche e locali che possono modificarne le proprietà funzionali, fisiche e chimiche (Martini et al., 2006). Il liquido sinoviale è composto da acqua e sali in equilibrio con quelli contenuti nei capillari da cui vengono filtrati (De Grauw, 2011). Si ritrova inoltre acido ialuronico che rende viscoso il liquido sinoviale, enzimi lisosomiali ed altre proteine. Inoltre l'acido ialuronico è responsabile della lubrificazione delle membrane sinoviali e riduce l'attrito durante il movimento, aderendo ai sinoviociti e alla capsula fibrosa. Il suo ruolo è completato per le pressioni a bassa intensità dalla lubricina, una glicoproteina presente all'interno del liquido sinoviale che partecipa alla lubrificazione delle superfici. Inoltre è stata dimostrata la capacità della lubricina di formare legami a croce con l'acido ialuronico, andando a formare un complesso elastico che consente al fluido sinoviale di dissipare gradualmente le forze meccaniche a cui è sottoposto (Wang et al., 2020).

La capsula fibrosa, altro componente delle articolazioni sinoviali è fissata ai capi articolari tramite fibre collagene che si inseriscono sul periostio o negli strati più interni dell'osso aumentando la superficie di inserzione in modo da distribuire efficacemente le forze meccaniche. Questa è costituita da tessuto connettivo fibroso denso, quindi caratterizzato da un'alta concentrazione di fibre collagene e scarsità di cellule, fibre

elastiche e matrice extracellulare. Tutto ciò insieme alla ridotta vascolarizzazione presente conferisce un'alta resistenza alle forze meccaniche in stazione e in movimento, oltre a una buona resistenza a patologie a diffusione ematica come infezioni e neoplasie. D'altra parte la scarsa elasticità la rende suscettibile alle forze di trazione eccessive e i processi di guarigione dalle lesioni risultano meno efficienti. Inoltre la forte presenza di innervazione sensitiva determina la manifestazione di una forte nocicezione a livello locale (Martini et al., 2006).

L'articolazione metatarso-falangea

Ai fini di questa tesi verrà presa in considerazione l'articolazione metatarso-falangea, in modo da descriverne le particolari proprietà di resistenza ed efficienza nel trasmettere gli stimoli meccanici. Questa articolazione è sottoposta a forti pressioni soprattutto a livello plantare. Di conseguenza le strutture articolari sono sviluppate e complesse e impediscono l'iperestensione delle dita quando l'animale è in stazione e ancora di più quando in movimento. Questa è un'articolazione sinoviale di tipo condiloideo che congiunge l'estremità prossimale delle falangi alle ossa metatarsali e sesamoidee del dito corrispondente. Essa costituisce la base anatomica della regione metatarso falangea. La superficie articolare sesamoidea e falangea è formata da due cavità glenoidee separate da una cavità. La superficie articolare metatarsale è costituita da un condilo che negli ungulati viene diviso in due da una cresta. I legamenti si raggruppano in quelli derivati dal legamento plantare e quelli sesamoidei. Il legamento plantare è costituito da un ispessimento della capsula articolare che si presenta come cercine fibrocartilagineo. Le fibre hanno disposizione trasversale. Al gruppo dei legamenti plantari partecipano il legamento intersesamoideo proprio, che collega le due ossa sesamoidee prossimali di ogni dito e il legamento intersesamoideo interdigitale, che le collega a quelle delle dita adiacenti. La faccia dorsale del primo forma lo scudo prossimale, su cui scorrono i tendini flessori del dito. Vi sono inoltre i legamenti sesamoidei collaterali, che collegano le ossa sesamoidee alle falangi e in via accessoria alle ossa metatarsali. Infine a completare l'elenco dei legamenti plantari ci sono i legamenti sesamoidei distali. Nei carnivori e nel coniglio si presentano come due legamenti crociati che collegano le ossa sesamoidee prossimali all'estremità prossimale della falange corrispondente, con i fasci che si incrociano tra di loro. In ruminanti e suini si aggiungono ai lati due legamenti brevi che hanno decorso più rettilineo. Negli equidi hanno una struttura più complessa e differente.

Qui si ritrovano tre piani: nel piano superficiale un legamento retto collega le ossa sesamoidi prossimali allo scudo medio, sulla falange intermedia. Nel piano medio tre legamenti obliqui si portano sulla faccia palmare della falange prossimale. Nel piano profondo si dispongono i legamenti brevi e crociati. Per quanto riguarda il gruppo dei legamenti metatarso digitali si osserva che hanno funzione di fissare le ossa digitali e sesamoidee alle metatarsali. Del gruppo si ritrovano in primo luogo i legamenti collaterali, che si fissano prossimalmente alla faccia abassiale del condilo metatarsale. Distalmente si divide in due fasci, di cui il principale termina ai lati dell'estremità prossimale della falange, mentre l'altro termina ai lati dell'osso sesamoide prossimale. Altro componente del gruppo di legamenti metatarso digitali è il rinforzo dorsale della capsula articolare, che è dato da un ispessimento fibroso più evidente negli ungulati. Si dirige da un legamento collaterale all'altro e si inserisce presso i margini articolari di falange e osso metatarsale. Sulla sua faccia dorsale scorrono i tendini dei muscoli estensori delle dita e negli equidi sono presenti delle borse e delle sinoviali apposite. Il gruppo di legamenti è completato dai muscoli interossei, che originano dalle estremità prossimali delle ossa metatarsali. Questi emettono una branca da ogni lato che si fissa all'osso sesamoide prossimale e proseguono distalmente come cordoni fibrosi che accompagna i lati della falange prossimale e che poi si portano dorsalmente fissandosi al corrispondente tendine estensore del dito. In particolare è negli equidi e nei ruminanti che il muscolo assume una struttura generalmente fibrosa e che gli conferisce un ruolo principale nel sostegno dell'articolazione metatarso-falangea. Qui assume la forma di un cordone che origina dalla faccia palmare del tarso e dell'estremità prossimale del metatarso. Termina sulle ossa sesamoidee prossimali, tra la briglia tarsica e i tendini flessori delle dita da una parte e la faccia plantare dell'osso metatarsale dall'altra. Ai mezzi di fissità dell'articolazione partecipano i tendini estensori e flessori delle dita. I secondi sono mantenuti in sede anche grazie alla guaina digitale, formata dallo scudo prossimale dorsalmente e dal legamento anulare plantare plantarmente. Inoltre sono particolarmente sviluppati negli ungulati in cui partecipano al sostenimento dell'angolo metatarso falangeo (Barone, 2004). È stato inoltre riportato a proposito dell'articolazione metacarpo-falangea (articolazione anatomicamente analoga alla metatarso-falangea) che l'angolazione sul piano sagittale determini il carico associato ai tendini e ai legamenti e la loro suscettibilità alle lesioni. Di frequente vengono infatti utilizzate scarpe correttive per influenzare l'angolazione dello zoccolo allo scopo di cambiare l'angolo dorsale dell'articolazione (AD)

e diminuire la tensione delle strutture tendinee locali come il tendine del muscolo flessore superficiale (TMFS) e del muscolo flessore profondo (TMFP). Oltretutto sono state osservate delle differenze specifiche dell'AD a seconda della morfologia dei segmenti ossei del singolo soggetto. Si riporta ad esempio una correlazione negativa tra la lunghezza delle falangi prossimali e l'AD, visto che all'aumento della prima corrisponde un aumento della lunghezza del braccio della leva agente sull'articolazione e quindi alla forza a cui è sottoposta. Inoltre alla diminuzione dell'angolo formato dalle falangi prossimale e intermedie rispetto al terreno corrisponde una diminuzione dell'AD (Hagen et al., 2018).

Durante il movimento dell'animale le varie strutture legamentose vengono sottoposte a forze di tensione derivanti dal suo peso e dalle forze di reazione del terreno. Si è visto che nel corso del trotto del cavallo la dorsoflessione dell'articolazione nei primi momenti dell'appoggio dell'arto è controllata dal muscolo interosseo terzo, TMFS e TMFP. La tensione del primo dipende interamente dall'angolo dell'articolazione, dato che questo è interamente fibroso e la sua disposizione incrocia solo questa articolazione. Mentre per quanto riguarda l'azione dei tendini sono contratti attivamente durante la prima metà dell'appoggio dell'arto dai corpi muscolari presenti nella regione antibrachiale. Inoltre i legamenti accessorio prossimale e distale di TMFS e TMFP forniscono un supporto meccanico passivo. La tensione del muscolo interosseo terzo e dei tendini dei flessori aumenta progressivamente fino a metà circa della fase di appoggio dell'arto durante il trotto, che corrisponde al momento di massima estensione dell'articolazione (figura 5). La tensione viene quindi accumulata come energia elastica che viene liberata nella seconda fase dell'appoggio dell'arto, tirando i segmenti ossei nella loro posizione iniziale e dando slancio al movimento in avanti della mano (Clayton et al., 1998).

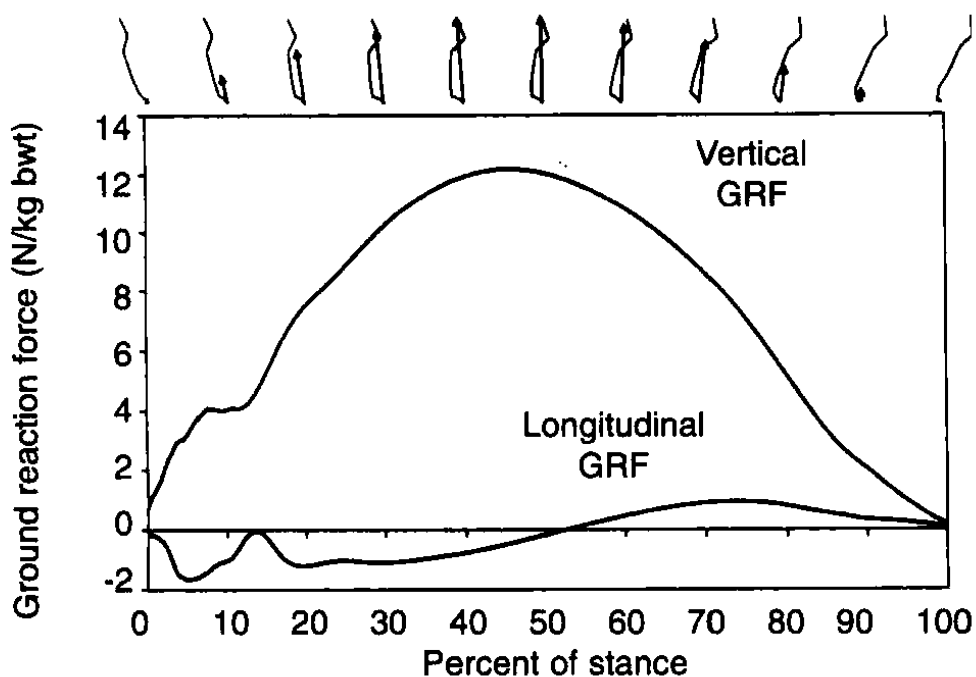


Figura 5: da Clayton et al., 1998; grafico delle forze di reazione verticali e longitudinali dell'arto anteriore. Le figure longilinee rappresentano la posizione dell'arto a intervalli pari al 10% della falcata. Le frecce accompagnanti le figure rappresentano le forze di reazione del terreno lungo il piano sagittale.

Fattori predisponenti delle patologie osteo cartilaginee

Sono numerose le cause di danno osteo cartilagineo che possono alterare la struttura dei tessuti e portare alla manifestazione di una patologia negli animali d'affezione e d'allevamento. La cartilagine articolare presenta una capacità limitata di autorigenerazione e proprio per questo la sua degradazione, in seguito ad eventi traumatici o a malattie degenerative croniche è un fenomeno dalle possibili gravi conseguenze. Queste stesse cause possono essere influenzate e favorite da agenti predisponenti e aggravanti della patologia presa in considerazione. Di seguito ne vengono elencati alcuni. Innanzitutto a livello gestionale dei fattori predisponenti verso molte patologie osteo cartilaginee sono l'eccessivo peso corporeo e la scarsità di masse muscolari. Ne ritroviamo esempi nella displasia dell'anca e del cubito, patologie dove l'aumento del peso corporeo si traduce in un aumento dello stress meccanico a cui sono sottoposte le articolazioni, mentre la scarsità di masse muscolari diminuisce il grado di stabilità visto il ruolo fisiologico dei muscoli che contribuiscono a trattenere nella corretta sede i segmenti ossei e le articolazioni. Ancora, eccessivi sforzi fisici nel tempo possono

peggiore lo stress meccanico dei tessuti, infatti si tratta di un altro fattore predisponente della displasia dell'anca. (Harper, 2017).

Collegabili all'eccessivo peso corporeo vi sono altri fattori predisponenti a patologie osteo cartilaginee. Ad esempio gli animali che sono stati castrati o sterilizzati sono a loro volta predisposti all'aumento del peso corporeo, così come gli esemplari maschi tendono ad avere degli indici di accrescimento maggiori rispetto alle femmine. Infine si possono anche avere delle predisposizioni genetiche o di razza. Una predisposizione del primo caso la si ritrova nella patogenesi della panosteite, dove razze predisposte sono ad esempio il Basset Hound, il pastore tedesco e il Rottweiler. Un secondo esempio lo si trova nell'OA. Infatti a questa patologia risultano molto predisposte razze medio grandi come il Border Collie, Bull Mastiff, Dogue de Bordeaux, German Pointer, Pastore Tedesco, Golden Retriever, Labrador Retriever, Old English Sheepdog, Rottweiler, Scottish Collie and Springer Spaniel, mentre altre razze di piccola taglia (Yorkshire Terrier, West Highland Terrier, Shih-tzu) si è visto come la prevalenza sia molto minore. Il fatto che le razze indicate come predisposte siano anche parte di dei gruppi impiegati come animali da lavoro, da pastore o da caccia e che raggiungano pesi elevati è inoltre un ulteriore elemento di conferma che questi ultimi siano a loro volta fattori predisponenti all'OA (Anderson et al., 2018).

Manifestazioni cliniche delle patologie articolari, Zoppia

Le conseguenze di una patologia osteo articolare sono varie e più o meno gravi. Possono compromettere la qualità di vita dell'animale, causando dolore o impedendo la corretta fisiologia dei tessuti e degli organi di cui fanno parte (in questo caso ossa e articolazioni). Questo naturalmente con implicazioni di maggiore gravità nel momento in cui vengono presi in considerazione animali utilizzati in competizioni sportive. Lo stesso dicasi, seppur in maniera minore considerando la diminuita diffusione al giorno d'oggi di animali utilizzati per il lavoro (come cavalli da tiro o cani per assistenza ai disabili). I sintomi sviluppabili sono naturalmente molti e variabili a seconda della patologia, ma tra di essi se ne possono elencare un gruppo più frequente. Primo fra tutti nel momento in cui è coinvolto un arto è la zoppia: un'alterazione più o meno grave della normale andatura dell'animale. Questa può essere classificata secondo diversi criteri. Innanzitutto secondo le sedi anatomiche colpite può coinvolgere uno o più arti. Può essere simmetrica e colpire anche

il controlaterale di ogni arto coinvolto o essere asimmetrica. A seconda delle tempistiche e del quadro clinico con cui si sviluppa può essere classificabile come zoppia acuta o cronica, stazionaria o progressiva, continua o intermittente o remittente. Vi sono inoltre diverse classificazioni dei gradi di gravità definiti in base all'osservazione dell'animale in stazione e in movimento. Di seguito si riporta quella proposta per i bovini produttori latte destinato alla lavorazione casearia basata sull'osservazione del comportamento nel lavoro Alberta Dairy Hoof Health Project's Lesion Severity Scoring Guide (<https://www.dairyresearch.ca/file.php?filename=/var/www/cdrplive/files/provincial/78/H%20RAQ%20User%20Guide%20v160923.pdf>):

- grado 1: movimenti fluidi e corretti. All'osservazione si notano schiena dritta in stazione e in movimento, assenza di oscillazioni del corpo, andatura simmetrica, tutti gli arti sostengono lo stesso peso, le articolazioni si flettono liberamente, gli zoccoli posteriori raggiungono le impronte degli zoccoli anteriori e il portamento della testa rimane stabile durante il movimento.
- grado 2: la capacità di muoversi liberamente non risulta diminuita. All'osservazione si notano schiena dritta o leggermente incurvata in stazione e movimento, oscillazioni minime del corpo, andatura lievemente asimmetrica, tutti gli arti sostengono lo stesso peso, le articolazioni sono lievemente rigide, gli zoccoli posteriori non raggiungono perfettamente le impronte degli zoccoli anteriori ma i passi accorciati sono uniformi e il portamento della testa rimane stabile.
- grado 3: locomozione mantenuta ma la capacità di muoversi liberamente risulta compromessa. All'osservazione si notano schiena dritta o leggermente incurvata durante la stazione, ma vistosamente incurvata durante il movimento, presenza di oscillazioni, andatura asimmetrica, zoppia più evidente in uno o più arti in particolare, le articolazioni sono rigide ma non impediscono la libertà di movimento, gli zoccoli posteriori non arrivano alle impronte degli zoccoli anteriori e i passi sono accorciati e il portamento della testa rimane stabile.
- grado 4: la capacità di movimento è vistosamente diminuita. All'osservazione si notano schiena vistosamente incurvata durante stazione e movimento, presenza di oscillazioni, andatura asimmetrica, riluttanza al sostegno del peso corporeo di almeno un arto ma che viene comunque utilizzato nel corso del movimento, i passi sono compiuti con esitazione e prudenza e le articolazioni sono rigide, gli zoccoli

posteriori non raggiungono le impronte degli zoccoli anteriori e i passi sono accorciati e la testa si abbassa e si alza leggermente durante il movimento.

- grado 5: la capacità di movimento è severamente compromessa, l'animale deve essere fortemente stimolato per alzarsi o muoversi. All'osservazione si notano schiena estremamente incurvata durante la stazione e il movimento, presenza di oscillazioni, andatura asimmetrica, incapacità di sostenere il peso corporeo di uno o più arti, vistosa rigidità articolare con assenza di flessione articolare e passi molto esitanti e prudenti, uno o più arti compiono passi vistosamente più corti e la testa si abbassa e si alza vistosamente durante il movimento.

Algia

Un altro sintomo molto comune è il dolore nella parte anatomica coinvolta. Clinicamente questo può manifestarsi in molti modi. Può essere visibile con vocalizzazioni, digrignamento dei denti, aggressività, astenia, autolesionismo, diminuzione della minzione e della defecazione, immobilità, ritardi della cicatrizzazione, tachicardia, tachipnea, ipertensione, riluttanza al movimento della parte coinvolta, midriasi, pallore, scialorrea. Esistono diverse scale di gradazione del dolore basate sull'osservazione dell'animale che permettono di assegnare uno score clinico. Un esempio lo si ritrova nell'utilizzo di una versione modificata della Scala Composta di Misurazione del Dolore di Glasgow utilizzata in uno studio del 2008 su cani sottoposti a interventi chirurgici. Questa in particolare assegna dei punteggi in base al comportamento dell'animale spontaneo e quando stimolato da un operatore. Nello specifico vengono valutati il comportamento generale, la postura, lo stato di comfort, eventuali vocalizzazioni, attenzione alla ferita chirurgica, movimentazione e risposta al tocco (Murrell et al., 2008). Il controllo terapeutico del dolore è per il veterinario, oltre che un obbligo professionale, uno scopo da raggiungere importante per svariate ragioni. Riduce la morbidity delle patologie, facilita il recupero, migliora la qualità di vita e migliora la relazione veterinario-proprietario-animale. Tra le patologie in cui la terapia del dolore riveste un ruolo fondamentale vi è ad esempio l'OA. Questa patologia è caratterizzata da un'alta prevalenza, con un'incidenza che aumenta negli animali più vecchi. La terapia antidolorifica comincia già dall'inizio della malattia, che tende a manifestarsi già dalla giovane età in cani e gatti. Inoltre questa rimane presente per il resto della vita dell'animale (Epstein et al., 2015). Le terapie per il dolore possono avere esiti variabili a

seconda dell'entità dei danni e della patologia in considerazione e a volte possono risultare parzialmente inefficaci. Un esempio è il dolore cronico da OA. Il trattamento farmacologico ha come elemento principale l'utilizzo di FANS e quindi di molecole come l'acetaminofene o l'ibuprofene che però hanno dimostrato un'incompleta riduzione del sintomo, minore rispetto ad altre terapie diffuse in medicina umana, come l'agopuntura, la moxibustione o la terapia laser a bassa intensità (Li et al., 2020).

Possibili esiti delle patologie osteo cartilaginee

Inoltre a seconda della gravità della malattia il decorso clinico può avere esito variabile. Nel migliore dei casi l'animale si rimette completamente, senza recidive o danni irreversibili ai tessuti. Altrimenti i danni sviluppati nel corso della patologia possono essere permanenti senza un possibile recupero di una completa fisiologia dell'articolazione o dell'osso in considerazione. Come ad esempio può accadere nel caso di un'osteoartrite cronica non trattata prontamente (Sasaki et al., 2019). Va sempre tenuto conto che ogni patologia articolare non trattata prontamente può esitare in artrosi nel tempo. Questa condizione è generalmente irreversibile e progressiva. Ciò che avviene è che l'articolazione perde la sua funzionalità e i processi infiammatori cronici instaurati nel tempo portano alla deposizione di tessuto fibroso che va a sostituire quelli normalmente presenti. A livello clinico quindi l'animale avrà una progressiva diminuzione della capacità di muovere l'articolazione coinvolta fino alla sua completa immobilità. Inoltre manifesterà dolore e riluttanza al movimento. Nei casi peggiori la patologia può svilupparsi e avere ripercussioni a livello sistemico. Basti pensare a una neoplasia quale ad esempio un osteosarcoma. Questo è caratterizzato da una grande capacità di metastasi e in assenza di diagnosi e trattamenti chemioterapici il tempo medio di sopravvivenza è di cinque mesi (Boerman et al., 2012). Va quindi tenuto conto che le patologie osteo cartilaginee possono aggravarsi a tal punto da rendere necessarie procedure di salvataggio, come l'impiego di protesi che vanno a sostituire l'articolazione o il segmento osseo danneggiati e in estremo l'amputazione nel caso in cui sia coinvolto un arto.

Diffusione e rilevanza economica delle patologie osteo cartilaginee

Bisogna considerare infine del costo che queste patologie hanno per i proprietari degli animali. Prima di tutto considerando la diffusione di queste patologie negli animali domestici e d'allevamento al giorno d'oggi si è visto come molti fattori predisponenti sono

comunemente diffusi e presenti. Nei domestici ad esempio, con particolare riferimento a cani e gatti, vengono spesso sottoposti a interventi di castrazione o sterilizzazione, vengono alimentati più del necessario per mantenere un peso ideale e non svolgono abbastanza attività fisica. Tutti questi fenomeni tendono a portare gli animali ad essere in sovrappeso, il che è già stato definito come un fattore predisponente a molte patologie osteo cartilaginee. Come è stato dimostrato ad esempio nella razza del Pastore Tedesco, dove i maschi non castrati entro il primo anno di età hanno il 21% di possibilità di acquisire almeno una patologia articolare come ad esempio la rottura del legamento crociato craniale, rispetto al 7% di rischio rispetto a quelli castrati oltre l'anno di età. Dati simili sono stati riscontrati nelle femmine, con il 17% e il 5% rispettivamente. La spiegazione probabilmente risiede nell'alterato metabolismo osseo nei cani castrati, in quanto viene leggermente ritardata la chiusura delle fisi di accrescimento, che a sua volta può risultare in un'alterazione dell'orientamento delle articolazioni. Ad esempio può essere alterato l'angolo di plateau tibiale, che è stato riconosciuto come fattore di rischio predisponente alla rottura del legamento crociato craniale (Hart et al., 2016).

Prendendo in considerazione invece gli animali d'allevamento e da competizioni sportive e in particolare i cavalli, va tenuto conto del fatto che questi animali vengono fin dalla giovane età costantemente sottoposti ad allenamenti di preparazione fisica. Questo al fine di migliorarne il più possibile le performance sportive. Una delle conseguenze è che svolgendo un'eccessiva attività fisica le articolazioni vengono continuamente sottoposte a eccessivi stress meccanici, che ovviamente possono portare allo sviluppo di lesioni a livello cartilagineo. In uno studio condotto dal 2006 al 2008 in Inghilterra si riscontrarono 184 casi di patologie articolari in una popolazione di 647 cavalli da competizioni sportive di razza pura tenuti in osservazione per un periodo sommativo di 7785 mesi (Reed et al., 2012). Naturalmente alcune patologie sono più diffuse di altre e generano impatti economici per i proprietari e problemi a livello clinico in scala maggiore. L'esempio migliore potrebbe essere l'osteoartrite. Si riporta che tale patologia colpisce circa il 20% della popolazione canina negli Stati Uniti, che corrisponde a circa 15 milioni di cani. Inoltre il 93% dei gatti dimostra segni radiografici riconducibili all'OA e circa la metà del totale presenta sintomi della malattia. E ancora, nei cavalli l'incapacità di proseguire l'attività sportiva è dovuta all'OA e i casi di laminite dovuti a problemi articolari sono la prima causa di eutanasia (Brown, 2017).

Un altro aspetto da considerare nella valutazione degli sforzi economici che queste patologie comportano per i proprietari è il prezzo vero e proprio delle terapie che vengono adoperate. Basti considerare i casi in cui la patologia per le sue caratteristiche intrinseche o per le modalità e le tempistiche con cui è stata segnalata e gestita a livello terapeutico si sviluppa a un livello tale da essere non completamente curabile e richiede terapie da attuare per il resto della vita dell'animale. Questo come già precedentemente detto può essere il caso di una qualunque patologia articolare che non è stata trattata in tempo o comunque non in modo efficace e che ha causato lo sviluppo di artrosi. Questa viene generalmente gestita con un trattamento conservativo che comprende somministrazioni per lunghi periodi di farmaci antinfiammatori e antidolorifici (Epstein et al., 2015). Altri casi che richiedono somministrazioni di farmaci con trattamenti a lungo termine possono essere quelli delle neoplasie e delle patologie immunomediate. Un esempio del primo a caso è l'osteosarcoma, neoplasia i cui trattamenti chemioterapici offrono diversi farmaci adottabili. A seconda del farmaco utilizzato si prospetta un tempo medio di sopravvivenza diverso e quindi un impegno economico variabile per il proprietario. Nei cani ad esempio sono stati utilizzati in combinazione all'asportazione chirurgica il carboplatino (tempo medio di sopravvivenza 307 giorni), il cisplatino (tempo medio di sopravvivenza 322 giorni) e la doxorubicina (tempo medio di sopravvivenza 366 giorni) (Szewczyk et al., 2015). Mentre un esempio del secondo caso è dato dall'artrite reumatoide, la cui terapia farmacologica necessita di essere protratta a lungo e porta ad esiti diversi a seconda dei farmaci utilizzati. Tra i farmaci utilizzati si ricordano gli antinfiammatori steroidei e non e gli anticorpi monoclonali. Uno studio propose inoltre l'utilizzo terapeutico del collagene di tipo 2 glicosilato non denaturato, che dimostrò un miglioramento della situazione clinica dei cani del gruppo di studio (DeParle et al., 2005).

Biomarker di danno cartilagineo

Considerando l'Osteoartrite (OA) come patologia ad eziopatogenesi multifattoriale e a progressione autoalimentante, è di grande importanza poterne monitorare la comparsa, lo sviluppo e la progressione o la remissione ai fini di avere degli indici di informazioni clinica. L'individuazione e messa a punto di "biomarker del danno cartilagineo" sono in tal senso una possibile risposta a tale problematica, dato che sono molecole che vengono prodotte nel corso del processo patologico che coinvolge il tessuto cartilagineo e che

sono misurabili con livelli di produzione che tendono a variare in base allo sviluppo ed alla gravità della patologia.

Ad esempio negli equini è stata dimostrata la correlazione positiva tra la produzione nel fluido sinoviale e nel siero di marker associati alla produzione di collagene di tipo II e aggregati negli stadi iniziali di osteoartrite (Jackson et al., 2015)

Lo stesso dicasi per l'associazione tra la concentrazione dei marker correlati alla degradazione del collagene di tipo 2 nel fluido sinoviale e i danni ai tessuti osteocondrali (Jackson et al., 2015).

Ancora, la concentrazione nel fluido sinoviale di C2C (l'epitopo presente sull'estremità carbossi terminale e derivante dal clivaggio delle fibrille collagene da parte della collagenasi) è stata positivamente correlata ai danni ai tessuti osteocondrali nei cavalli purosangue. (Jackson et al., 2015)

Anche la concentrazione di un altro marker associato alla degradazione del collagene di tipo 2, CTX-II (un epitopo riscontrato sui frammenti di telopeptidi carbossi terminali derivanti dalla sua degradazione) è risultata aumentata nel fluido sinoviale e nel siero di cani e nel siero di ratti con danni articolari indotti artificialmente (Jackson et al., 2015). Infine è stato inoltre misurato un forte aumento di CTX-II nel fluido sinoviale delle articolazioni del carpo e del nodello nei cavalli purosangue in corso di danni osteocondrali (Jackson et al., 2015).

Risposte dei tessuti articolari agli stimoli patogeni

Le patologie articolari possono essere di tipo non infiammatorio o infiammatorio. Il primo è più comune nei cani e nei gatti e include patologie di sviluppo, degenerative, neoplastiche e traumatiche. Il secondo tipo include le patologie infettive e immunomediate e possono essere colpite una o più articolazioni (poliartrite).

Le poliartriti infiammatorie possono essere ulteriormente classificate in erosive e non erosive (Lemetayer e Taylor, 2014). I danni a cui conseguono le lesioni alla base della patologia si possono instaurare direttamente nel tessuto cartilagineo o possono essere indirettamente causati da una sinovite.

Nel caso di patologia non infiammatoria/degenerativa l'esempio comune di danno cartilagineo è dovuto allo stress meccanico.

In un ambiente cellulare fisiologico, i condrociti sintetizzano continuamente nuova matrice extracellulare, incluse le varie componenti quali proteoglicani, glicosaminoglicani e

collagene di tipo II, ed allo stesso tempo degradano quella già presente in modo da rinnovare il tessuto, in un processo detto omeostasi cartilaginea o “turnover della matrice” (Yu et al, 2020).

A seconda del tipo, intensità e durata le forze meccaniche, che si sviluppano ed a cui è sottoposta l'articolazione, possono risultare dannose per i condrociti o comunque modificare l'ambiente extracellulare. Forze meccaniche dinamiche eccessive determinano imbibizione e perdita di proteoglicani dalla matrice extracellulare. Cicli ripetuti di forze compressive su espanti di cartilagine hanno inoltre indotto numerose alterazioni dei tessuti quali perdita delle proprietà meccaniche, degradazione del collagene di tipo II, diminuzione prolungata dei livelli di proteoglicani, diminuzione della rigidità di tensione delle reti di collagene e aumento della permeabilità all'acqua.

La perdita di proteoglicani e della rigidità dei tessuti, oltre alla perdita di allineamento dei condrociti nella disposizione all'interno della cartilagine, sono alterazioni osservabili già negli stadi iniziali dell'osteoartrite.

Va tenuto conto che invece le normali forze meccaniche a cui sono sottoposti i tessuti cartilaginei in condizioni fisiologiche sono importanti stimoli positivi per la sintesi e il mantenimento della matrice extracellulare, questo è osservabile anche come differenza nella composizione della matrice riscontrata topograficamente in diverse zone dell'articolazione a seconda dei punti e dei livelli di sollecitazione raggiunti nel corso dell'attività fisica dell'animale. (Murray et al., 1999; Thibault et al, 2002).

Lo stress meccanico è in grado di alterare direttamente la risposta metabolica dei condrociti articolari con produzione di citochine cataboliche (Il-1, TNF α , Il-6) e successiva produzione di metalloproteasi ad azione degradativa sulle componenti della matrice.

Nel caso invece della patologia infiammatorie lo stimolo patogeno agisce prima sulla membrana sinoviale articolare determinando lo sviluppo di una sinovite. In corso di sinovite i sinoviociti rilasciano mediatori infiammatori, enzimi e radicali liberi con aumento della permeabilità vascolare produzione di essudati intrasinoviali con neutrofilo, macrofagi, e fibrina. I neutrofilo producono tra l'altro ulteriori quantità di radicali liberi ad attività degradativa sui proteoglicani, collagene e acido ialuronico. La degradazione dell'acido ialuronico determina la diminuzione della viscosità del fluido sinoviale e quindi della capacità di lubrificazione e di protezione meccanica. Oltretutto la presenza degli essudati infiammatori determina un aumento della pressione intrasinoviale, riducendo

l'afflusso di sangue alla membrana sinoviale. A tutto ciò conseguono fenomeni ischemici delle strutture sinoviali e dell'osso subcondrale.

I mediatori infiammatori rilasciati dalla sinoviale (citochine proinfiammatorie: IL-1, TNF α , IL6, IL-8) stimolano i condrociti articolari a produrre a loro volta le stesse citochine infiammatorie quali IL-1, IL-6 e TNF- α che inducono la produzione di metalloproteasi da parte dei condrociti stessi (Ludwig e Harreveld, 2018).

Meccanismi molecolari di danno cartilagineo

Per quanto riguarda gli effetti delle singole citochine, IL-1 e TNF- β sono responsabili dei principali processi degradativi, in quanto stimolanti la sintesi e l'attività delle metalloproteasi con riduzione /blocco dell'attività sintetica dei condrociti. Inoltre stimolano la produzione di altre citochine/chemochine da parte dei macrofagi sinoviali, condrociti e fibroblasti: IL-8, monocyte Chemotactic protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1 α e β (MIP-1 α e MIP-1 β) e RANTES.

Le citochine proinfiammatorie, inoltre inibiscono la produzione di proteoglicani e di collagene II e IX e inducono la sintesi della nitricossidasi e COX2 con produzione rispettivamente di ossido nitrico (NO) e prostaglandine (PG) e infine dell'attivatore del plasminogeno. I macrofagi inoltre producono TNF- α che stimola anch'esso la sintesi di proteasi, NO e PG dei condrociti e dei fibroblasti. Le PG e il NO inibiscono la sintesi di proteoglicani

L'effetto generale quindi è di richiamo di cellule infiammatorie e lisi della matrice extracellulare: quest'ultimo fenomeno è principalmente mediato dalle metalloproteasi.

La loro funzione fisiologica delle metalloproteasi è regolare la degradazione della matrice cartilaginea in equilibrio con la sintesi, il che si traduce in un costante e regolato ricambio della matrice.

Nel corso di un processo degenerativo questa regolazione viene persa e conseguono lesioni ai tessuti coinvolti. Le principali classi di metalloproteasi sono le stromelisine (MMP-3), le gelatinasi (MMP-2 e MMP-9), le collagenasi (MMP-1 e MMP-13) e le metalloproteasi legate alla membrana (MT1-MMP). Queste determinano la degradazione di proteoglicani, collagene cui consegue la fibrillazione e la perdita di matrice con necrosi dei condrociti e sviluppo ulteriore di un processo infiammatorio in corso (Ludwig e Harreveld, 2018; Thompson et al., 2001).

I sistemi di controllo sull'attività delle MMP sono numerosi, ma uno dei principali è sicuramente quello che coinvolge il transforming growth factor beta (TGF- β).

Fino ad ora sono state studiate almeno tre isoforme (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), la sua presenza è diffusa a livello sistemico e i suoi effetti sono fortemente influenzati dal tipo di tessuto e cellule. Per quanto riguarda i condrociti sono stati osservati effetti sulla sintesi e la proliferazione dei proteoglicani.

Il TGF- β 1 stimola la sintesi del collagene ed è stata riportata anche la sua capacità di sopprimere l'attività delle collagenasi in colture di condrociti di origine umana, ostacolando la produzione di MMP-1, MMP-8 e MMP-13 presso le lesioni cartilaginee e in aree più distanti, nel secondo caso però con aumento delle MMP-13. (Thompson et al., 2001). Per il TGF- β 2 è stata riportata la capacità di sopprimere l'attività della collagenasi nella cartilagine umana e preservare il fenotipo dei condrociti umani in colture ad alta densità (Timur et al, 2019).

Infine per quanto riguarda il TGF- β 3 è stato ipotizzato un ruolo nei processi anabolici della cartilagine articolare, inoltre è stato associato alla guarigione dei tessuti molli come si è visto per ferite cutanee e tendinee senza residui cicatriziali in ambiente fetale e neonatale (Nakagawa et al., 2019).

I meccanismi di regolazione dei processi degradativi comprendono inoltre l'azione dell'antagonista recettoriale dell'interleuchina 1 (IL-1ra) insieme a quella dell'insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Il primo ostacola l'azione di IL-1 e i suoi effetti pro infiammatori, mentre il secondo stimola i processi di sintesi della matrice cartilaginea e in determinate condizioni inibisce i processi catabolici stimolati dall'interleuchina 1 beta (IL-1 β). Questi effetti inibenti i processi degradativi della matrice sono stati fortemente valorizzati e sfruttati nel corso di terapie cliniche per articolazioni soggette ad osteoartrosi (de Ascurra et al, 2019). Tra le MMP se ne riconoscono alcune che rivestono un ruolo riconosciuto come principale nella degradazione della matrice cartilaginea. Una famiglia di MMP che rientra in questa descrizione sono le ADAMTS (le a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-like repeat). Il bersaglio della loro attività enzimatica sono gli aggregati, che vengono degradati e di conseguenza viene danneggiata la matrice.

Dal punto di vista patologico è stato riconosciuto il ruolo delle ADAMTS mentre a livello fisiologico non sembra che forniscano un supporto inderogabile nel normale metabolismo

cellulare. Questo fu osservato in uno studio in cui dei modelli animali, cavie nello specifico, furono modificati geneticamente e subirono la delezione dei siti di catalisi bersaglio delle ADAMTS 4 e 5. In seguito vennero effettuate delle osservazioni negli animali una volta adulti. Nello specifico furono effettuati dei prelievi di tessuto a livello di cuore, polmone, timo, milza, fegato, rene, encefalo, ghiandole salivari, linfonodo mandibolare, testicolo, epididimo, occhio, ghiandola di Harder, ghiandola lacrimale, sterno, femore e arto. Non furono riscontrate alterazioni nell'aspetto istologico dei tessuti osservati, peso totale degli animali, analisi del sangue e del siero. Di conseguenza è ragionevole concludere che le ADAMTS 4 e 5 non siano fondamentali per la crescita e lo sviluppo dell'organismo (Glasson et al., 2005).

Furono inoltre effettuate delle valutazioni immunohistologiche di ricerca di un epitopo C terminale (G1-TEGE) riscontrabile in seguito al clivaggio delle aggrecanasi nella cartilagine di accrescimento e articolare dei soggetti considerati. Ciò che venne osservato fu l'assenza di differenze nei risultati tra la popolazione wild e quella con la delezione del sito target di ADAMTS5. Mentre quella con la delezione del sito target di ADAMTS 4 riportò dei valori di positività trascurabili. Questi risultati suggeriscono che il turnover degli aggrecani mediato dalle aggrecanasi sia un risultato dell'attività di ADAMTS4 e non di ADAMTS5. L'aspetto macroscopico e la lunghezza delle ossa lunghe e l'aspetto istologico della cartilagine di accrescimento rimasero comunque conservati in tutti e tre i gruppi osservati nello studio. Di conseguenza si ritenne che l'attività di ADAMTS4 non sia essenziale per il normale accrescimento dei tessuti (Glasson et al., 2005).

In corso di OA, il danno cartilagineo iniziale è dovuto alla perdita di proteoglicani che altera l'idratazione della cartilagine e di conseguenza la lubrificazione dell'articolazione. Questo determina degenerazione delle fibre collagene sulla superficie articolare con ulteriori danni della cartilagine. Il processo viene definito "fibrillazione" (figura 6) e man mano che prosegue si formano delle fessurazioni verticali perpendicolari all'orientamento delle fibre e di quello della superficie articolare. Col tempo si possono avere delle perdite di frammenti di tessuto a livello superficiale della cartilagine in un processo di "erosione" e la cartilagine tende ad assottigliarsi. Inoltre si sviluppa nel tempo necrosi dei condrociti, quindi il tessuto tende a diventare ipocellulare. In risposta a queste lesioni i condrociti non ancora andati in necrosi possono sviluppare un'iperplasia rigenerativa di risposta al danno. Va tenuto conto però che negli animali adulti questo evento risulta meno probabile

date le diminuite capacità rigenerative dei condrociti. Altrimenti i processi di degenerativi possono proseguire ed esitare nell'esposizione dell'osso subcondrale, avvenendo quindi un processo di eburneazione (Zachary e McGavin, 2015).

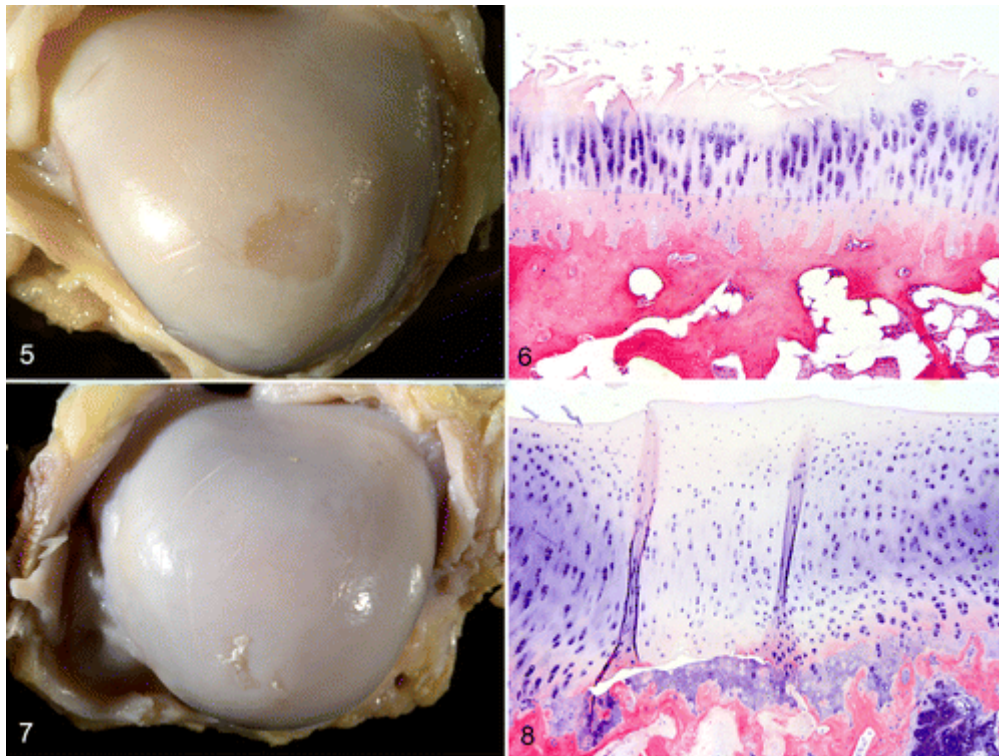


Figura 6: da Craig e Reed, 2013. 5: testa omerale, Chow chow incrociato di 9 anni. Vi è una discreta area di erosione della cartilagine sulla testa omerale caudale (malattia degenerativa articolare). La cartilagine è in buona parte di colorazione giallo-marrone. 6: testa omerale, Weimaraner di 11 anni. Si osserva assottigliamento della cartilagine con fibrillazione ed erosione superficiali, perdita e raggruppamento dei condrociti superficiali e diminuzione della colorazione (EE) della matrice cartilaginea (malattia degenerativa articolare). 7: testa omerale, Terranova di 18 mesi. Si osserva un difetto della cartilagine di 1mm con la formazione di flap (osteocondrosi dissecante). 8: testa omerale, Terranova di 18 mesi. Vi è uno spesso strato necrotico della cartilagine articolare con fessurazione e ritenzione della cartilagine nell'epifisi (osteocondrosi dissecante), colorazione EE.

Osteoartrite: prevalenza e rilevanza dell'osteoartrite

L'osteoartrite (OA), anche conosciuta come malattia degenerativa articolare o osteoartrosi, è la patologia articolare più spesso diagnosticata sia in medicina veterinaria che in medicina umana.

Essa è tipicamente caratterizzata da una progressiva degenerazione e rimodellamento delle articolazioni sinoviali, a cui segue un'alterazione della funzione meccanica dell'articolazione con algia.

L'OA si presenta come una patologia multifattoriale con una forte componente genetica che può essere esacerbata da fattori aggravanti, come problemi riferibili alla dieta e all'attività fisica svolta. Ai fini di questa trattazione, l'OA sarà considerata come patologia osteoarticolare rappresentativa, sia per la sua patofisiologia che per la sua rilevanza

clinica vista la sua alta prevalenza (Anderson et al., 2018). I dati sulla prevalenza sono tra loro discordanti e variano dal 2,5% basato sui ritrovamenti clinici nella popolazione canina nel Regno Unito al 6,6% in Nord America. Altre stime differenziate per fasce d'età sono state fatte in Nord America e partono dal 20% nei cani oltre l'anno d'età fino all'80% nei cani oltre otto anni d'età, basandosi sui riscontri clinici e i ritrovamenti radiologici. Sono state riconosciute una forma primaria e una secondaria ed entrambe sono state riscontrate nella popolazione canina, nonostante la seconda sia molto più comune. Questa consegue ad altre lesioni riguardanti l'articolazione, come ad esempio le forme riguardanti l'articolazione femoro-tibiorotulea la rottura del legamento crociato craniale o l'osteocondrosi. Sebbene si possa presentare a qualunque età l'OA viene generalmente considerata una patologia legata all'invecchiamento e le articolazioni più colpite risultano essere quelle del ginocchio, del cubito e dell'anca (Pettitt e German, 2015).

Le manifestazioni cliniche tendono a comparire tardivamente e quindi la diagnosi avviene quando la mobilità dell'animale risulta già compromessa. Dunque le tempistiche della patologia non sono ben definite in letteratura, vista la difficoltà nell'individuare il momento preciso di insorgenza dell'OA e la scarsità di dati clinici di coorti a lungo termine di casi confermati (Anderson et al., 2018).

Come già accennato in precedenza questa patologia possiede una grande rilevanza anche nell'ambito della medicina umana e questo pone ulteriore interesse alla comprensione della gestione dell'OA.

Di recente sviluppo a tal proposito è il concetto di One Medicine, secondo cui ricercatori medici e clinici nell'ambito della medicina veterinaria e umana possano collaborare per espandere la conoscenza delle patologie condivise come oggetto di studi e sviluppare nuove terapie.

I cani in particolare sono caratterizzati dal raggiungere età sempre più avanzate, hanno grande variabilità tra le razze per dimensioni e corporatura, così come diversa attitudine fisica (dai più atletici a quelli sedentari e sovrappeso) e vivono in grande prossimità degli umani. Inoltre presentano numerose patologie croniche e fattori predisponenti correlati all'età analoghi a quelli presenti per gli umani. Per questi motivi vi è un forte interesse condiviso nello studio dell'OA e nelle analogie che le diverse specie presentano tra loro (Meeson et al., 2019).

Fattori predisponenti

Per quanto riguarda la comparsa della malattia sono stati riconosciuti diversi fattori predisponenti. Ad esempio si è visto che i cani di razza pura risultano maggiormente predisposti, per difetti di conformazione legati a specifiche razze (Asher et al., 2009; Anderson et al., 2018). Altri studi tuttavia hanno dimostrato che gli incroci sono più predisposti ad altri disordini articolari quali ad esempio la rottura del legamento crociato craniale, che a sua volta può condurre allo sviluppo di OA.

È stata dimostrata inoltre una predisposizione specifica in base alla razza per numerose razze di taglia medio-grande (e quindi con un grande peso corporeo) utilizzate per scopi lavorativi, da gregge o per la caccia (figura 6). Al contrario molte razze di piccole dimensioni hanno mostrato una prevalenza minore della patologia. Questo probabilmente è in parte dovuto alla loro tendenza a manifestare di meno il dolore e la zoppia tipici dell'OA che quindi può risultare sotto-diagnosticata.

Quest'ultima probabilmente influisce perché gli ormoni gonadici hanno ruolo protettivo nei confronti delle articolazioni sinoviali e la castrazione inoltre tende ad aumentare gli incrementi ponderali. Va tuttavia considerato che un incremento ponderale potrebbe anche essere causato dall'OA stessa, vista la sua compromissione della capacità di movimento dell'animale e quindi di abbassamento del dispendio energetico metabolico.

Negli esemplari obesi va inoltre considerato l'aumento dei livelli della leptina, che risulta avere effetti dannosi sulla cartilagine articolare (Anderson et al., 2018).

Breed	Estimated breed prevalence overall (%)	95% Confidence Intervals (CI)		Number of OA cases sampled	Estimated number of OA cases in population	Number of breed in overall denominator population
		Lower	Upper			
Golden Retriever	7.74	7.06	8.48	156	421	5439
Labrador	6.13	5.88	6.39	753	2043	33321
Rottweiler	5.43	4.85	6.07	107	289	5321
German Shepherd	4.93	4.56	5.33	224	602	12204
Border Collie	4.52	4.17	4.91	205	554	12264
English Springer	3.36	2.91	3.88	67	181	5384
Springer Spaniel	3.26	2.83	3.75	70	189	5800
Boxer	2.89	2.49	3.32	67	181	6283
Crossbreds	2.60	2.50	2.70	953	2575	98931
West Highland Terrier	2.54	2.27	2.84	113	305	12017
Cavalier King Charles	2.42	2.14	2.74	91	245	10143
Staffordshire Bull terrier	2.22	2.06	2.39	248	673	30275
Yorkshire Terrier	1.23	1.07	1.42	70	189	15426
Cocker Spaniel	0.54	0.48	0.61	95	257	47481
Jack Russel	0.39	0.36	0.45	122	330	82777

Figura 6: da Anderson et al., 2018. Prevalenza stimata per razza in un anno dell'OA nelle razze più frequenti secondo i dati clinici registrati nel Regno Unito nel 2013.

Altri fattori predisponenti sono dovuti alle caratteristiche stesse dei segmenti ossei. Ad esempio è stata ipotizzata una correlazione tra il varismo dell'articolazione femoro-tibiorotulea e modificazioni della densità ossea e tendenza a sviluppare OA, così come è stata osservata, nei confronti dell'OA delle articolazioni intertarsiche distali e l'aumento mediale della protuberanza ossea dell'osso tarsale centrale. Allo stesso modo deviazioni in senso medio-sagittale o laterale è stato associato allo sviluppo di OA nelle articolazioni intertarsiche prossimali e tarso-metatarsica (Javaheri et al., 2018; Sprackman et al., 2015).

Inoltre è stato dimostrato un maggiore coinvolgimento degli animali in età più avanzata. Infatti è stato riportato che il numero maggiore di diagnosi avviene nei cani di otto anni d'età e la prevalenza maggiore si riscontra nei soggetti oltre i dodici anni (Anderson et al., 2018).

Patogenesi e potenziali biomarker

Come già accennato esistono una forma primaria e una forma secondaria della patologia. La forma primaria è il risultato di difetti di struttura e dei processi di biosintesi nella cartilagine articolare. Tipica di questa forma è la tendenza a colpire più articolazioni.

La forma secondaria deriva da anormali stress meccanici della cartilagine articolare o da alterazioni delle articolazioni (come infezioni, osteocondrosi o infiammazioni immunomediate) che ne pregiudicano la capacità di sopportare le forze meccaniche a cui sono fisiologicamente sottoposte (Scott e Taylor, 1997). In entrambi i casi quindi si sviluppano delle lesioni dei tessuti osteocondrali che sono alla base della patologia. Approfondendo la forma secondaria dell'OA verranno descritte due patologie predisponenti, ossia la displasia dell'anca e l'ostecondrosi.

Nonostante non sia stata definita una causa univoca della displasia dell'anca, si ritiene che siano coinvolte delle alterazioni dell'ossificazione encondrale e dello sviluppo acetabolare, così come dei mezzi di fissità dell'articolazione. Tra questi ultimi si riscontrano modificazioni quali l'ispessimento del legamento della testa del femore, l'aumento del liquido sinoviale e la conseguente diminuzione della pressione negativa intra articolare.

All'aumentare della pressione intra articolare i sinoviociti diminuiscono di dimensioni, aumentano gli spazi intercellulari e la permeabilità sinoviale, con un ulteriore aumento del fluido sinoviale. Queste alterazioni unite al peso che l'articolazione deve normalmente sostenere tendono a sospingere lateralmente la testa del femore, di conseguenza in risposta i muscoli periarticolari aumentano il loro tono e quindi le forze compressive sul femore. Tutto ciò unito insieme alla diminuzione dell'area di contatto della superficie articolare determina incongruenze e carichi eccessivi della cartilagine. Altri studi hanno proposto un meccanismo patogenetico alternativo che riguarda la fase di oscillamento dell'arto durante il movimento. In questa fase normalmente i meccanocettori presenti nella capsula articolare verrebbero attivati dalla sua distensione e stimolerebbero la contrazione dei muscoli adiacenti che vi si opporrebbero, riposizionando la testa del femore più vicino all'acetabolo. Questa funzione verrebbe inibita però dalla diminuzione della pressione negativa intra articolare e quindi della tensione a cui è sottoposta la capsula (King, 2017). In generale queste modifiche si traducono nei cani sotto l'anno d'età nell'instabilità articolare e sovraccarico delle aree articolari, stiramenti o strappi del

legamento rotondo, sinovite e danno alla cartilagine (figura 7). A tutto ciò può conseguire nei cani adulti lo sviluppo quindi di OA e dolore cronico (Pascual-Garrido et al., 2018).

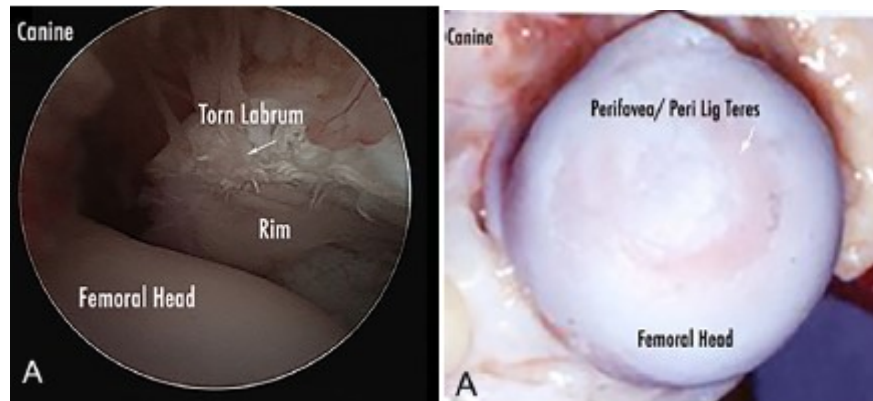


Figura 7: da Pascual-Garrido et al., 2018; immagine modificata. A sinistra visuale artroscopica di un labbro acetabolare lacerato in un cane con displasia d'anca. A destra visuale macroscopica di una testa del femore di un cane con le tipiche lesioni della fovea ritrovabili normalmente nella displasia d'anca.

Un'altra patologia che può svilupparsi in una forma secondaria di OA è l'osteochondrosi o osteochondrite dissecante. Questa si manifesta come un difetto dell'ossificazione endocondrale che può portare a una frammentazione dei tessuti osteocondrali e/o formazione di cisti. Nel corso degli anni diversi studi sono stati condotti per comprendere la patogenesi precoce della patologia, portando allo sviluppo di varie teorie eziologiche. Le anomalie dello sviluppo dei rami dei vasi epifisari contenuti nei canali cartilaginei sono ritenute uno dei fattori principali nello sviluppo dell'osteochondrosi. Queste strutture garantiscono l'irrorazione agli strati profondi della cartilagine, ciascuno tramite un'arteriola e svariate venule (figura 8) e sono presenti unicamente nei primi sei mesi del periodo post natale (Carlson et al., 1995; Shingleton et al., 1997). I canali cartilaginei sono disposti presso il pericondrio o lungo il fronte di ossificazione (la giunzione osteocondrale) perpendicolarmente (Olstad et al., 2008). Le anastomosi dei canali e dei vasi associati nei pressi del fronte di ossificazione nel periodo postnatale sono facilmente lesionabili, con il rischio che si sviluppi in seguito l'osteochondrosi (Carlson et al., 1995; Shingleton et al., 1997; Olstad et al., 2015; Olstad et al., 2013). La chiusura precoce di queste anastomosi può condurre allo sviluppo di aree focali di condronecrosi.

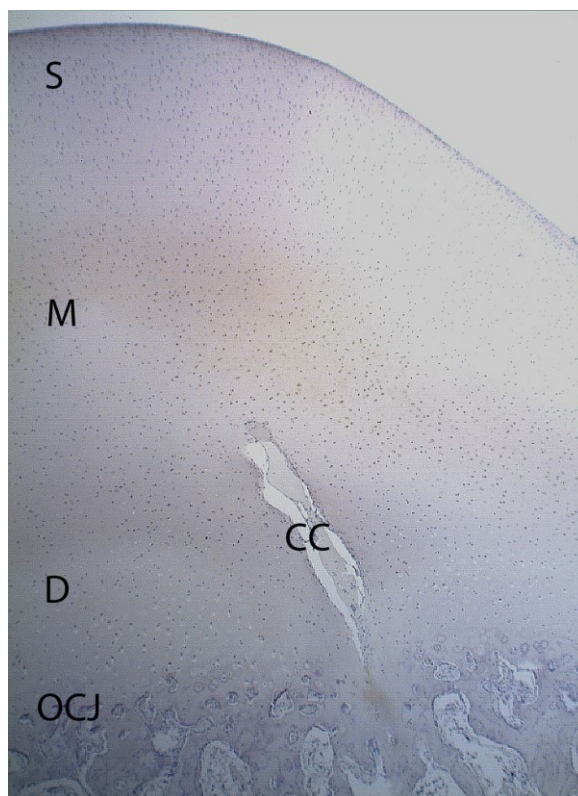


Figura 8: da Semevolos, 2017; cartilagine di epifisi articolare di una puledra Quarter horse con un canale cartilagineo (CC) nello strato profondo (D) della cartilagine presso la giunzione osteocondrale (OCJ). M: strato intermedio. S: strato superficiale. Colorazione EE.

Anche le forze biomeccaniche giocano un ruolo importante nello sviluppo dell'osteocondrosi. I siti interessati sono quelli sottoposti a grandi forze di taglio o impatto. Si è visto nei puledri di 4 mesi che la formazione di microfratture delle trabecole ossee sul confine osteo-cartilagineo determina la generazione di aree biomeccanicamente poco resistenti (Semevolos, 2017). Un'altra teoria vede protagoniste le alterazioni della matrice cartilaginea o del meccanismo di segnalamento intercellulare; queste alterazioni colpiscono sempre le aree dei canali cartilaginei e la giunzione osteocondrale e possono riguardare ad esempio la sintesi del collagene di tipo II, l'espressione genetica di multipli fattori di crescita e fattori paracrini (Kinsley et al., 2015; Riddick et al., 2012) o l'incremento dell'espressione di MMP-13 e MMP-3.

Infine è stata considerata anche una componente ereditaria nel cavallo, che può essere bassa o alta (0,02-0,45) a seconda dell'articolazione colpita e della razza. Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di loci genetici associati all'osteocondrosi (McCoy et al., 2016; Dierks et al., 2010; Mittmann et al., 2010). In seguito le lesioni precoci della patologia possono andare incontro a guarigione o svilupparsi in lesioni più gravi a cui segue la malattia clinica. L'esito dipende da vari fattori nel primo anno di età, tra cui il tipo

di attività fisica, la nutrizione e la velocità di accrescimento (Heyden et al., 2012; McCoy et al., 2013). Nei puledri va considerata l'età dell'animale in quanto quando raggiungono la pubertà (a 6-12 mesi) le capacità di guarigione della cartilagine diminuiscono rapidamente, in associazione alla regressione dei canali cartilaginei dell'afflusso di sangue (Duesterdieck-Zellmer, 2015; Olstad et al., 2008).

In seguito le fissurazioni lungo la giunzione osteocondrale possono evolvere nella formazione di tessuto fibroso con lo sviluppo di flap cartilaginei o frammenti. L'eventuale distacco di questi flap deforma le superfici articolari, causando un'alterata distribuzione delle forze a cui sono sottoposti i tessuti osteocartilaginei dell'articolazione, aumentando ulteriormente la sofferenza dei tessuti. In definitiva a causa delle lesioni dovute al decorso di queste patologie primarie consegue un aumento della produzione dei mediatori proinfiammatori che determinano l'instaurazione dell'OA. Nella forma primaria dell'OA questo avviene in modo diretto e si osserva che i processi catabolici all'interno del tessuto cartilagineo eccedono la capacità dei processi anabolici di controbilanciarli determinando la lisi della cartilagine articolare (Mortellaro, 2003).

Tra i mediatori catabolici implicati nella patogenesi dell'OA si riportano anche i radicali liberi dell'ossigeno (ROS). La sovrapproduzione di ROS eccede la capacità dei meccanismi endogeni antiossidanti di difesa inducendo una condizione di stress ossidativo e infiammatorio. Di conseguenza possono indurre l'apoptosi dei condrociti e l'amplificazione dei meccanismi condrolitici attraverso la degenerazione di macromolecole della matrice cartilaginea, l'attivazione delle metalloproteasi o la disattivazione dei mediatori inibitori circolanti e tissutali degli enzimi degradativi. L'effetto dei ROS coinvolge anche la membrana sinoviale, dove queste molecole provocano danni alle strutture vascolari e ai nervi tramite la produzione di lipoperossidasi, oltretutto agiscono come molecole di segnalamento a livello cellulare implicate nell'attivazione di fattori di trascrizione, che determinano a loro volta la produzione di mediatori infiammatori e stimolanti la risposta immunitaria (Mortellaro, 2003). Questi mediatori hanno il potenziale ruolo di marker diagnostici dello stato infiammatorio e delle condizioni del turnover cartilagineo e sono stati dimostrati una parziale efficacia ai fini di una diagnosi precoce (McIlwratih, 2005; Garvican et al., 2010).

Ad esempio sono state analizzate in questo senso le alterazioni dei livelli di IL-1 β , IL-6 e TNF- α , nonostante il ruolo funzionale di questi mediatori pro- e anti-infiammatori sia ancora da definire completamente (Sutton et al., 2009).

Altri studi hanno preso in considerazione invece i livelli quantitativi dei frammenti di collagene di tipo I e II, prostaglandina E2, osteocalcina, GAGs, acido ialuronico e le proteine associate al turnover della cartilagine. Tra queste rientrano le proteine oligomeriche della matrice cartilaginea (COMP), le metalloproteinasi e ADAMTS (Ley et al., 2007; Arai, Tagami et al., 2008; Frisbie et al., 2008; Yamanokuchi et al., 2009; Kamm et al., 2010).

Altre modifiche di marker proteici sono state associate ad alterazioni patologiche dell'omeostasi articolare, scambi sangue-fluido sinoviale, stato nutrizionale dell'articolazione e permeabilità vascolare. Tra questi si ritrovano l' α -2-macroglobulina (α 2MG), la frazione C4A del complemento, la ceruloplasmina (CP), l'aptoglobina, la proteina legante la vitamina D (VDBP), l'apolipoproteina A-I (APOA1), l' α -1B glicoproteina e la catena pesante dell'inibitore dell'inter- α -tripsina (ITI-H1) (Mateos et al., 2012; Gobezie et al., 2007). Va inoltre considerato che alcune di queste proteine associate allo stato infiammatorio rivestono anche dei ruoli diretti e indiretti riguardanti l'attività enzimatica delle proteasi della matrice e il turnover della matrice stessa. Ad esempio α 2MG (sovraespresso in corso di OA) modula l'attività delle MMP e delle ADAMTS (Lin e Liu, 2010) e l'attività macrofagica (Cáceres et al., 2010), contribuisce a regolare la matrice cartilaginea (Wu e Pizzo, 2001) ed è sovraespresso nel corso delle artriti non infettive equine (Hultén et al., 2002).

In modo simile ITI-H1 (a sua volta sovraespresso in corso di OA) regola il metabolismo dell'acido ialuronico e influenza la funzione di diverse proteine della matrice (Mateos et al., 2012; Lauer et al., 2009).

Particolarmente importante è l'aumento dell'attività proteolitica nelle articolazioni affette dalla patologia (Trumble et al., 2001; Kuroki et al., 2005), attribuibile alle MMP o alle altre proteasi. È stata inoltre riscontrata una diminuzione delle albumine sieriche integre e dei prodotti derivati dalle IgG insieme ad un aumento di albumine sieriche frammentate. Proseguendo, l'attivazione del sistema del complemento è implicata nella patofisiologia di numerose patologie articolari (John et al., 2007). Infatti è stato riportato che alcune proteine della matrice o i prodotti derivanti dalla loro degradazione attivino le vie del complemento, che promuovono l'infiammazione delle articolazioni (Sofat et al., 2009),

l'aumento della permeabilità vasale e il rilascio cellulare di enzimi lisosomiali, con i conseguenti danni alla cartilagine articolare (Choi et al., 2006).

Altre alterazioni riscontrate in corso di OA riguardano gli enzimi della coagulazione. Nello specifico l'aumento dell'antitrombina III e la diminuzione del plasminogeno suggeriscono una possibile alterazione del sistema della coagulazione durante la patologia. L'aumento del livello di antitrombina III e contemporaneamente la sua ridotta attività sono già stati riportati in corso della forma umana di artrite reumatoide (Jones et al., 1998) e l'inattivazione dell'antitrombina era associata alle alte concentrazioni di acido ialuronico in forma libera (Chang et al., 2005), un altro biomarker di OA.

In accordo con l'aumento di APOA1 è stato riscontrato che alti livelli di lipoproteine e lipidi possano contribuire all'infiammazione articolare (Sánchez-Enríquez et al., 2008; Oliviero et al., 2009) ed eccessivi lipidi nella cartilagine affetta dalla patologia stimolino la degradazione della matrice (Masuko et al., 2009). Inoltre l'aumento dei livelli di VDBP è anch'esso fonte di danno ai tessuti ossei, visti gli effetti tossici della sovrapproduzione di vitamina D nei confronti del riassorbimento della matrice ossea (Vieth., 2007).

Un ulteriore impedimento nei confronti dell'omeostasi articolare deriva dalle alterazioni dei livelli di afamina, serotransferrina e CP, agenti rispettivamente come carrier della vitamina E, ferro e rame (Jerkovic et al., 2005).

Segni clinici e diagnosi

L'OA è associata a vari segni clinici comuni ad altre patologie articolari. Tra questi si riscontrano zoppia, riluttanza all'esercizio, rigidità da inattività, algia, effusione ed ispessimento delle articolazioni colpite, atrofia muscolare, alterazione del range di movimento articolare. Le metodiche diagnostiche sono varie, innanzitutto va considerato l'esame ortopedico, al fine di valutare il range di movimento dell'articolazione, che può risultare ridotto. Va tuttavia considerato che possono anche essere riscontrati degli anormali aumenti del range di movimento a seconda della patogenesi del caso osservato, riscontrabili ad esempio col test del cassetto in caso di rottura del legamento crociato craniale. L'esame radiografico è uno dei mezzi principali della diagnosi, seppur considerando che provvede per lo più informazioni sul rimodellamento osseo (figura 9) e che i segni radiografici di OA sono relativamente non specifici: osteofiti, entesiofiti, sclerosi subcondrale, effusione, essudazione dei tessuti molli, mineralizzazioni intra articolari e cisti (Pettitt e German., 2015). La sclerosi subcondrale in particolare è uno dei

principali indicatori della patologia, nonostante la sensibilità di una semplice radiografia nel riscontrarla è limitata (Innes et al., 2004).

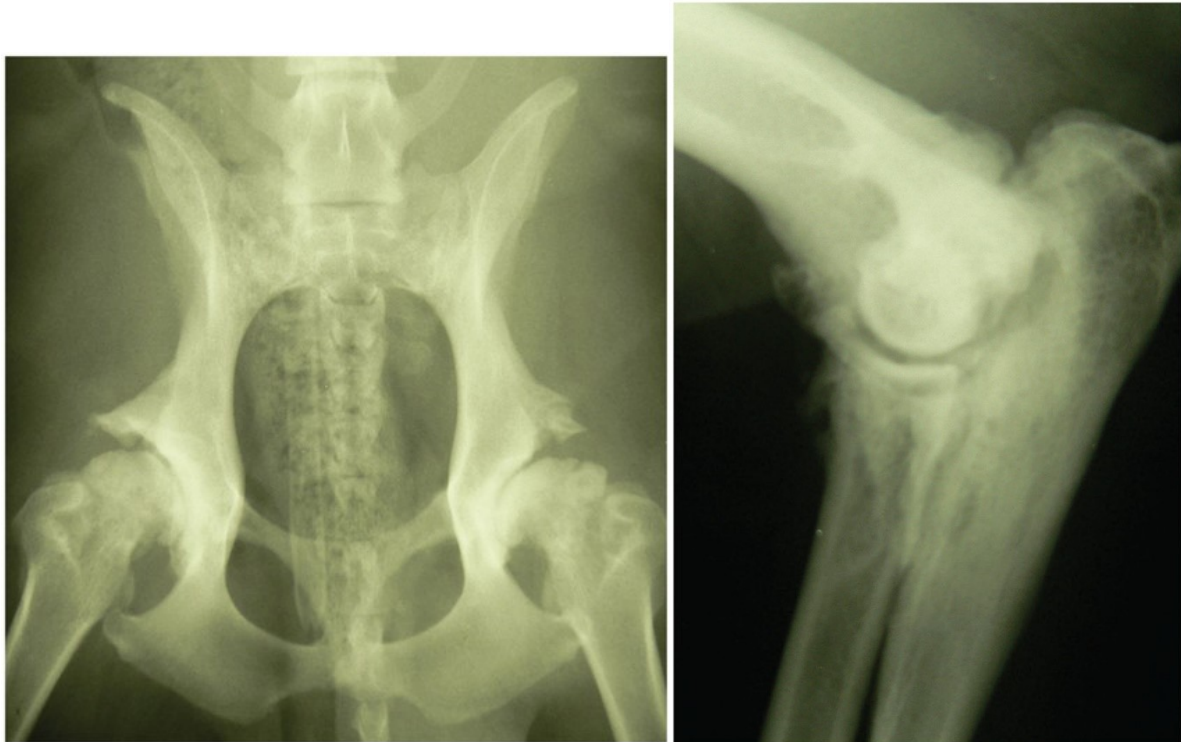


Figura 9: da Pettitt e German, 2015. A destra: radiografia ventrodorsale della pelvi, con grave OA in entrambe le articolazioni coxofemorali. A sinistra: radiografia mediolaterale dell'articolazione del cubito, con presenza di grave OA.

Un'altra metodica utilizzabile è l'analisi del fluido sinoviale, test potenzialmente sotto utilizzato nella pratica clinica. Questa permette di rilevare le modifiche precoci che si manifestano nella patologia quali ad esempio l'aumento del volume del fluido, mentre la conta cellulare aumenta leggermente (non oltre le $5 \cdot 10^9$ cellule leucocitarie/l) e a volte rientra nei valori fisiologici ($2 \cdot 10^9$ cellule/l). Col passare del tempo la concentrazione di acido ialuronico diminuisce ed è rilevabile un calo della viscosità del fluido.

Inoltre sono analizzabili tutti i potenziali biomarker della patologia, che sono tuttavia ancora in corso di studi.

Le tecniche avanzate di diagnostica per immagini (TAC, RM e scintigrafia) risultano nel tempo progressivamente più disponibili e applicabili. La TAC offre il vantaggio rispetto alla radiografia di essere più efficiente nell'individuare le lesioni primarie delle patologie da cui possono derivare forme secondarie di OA, come le lesioni del processo coronoideo mediale dell'ulna che possono essere presenti nelle fasi iniziali della displasia del cubito.

La RM può invece fornire informazioni utili sulle strutture dei tessuti molli come legamenti, menischi e la membrana sinoviale. La scintigrafia è poco utilizzata a causa delle restrizioni riguardanti l'utilizzo dei materiali radioattivi impiegati, nonostante possieda una grande sensibilità nell'individuare le aree di turnover osseo. Infine anche la disponibilità dell'artroscopia a scopo diagnostico sta aumentando nel tempo e nel cane fornisce il metodo migliore di stadiazione della patologia in considerazione dell'efficienza e dei costi (Pettitt e German., 2015).

Opzioni terapeutiche

La gestione dell'OA comprende diverse strategie applicabili a seconda del caso considerato. La sua prevenzione innanzitutto si basa sulla risoluzione precoce per quanto possibile delle patologie primarie da cui possono originarsi forme secondarie di OA.

In secondo luogo l'uso di farmaci antinfiammatori consente il controllo della produzione di mediatori pro-infiammatori, che determinano la lisi della cartilagine e l'instaurarsi dei processi flogistici cronici che precedono lo sviluppo della patologia.

Questa modalità di procedere è particolarmente importante dato che non esistono cure efficaci e risolutive dell'OA una volta che questa si è definitivamente sviluppata in quanto in questa fase le terapie si basano generalmente sul controllo dei sintomi. L'approccio terapeutico è variabile a seconda della progressione e della localizzazione dell'OA nelle sedi anatomiche colpite.

Per quanto riguarda i trattamenti farmacologici in medicina umana i farmaci utilizzabili sono stati raggruppati in diverse categorie secondo il consenso del 1996 della Osteoarthritis Research Society (OARS). Quelli compresi nella categoria "symptomatic drugs" alleviano il dolore e migliorano la funzionalità articolare, mentre quelli facenti parte del gruppo "structure-modifying agents" svolgono i loro effetti direttamente sulle strutture dei tessuti mirando al miglioramento dell'evoluzione della patologia.

Tra i primi si distinguono quelli ad azione rapida (i farmaci antinfiammatori non steroidei o FANS) e quelli ad azione lenta (tutti gli altri farmaci sintomatici) (Richette e Bardin, 2004).

I FANS sono spesso la prima linea farmacologica utilizzata, in quanto se accompagnati da un costante monitoraggio possono essere utilizzati in sicurezza per il controllo a lungo termine della componente infiammatoria del dolore dovuto alla patologia. Prima di cominciare il trattamento è necessario sottoporre l'animale alle analisi del sangue e delle

urine, ai fini di escludere la presenza di patologie renali e di disidratazione, entrambe condizioni controindicanti l'utilizzo dei FANS (Budsberg, 2009). Tra gli effetti collaterali inducibili vanno considerati gli effetti avversi gastrointestinali (GI), quali vomito, diarrea, anoressia, gastriti, enteriti, ulcere e perforazioni. Va tuttavia considerato che ad esempio molti dei FANS utilizzati nei cani nel corso di terapie dell'OA appartengono alle classi che non svolgono la loro azione inibendo unicamente le ciclossigenasi di tipo 1 (tra i quali carprofene, etodolac, meloxicam, acido tolfenamico, fenilbutazone e ketoprofene). Questi presentano tendenzialmente una frequenza diminuita di effetti GI avversi rispetto ai FANS inibitori specifici delle COX-1, di conseguenza è stata ipotizzata una correlazione rispetto al meccanismo d'azione dei farmaci (Kukanich et al., 2012). In uno specifico studio per la valutazione degli effetti avversi a lungo termine (90 giorni) in seguito alla somministrazione di carprofene, etodolac, ketoprofene, e meloxicam nei cani si riscontrò che il carprofene induceva effetti avversi con minore frequenza e gravità (Kukanich et al., 2012). La somministrazione di FANS nei cavalli determina tendenzialmente effetti avversi GI con minore frequenza, mentre in alcuni studi sostengono l'ipotesi che tendano a ostacolare la sintesi dei proteoglicani a livello cartilagineo (Goodrich e Nixon, 2006). A livello renale sono stati riportati casi di nefrotossicità indotta dall'uso di FANS ad esempio nei cani, ma la maggior parte sono stati associati alla somministrazione di dosaggi elevati o altri complicanze (come disidratazione, anestesia mal gestita e patologie renale pre-esistenti) (Kukanich et al., 2012). Inoltre sono stati riportati casi di reazioni di epatotossicità idiosincrasiche e di ritardi nei processi di guarigione del tessuto osseo (Kukanich et al., 2012). A seconda dello specifico principio utilizzati gli effetti avversi tendono a variare, ad esempio in seguito alla somministrazione di ibuprofene sono stati segnalati casi di irritazioni GI, emorragie GI e nefrotossicità e più raramente casi di depressione, ipotensione, atassia, cardiotossicità ed attacchi epilettici. In seguito a terapie basate sull'utilizzo del meloxicam si sono osservati disturbi GI, abbassamento dell'ematocrito, neutrofilia e casi di insufficienza renale. Mentre in seguito alla somministrazione di etodolac si sono osservati casi di vomito, rigurgito, diarrea, letargia, ipoproteinemia, cambi comportamentali e inappetenza (Khan e McLean, 2012). L'utilizzo dei FAS è ristretto al trattamento di singole articolazioni tramite iniezioni locali, con rapidi effetti di miglioramento clinico senza avere un coinvolgimento sistemico. Gli effetti sono tuttavia di breve durata e a lungo termine possono essere dannosi per il tessuto cartilagineo.

Un'altra alternativa è data dal gabapentin, che offre il vantaggio di rischi minori di effetti collaterali rispetto ai FANS, soprattutto per i trattamenti a lungo termine nei gatti e comunque anche nei cani. I proprietari vanno comunque avvisati dei possibili effetti di sedazione all'inizio della terapia (Robertson, 2008; Mathews, 2008). In definitiva il gabapentin risulta molto sicuro e le dosi possono essere aumentate nel tempo fino a un appropriato controllo del dolore.

L'amantidina è un altro trattamento ben tollerato e può essere utilizzato per contrastare l'ipereccitabilità dei neuroni del midollo spinale che si manifesta nella maggior parte degli animali affetti da OA come risultato dell'algia cronica non controllata. L'amantidina ha un'azione sinergica a quella dei FANS (Lascelles et al., 2008), ma può anche essere utilizzata da sola per il controllo a lungo termine del dolore. Un ulteriore principio attivo efficace è il tramadolo, in particolare per le forme acute del dolore da artrite. A causa della sua biodisponibilità variabile nei gatti (Pypendop e Ilkiw, 2007) e del suo breve tempo di dimezzamento breve nel cane (Kukanich e Papich, 2004) sono raccomandati frequenti dosaggi e valutazioni di follow up del dolore e l'associazione ad altri farmaci nel caso di trattamenti a lungo termine. Infine per quanto riguarda la categoria "structure modifying agents" è ancora in corso di studi e presenta un unico principio attivo, il pentosan polisolfato, dalla struttura simile a quella dell'eparina. I test clinici hanno mostrato degli effetti moderati di comfort nel corso dell'OA canina (Aragon et al., 2007; Sanderson et al., 2009).

Un ulteriore approccio terapeutico è fornito dalle terapie non farmacologiche e da un corretto management dell'animale. Tra questi sono compresi:

- Laser terapia a bassa potenza: diminuisce il dolore artritico, gli spasmi muscolari e migliora la perfusione delle aree coinvolte (Hegedus et al., 2009), inoltre la procedura è ben tollerata da cani e gatti (figura 10).



Figura 10: da Rychel, 2009; gatto di 3-4 mesi intero riceve la terapia laser a bassa potenza per il dolore all'articolazione femoro-tibiorotulea destra e presso il femore. Il gatto aveva una frattura di Salter-Harris di tipo I troppo dolorosa per la manipolazione diretta nel periodo post operatorio.

- Agopuntura: quando applicata con un approccio metodico e scientifico risulta molto efficace nel controllo del dolore. Nonostante il funzionamento non sia stato ancora conosciuto completamente tra i suoi effetti si riscontra il rilascio di endorfine endogene, la cessazione degli spasmi muscolari e la diminuzione della trasmissione degli stimoli nocicettivi al midollo spinale (Mathews, 2008). Si tratta di un'ottima alternativa nei gatti geriatrici che non tollerano medicazioni per os (Robertson, 2008).
- Applicazione di fonti di calore e umidità: diminuisce il dolore, migliora la circolazione e riduce la rigidità articolare (Millis e Levine., 2013).
- Applicazione di impacchi freddi: diminuiscono la trasmissione degli stimoli nocicettivi e l'infiammazione dell'area coinvolta, sono utili nelle esacerbazioni acute dell'OA cronica.
- Perdita di peso: consente di evitare i problemi correlati ad un peso eccessivo già riportati in precedenza, la tendenza all'inattività dell'animale e allo sviluppo di infiammazioni croniche (Bokarewa et al., 2005; Vuolteenaho et al., 2009).
- Alimenti medicamentosi: glucosamina con condroitina (gli effetti antidolorifici sono ancora in corso di studi; Johnston et al., 2008), prodotti non saponificabili di soia e avocado (uno studio negli equini ha mostrato un miglioramento delle lesioni tissutali articolari, Kawcak et al., 2007) e acidi grassi $\Omega 3$ (dagli effetti antinfiammatori; Budsberg e Bartges, 2006; Bauer, 2007).
- GAGs polisolfati: iniettabili per via intramuscolare o sottocutanea in cani e gatti, hanno mostrato miglioramenti della zoppia dei soggetti (Fujiki et al., 2007).
- Cellule staminali mesenchimali: derivanti da prelievi di tessuto adiposo o midollo osseo, nel tempo stanno diventando via via più utilizzate per trattare le osteoartriti

croniche refrattarie alle altre terapie. Studi hanno dimostrato le loro capacità di migliorare nei soggetti trattati la tendenza alla manifestazione di zoppia, algia, la formazione di essudati articolari e la progressione della patologia (Broeckx et al., 2019; Vilar et al, 2013; Cuervo et al., 2014).

- Esercizio fisico e nuoto: contribuiscono alla riduzione del dolore e migliorano la funzionalità cardiovascolare.

La maggior parte degli animali affetti da OA vengono gestiti tramite terapie farmacologiche e trattamenti conservativi. Nei casi in cui l'esito ottenuto non è soddisfacente, deve essere considerata la possibilità di un approccio chirurgico.

La procedura maggiormente utilizzata in questo caso è l'artroplastica articolare totale, disponibile per le articolazioni dell'anca, femoro-tibiorotulea e del gomito. La prima in particolare risulta essere quella più usufruita e la ripresa funzionale nel periodo post operatorio viene giudicata da buona a eccellente nel 90% dei casi (Allen, 2012) mentre risulta meno risolutivo nell'OA delle articolazioni femoro-tibiorotulea e nel gomito.

Nei casi in cui l'artroplastica totale non sia praticabile l'artrodesi è una valida alternativa. Questa ha lo scopo di rimuovere il dolore dovuto alla patologia, ma genera un'articolazione rigida e perciò è più adatta alle articolazioni a basso movimento come quelle del carpo e del tarso. Non risulta applicabile all'articolazione dell'anca, la quale in alternativa all'artroplastica totale viene invece sottoposta ad ostectomia del collo e della testa del femore.

Materiali e metodi

Raccolta campioni e protocollo di decellularizzazione

Tutti i reagenti utilizzati in questo studio sono stati prodotti dalla Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) salvo diversamente specificato. Le procedure di laboratorio che sono state condotte in merito a questa tesi hanno avuto come primo obiettivo quello di ottenere una decellularizzazione di tessuti fisiologici e opportunamente isolati di cartilagine articolare. Il processo avrebbe permesso quindi di ottenere una matrice cartilaginea potenzialmente utilizzabile come scaffold per applicazioni cliniche future, visto che la sua struttura e le sue proprietà meccaniche rimarrebbero invariate rispetto a quelle del tessuto da cui è stata ricavata, in assenza delle cellule che altrimenti potrebbero generare risposte immunogeniche al momento dell'utilizzo dell'impianto. Allo scopo di ottenere una biomatrice cartilaginea decellularizzata è stata impiegata una serie precisa di procedure. I campioni giunti dal macello di Correggio (provincia di Parma) erano formati dalle articolazioni metacarpo-falangee e metatarso-falangee equine (figura 11). Con l'uso di un bisturi a queste è stata asportata la cute, in seguito sono state trasferite sotto una cappa aspirante. I tendini, i muscoli e i tessuti molli nel complesso sono stati incisi insieme alla capsula articolare, la cartilagine articolare è stata esposta e da questa sono state prelevate delle sezioni di tessuto, lasciando integro il sottostante tessuto osseo subcondrale (figura 12).

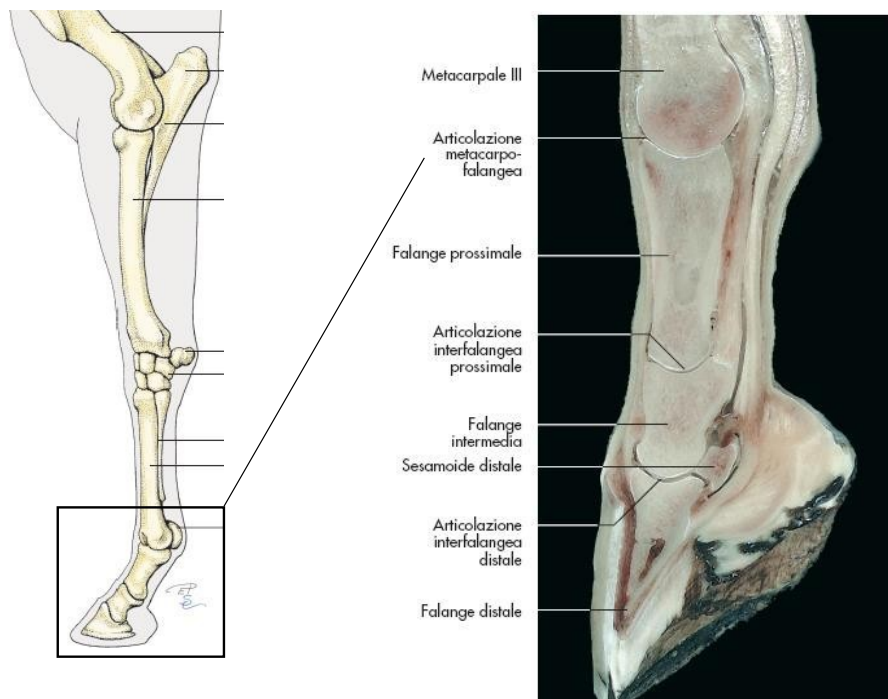


Figura 11: rappresentazione schematica dell'articolazione metacarpo-falangea



Figura 12: processo di prelievo delle fette di cartilagine dalle articolazioni metacarpo- e metatarso-falangee.

Ogni sezione aveva circa uno spessore di 0,3mm e di dimensioni 10x7mm. Queste poi lavate da una soluzione per detergere la cartilagine contenente PBS sterile, amfotericina all'1%, penicillina-streptomicina all'1% e poi immerse in azoto liquido e conservate -80°C (figura 13). Dopo 6 giorni le cartilagini sono state trasferite in un ambiente alla temperatura di +4°C, allo scopo di sottoporle a uno stress fisico. Questo avviene durante lo scongelamento in quanto la formazione di micro cristalli all'interno delle cellule, le cui membrane cellulari possono venire danneggiate portando alla lisi cellulare, senza che l'architettura del tessuto venga danneggiata.



Figura 13: processo di raffreddamento e archiviazione dei campioni di cartilagine congelati a -80°C.

In seguito le cartilagini sono andate incontro ai seguenti trattamenti:

- Processazione enzimatica tramite incubazione delle sezioni alla temperatura di 37°C con una soluzione di tripsina-EDTA. La tripsina svolge la sua attività nei confronti dei peptidi ed è una proteasi coinvolta nel clivaggio dei residui di arginina o del gruppo carbonile della lisina. Viene spesso utilizzata assieme ad agenti chelanti come l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA), che è in grado di rimuovere

l'adesione delle cellule alle proteine della matrice extracellulare attraverso il sequestro di ioni metallici come il calcio.

- Al termine di due immersioni in acqua distillata di 30 minuti sotto l'azione di un agitatore le sezioni sono state messe in incubazione a 4°C in Tryton X-100 al 3% in PBS per 41 ore. Questa processazione chimica sfrutta l'azione di un detergente non ionico per indurre la lisi cellulare: le sue molecole si pongono all'interno del doppio strato lipidico, alterando le interazioni tra i lipidi. Di conseguenza vengono scomposte la membrana cellulare e le proteine solubili, mantenendo comunque integra la struttura delle singole componenti. È quindi grazie all'assenza di cariche ioniche che i detergenti non ionici alterano minimamente le proteine strutturali e risultano vantaggiosi rispetto ad altre sostanze.
- I campioni poi hanno subito diversi passaggi in acqua distillata e PBS-1x sotto l'azione di un agitatore e poi sono stati incubati a 4°C in una soluzione di sodio-dodecil-solfato (SDS)-1x (sempre sotto l'azione di un agitatore) per 24 ore. Durante questa seconda processazione chimica l'SDS svolge la sua azione di rottura delle cellule e denaturazione delle proteine.
- I campioni hanno poi subito ulteriori lavaggi in acqua distillata (durante l'azione dell'agitatore) e in seguito sono stati posti in una soluzione a 4°C contenente PBS, amfotericina all'1% e penicillina-streptomina all'1%.
- Per il passaggio successivo è stata composta una soluzione di DNASI, poi dissolta alla concentrazione di 1mg/ml in una soluzione salina tamponante ottenuta utilizzando 5mM di NaCl 0,15M e Mg^{2+} 5mM, in seguito i campioni sono stati incubati a 37°C per un'ora. Le nucleasi contenute nella soluzione DNASI come la desossiribonucleasi contribuiscono ulteriormente alla decellularizzazione dei tessuti, idrolizzando direttamente i legami fosfodiesterici delle catene di DNA.

Alla fine di ogni passaggio i frammenti di cartilagine sono stati sottoposti a una colorazione con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindolo), una sostanza colorante capace di mostrare la presenza residua di contenuti del nucleo cellulare, legando le regioni del DNA ricche di Adenina-Timina. Alla fine i campioni sono stati incisi tramite punch numero 8 per avere una standardizzazione della loro forma.

Processazione istologica dei campioni

La prima fase della processazione istologica consiste con la fissazione con formalina tamponata neutra al 10%. La fase successiva consiste nella disidratazione del tessuto, tramite un agente chimico anidro che sostituisce la componente acquosa fisiologicamente presente; sono stati utilizzati una serie ascendente di alcoli: partendo da alcol 60%, alcol 70%, alcol 90%, alcol 95%, fino all' alcol assoluto. Segue il processo di diafanizzazione, in cui l'alcol è stato sostituito, con il solvente della paraffina, lo xilolo, che determina un aspetto traslucido del campione. Dopo la disidratazione, si è proceduto con la fase di permeazione, con immersione del campione in paraffina liquida alla temperatura di 56°C. La fase terminale della processazione del campione consiste nell'inclusione in paraffina; il tessuto è posizionato in uno stampo metallico, questa viene riempita con paraffina fusa (a 56 °C) e successivamente posizionata su una piastra raffreddata (a -8° C) che ne permette la solidificazione. Una volta completamente solidificata la paraffina, è stato rimosso lo stampo metallico, ottenendo così un blocchetto di paraffina con incluso il campione. Per il sezionamento dei blocchetti si utilizza un microtomo rotativo, che è dotato di una lama fissa e di un supporto che permette al blocchetto, posizionato al suo interno, di avvicinarsi alla lama in direzione verticale. Con questo strumento si generano sezioni sequenziali di 5µm. Le sezioni così ottenute sono state posizionate per almeno 24h in stufa a 56° C.

Colorazione istologica

Ai fini di valutare istologicamente i tessuti alla fine del processo di decellularizzazione sono stati utilizzate le seguenti colorazioni.

Colorazione con ematossilina e eosina

La colorazione ematossilina-eosina (EE) è la colorazione istologica maggiormente utilizzata, la si ritrova prevalentemente nell'ambito della microscopia ottica ed è utilizzabile con tutti i metodi di fissazione, tranne quelli che utilizzano tra le varie sostanze l'osmio. I due coloranti utilizzati durante il processo sono l'emallume acido di Mayer e l'eosina. L'emallume acido di Mayer è formato da una soluzione con diverse componenti che sarebbero ematossilina, allume di potassio, acido acetico e cloralio idrato. L'ematossilina è la componente principale e ha origine vegetale, dato che viene estratta da una pianta leguminosa, la *Haematoxylon campechianum*. L'ematossilina svolge la sua

funzione di colorante ossidandosi in emateina (figura 14) e legandosi ai tessuti tramite l'allume di potassio. L'ematossilina è un colorante di natura basica e dà una colorazione blu-viola alle componenti basofile come gli acidi nucleici nel nucleo cellulare. L'eosina è composta da eosina all'1%, acido acetico in gocce e Orange G allo 0,5%. L'eosina deriva dalla fluoresceina e al contrario dell'ematossilina è un colorante acido e fornisce una colorazione rosso-rosata alle componenti acidofile come ad esempio le proteine a livello del citoplasma.

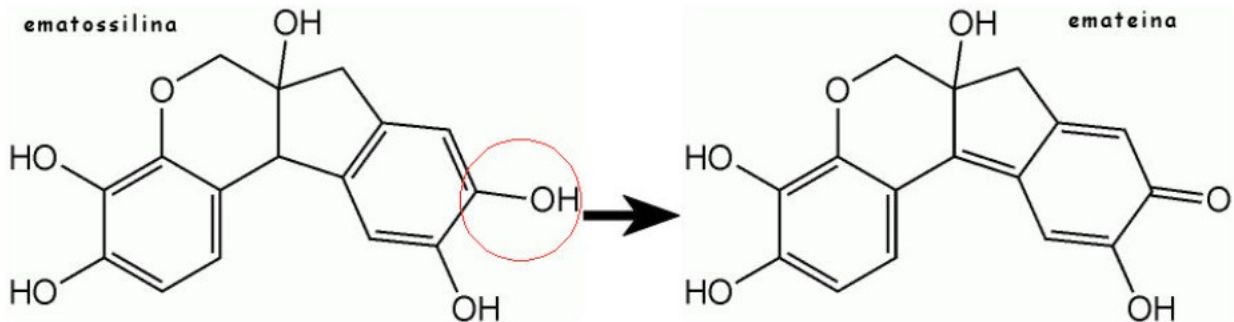


Figura 14: struttura chimica dell'ematossilina e dell'emateina.

La colorazione è stata applicata ponendo i campioni di cartilagine in immersione 5 minuti nell'emallume acido di Mayer e poi 1 minuto in Eosina. Dopo un rapido passaggio in acqua distillata i campioni hanno subito un processo di disidratazione attraverso l'esposizione a una serie di soluzioni alcoliche con gradazione via via crescente, ossia un passaggio in etanolo al 95% e due passaggi in etanolo al 100%. Infine i vetrini coprioggetto sono fissati ai campioni attraverso un medium montante (Eukitt, Bio-Optica).

Colorazione DAPI

La colorazione in fluorescenza DAPI si basa sull'utilizzo del colorante 4-6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI). Viene utilizzato per la diagnostica cellulare e fa parte del gruppo dei coloranti che derivano dall'indolo. Permette la controcolorazione in colorazioni in immunofluorescenza e per la colorazione dei nuclei, del DNA, di cellule vive e in flussocitometria.

La colorazione è eseguita coprendo i campioni in acqua distillata e lasciando in immersione per 3 minuti. Poi avviene un'immersione in soluzione tampone di McIlvaine a pH 7,0 per 5 minuti. Questa è ottenuta tramite la mescolazione di una soluzione di acido citrico monoidrato 0,1mol/L e una soluzione di di-sodio idrogenofosfato biidrato 0,2mol/L, rispettivamente con un rapporto quantitativo di 2 e 8 parti di ciascuna. I campioni vanno

poi posti sui vetrini portaoggetti e asciugati brevemente. Segue poi un'immersione in una soluzione di colorante DAPI per 15 minuti. Questa è ottenuta tramite l'aggiunta di 10µL di soluzione DAPI in acqua distillata in 10mL di soluzione tampone di McIlvaine. Infine viene eliminata la soluzione in eccesso e i vetrini coprioggetto sono fissati ai campioni attraverso un medium montante (Antifade Mountant, ThermoFisher).

Semina dei condrociti sulla matrice cartilaginea decellularizzata

Il secondo obiettivo delle operazioni condotte in laboratorio è stato quello di seminare condrociti isolati da cartilagine articolare di cavallo (De Angelis et al. 2020) e amplificati al primo passaggio (P1) sui campioni decellularizzati ottenuti, in modo da verificarne la compatibilità come microambiente di un possibile scaffold ricellularizzato con cellule autologhe e le potenzialità per applicazioni cliniche future. I campioni decellularizzati sono stati posizionati su delle piastre di Petri che in precedenza sono state coperte da uno strato di agarosio al 2%. In seguito, i condrociti sono stati seminati alla densità di 200000 cellule/campione di cartilagine in 50µL di medium; le piastre sono state poste in termostato per circa 2 ore per permettere l'adesione delle cellule alla matrice e poi sono stati aggiunti 2 ml di medium. Una piastra è stata posta in termostato a 37°C e 5%CO₂ in normossia (ossigeno al 20%) mentre l'altra in termostato a 37°C e 5%CO₂ in ipossia (ossigeno al 5%). È stato utilizzato D-MEM 4,5g/L di glucosio contenente fungizone e penicillina/streptomina e 10%FCS ed è stato cambiato ogni 3 giorni. Dopo 14 giorni i campioni sono stati osservati al microscopio ottico ed elettronico a scansione per essere valutati a livello istologico e microstrutturale.

Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

L'utilizzo del microscopio elettronico a scansione costituisce la tecnica maggiormente utilizzata nell'osservazione delle superfici. Il SEM offre il vantaggio di fornire immagini con elevata profondità di campo e risoluzione. Il meccanismo si basa sull'emissione di elettroni dalla superficie analizzata, generata dalla collisione con un fascio elettronico. Questo si origina da un filamento portato ad alte temperature di tungsteno o esaboruro di lantanide. Gli elettroni si avviano lungo il percorso conduttore in un comparto in ambiente sotto vuoto, poi vengono sottoposti a una differenza di potenziale maggiore o uguale a 10000V che li orienta e accelera. Inoltre vengono utilizzate delle lenti

elettromagnetiche che determinano la focalizzazione e collimazione degli elettroni e la possibilità di orientare il fascio. Il SEM permette di raggiungere ingrandimenti oltre 100 volte maggiori del microscopio ottico, fino a 100.000X. Gli elettroni colpiscono la superficie osservata e in base all'interazione tra questi e gli atomi del campione analizzato vengono emessi modo diverso elettroni secondari, raggi X e elettroni retro-diffusi (oltre agli elettroni trasmessi e il fascio elettronico di Auger) (figura 15). Gli elettroni secondari provengono di riflesso dalla superficie e possiedono un contenuto energetico minore di quelli emessi nel fascio, compreso tra i 0,5 e i 30keV. Derivano dall'urto degli elettroni del fascio con quelli delle orbite più esterne degli atomi della superficie, da cui vengono allontanati. La loro energia dipende da vari fattori, di cui uno dei principali risulta essere la topografia della superficie analizzata. I raggi X hanno un alto contenuto di energia e si originano dal passaggio degli elettroni del fascio in direzione degli elettroni delle orbite più vicine al nucleo che subiscono una transizione. La loro intensità è influenzata dal numero atomico dell'atomo che li ha prodotti. Questo vale in maniera minore anche per gli elettroni retro-diffusi, che derivano dall'urto elastico degli elettroni del fascio con quelli delle orbite più superficiali degli atomi, da cui vengono riflessi.

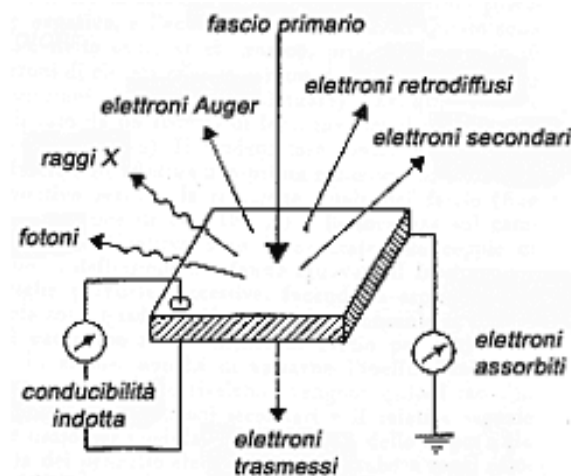


Figura 15: schema rappresentativo del meccanismo del fascio elettronico del SEM agente sulla superficie campione.

Degli specifici detector rilevano queste tre fonti di segnale e li trasducono in impulsi elettrici, raccolti dal programma di controllo del SEM. Questo scansiona la superficie mentre il sistema di ricezione degli elettroni secondari consente di identificare l'intensità del segnale a seconda della posizione del fascio degli elettroni, da cui deriva la generazione dell'immagine della superficie. Maggiore è il restringimento del fascio di elettroni e maggiore risulta essere la risoluzione spaziale dell'immagine. L'accumulo con

diversi ingrandimenti di micro-fotografie ad alta risoluzione e le informazioni dell'analisi chimica a livello superficiale consente un possibile approccio per ulteriori tecniche più specifiche.

A livello procedurale per l'analisi al SEM i campioni sono stati detersi delicatamente in PBS a 37°C contenente magnesio e calcio per evitare la perdita di cellule. Poi sono stati fissati a 4°C per 10 minuti in una soluzione di gluteraldeide al 2,5% con una soluzione tampone di sodio cacodilato 0,1M. Quest'ultima è stata utilizzata per due lavaggi da 5 minuti. Poi una serie di passaggi in alcoli di gradazione crescente ha avviato la disidratazione (a 50%, 70%, 85%, 95% e 100%), con due passaggi in ogni alcol per 5 minuti. In seguito è stata completata e portata oltre il punto critico attraverso l'uso di CO₂ liquida (CPD 030 Baltec). Infine i campioni sono stati fissati su un supporto di alluminio e ricoperti con uno strato di oro-palladio con un dispositivo di rivestimento SCD 040 (Blazer Union) e studiati con un SEM Zeiss DSM 950 a 10kV (Zeiss).

Risultati

Decellularizzazione della matrice: valutazioni morfologiche

Come prima cosa abbiamo valutato l'efficacia del processo di decellularizzazione applicato alle matrici cartilaginee prelevate da (articolazioni metacarpo falangee) attraverso diverse metodologie microscopiche integrate tra loro. Le matrici decellularizzate, processate per inclusione in paraffina, sezionate a 5 μ m e colorate con Ematossilina Eosina hanno dimostrato, per quanto concerne la porzione extracellulare, il mantenimento e l'integrità della struttura della cartilagine articolare, mentre per quanto concerne la porzione cellulare non si è rilevata la presenza di alcuna struttura cellulare (figura 16). Per confermare quanto emerso dall'analisi istologica abbiamo effettuato la colorazione in immunofluorescenza con l'intercalante DAPI; questa non ha rilevato, anche in condizioni di sovraesposizione la presenza né di nuclei cellulari né di materiale nucleare (figura 16). In seguito per andare a valutare l'effetto del processo di decellularizzazione sull'ultrastruttura delle matrici è stata effettuata un'analisi tramite SEM; non si sono evidenziate alterazioni della compattezza della matrice ed è stata conservata l'organizzazione ultrastrutturale delle lacune condrocitarie che si mostrano frequenti e rotondeggianti (figura 16). Dall'analisi SEM non si sono evidenziati punti di lassità ed eccessiva digestione della matrice; questo può essere considerato un valore aggiunto dal punto di vista biomeccanico, ma allo stesso tempo, potrebbe ostacolare una colonizzazione cellulare sperimentalmente indotta.

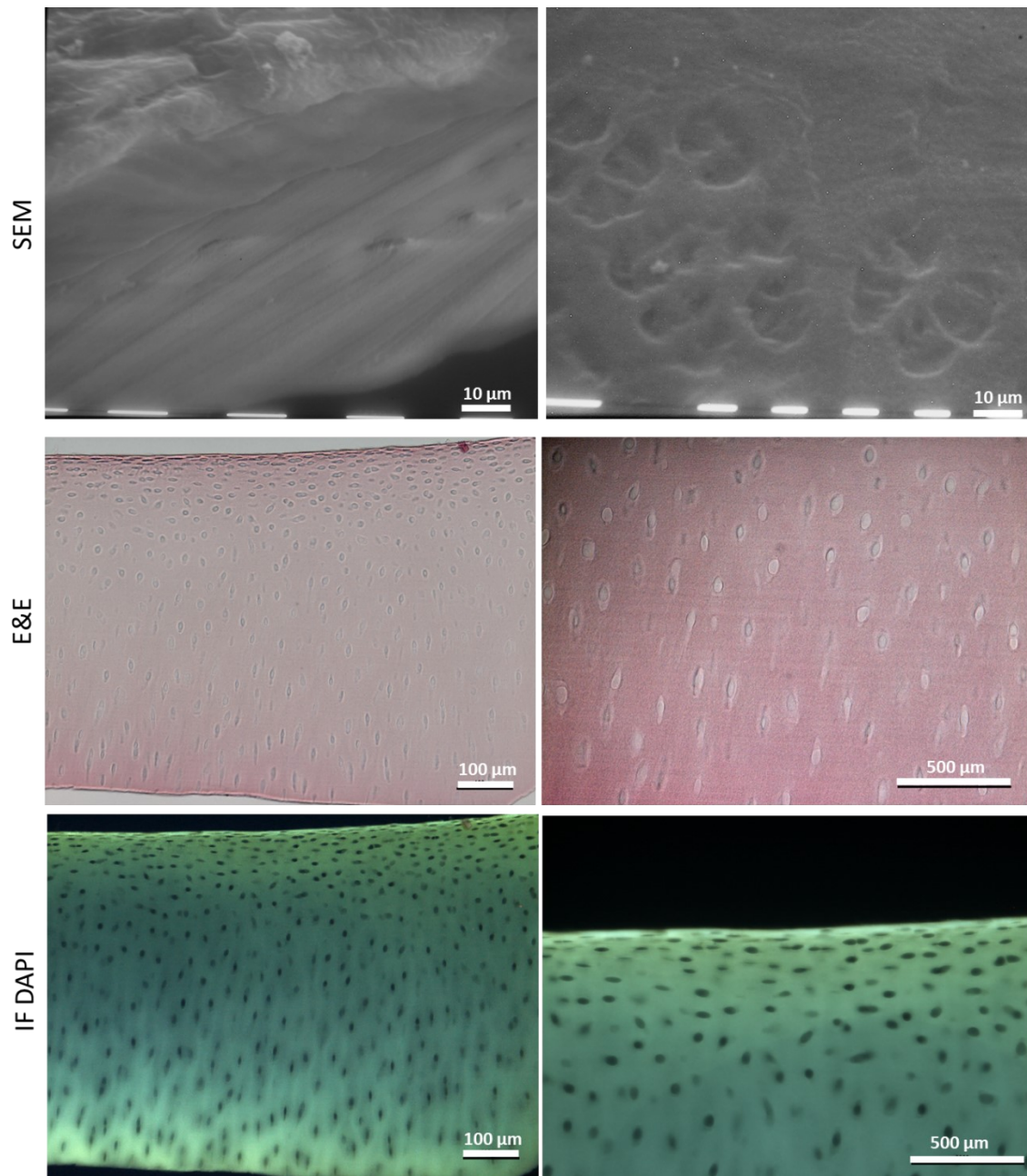


Figura 16: microfotografie delle matrici cartilaginee al termine del protocollo di decellularizzazione, al Microscopio elettronico a scansione (prima riga, l'ingrandimento utilizzato è stato 640X) e al Microscopio ottico (seconda e terza riga, gli ingrandimenti utilizzati sono stati rispettivamente 10X nelle immagini a sinistra e 20X nelle immagini a destra, colorazioni EE e DAPI).

Coltura di condrociti sulle matrici decellularizzate

L'effetto della coltura di condrociti in fase P2 sui campioni di matrice cartilaginea decellularizzata in condizioni di normossia e ipossia è stato analizzato mediante analisi istologica e ultrastrutturale. I condrociti sono stati rinvenuti sulla superficie apicale di semina, distribuiti in modo uniforme, hanno mantenuto un fenotipo rotondeggiante e in alcuni casi si sono aggregati a formare piccoli cluster cellulari (figura 17). Sia nelle

condizioni di normossia che ipossia dall'analisi ultrastrutturale i condrociti sono risultati estremamente produttivi, infatti presentano un'abbondante matrice extracellulare neoprodotta che li ricopre completamente e parti di questa matrice sono presenti anche sul substrato.

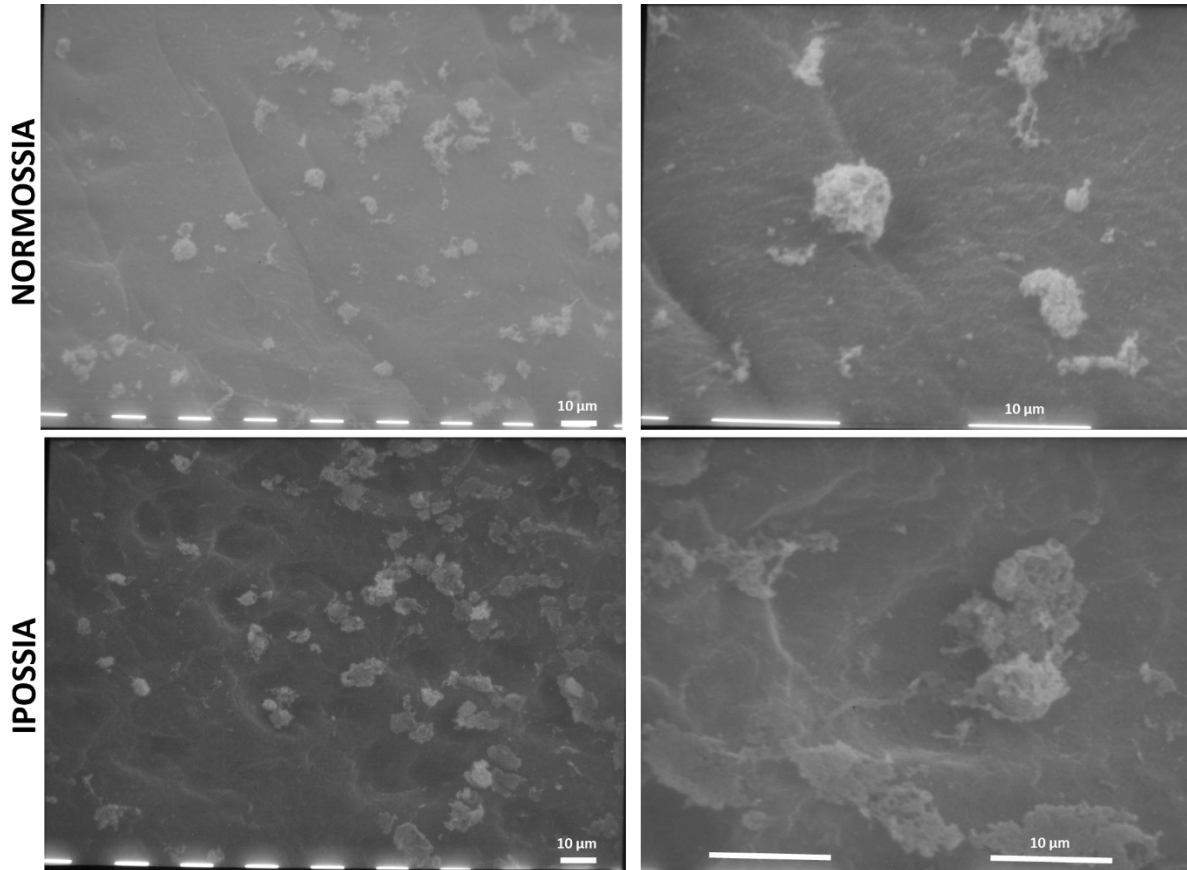


Figura 17: Microfotografie al Microscopio elettronico a scansione dei condrociti coltivati sulle matrici decellularizzate in condizioni di normossia (prima riga) e ipossia (seconda riga). Gli ingrandimenti utilizzati sono stati rispettivamente 320X e 1250X.

Le condizioni di crescita in ipossia sembrano aver favorito la proliferazione cellulare, mentre in normossia le cellule si presentano meno numerose per unità di area, seppur presentando un aspetto vitale, una morfologia rotondeggiante e una costante produzione di matrice. Anche l'analisi istologica ha rilevato singoli condrociti rotondeggianti o piccoli cluster con abbondante matrice neoprodotta a livello pericellulare (figura 18); entrambe le tecnologie utilizzate ci hanno mostrato risultati concordi confermando il quadro descritto.

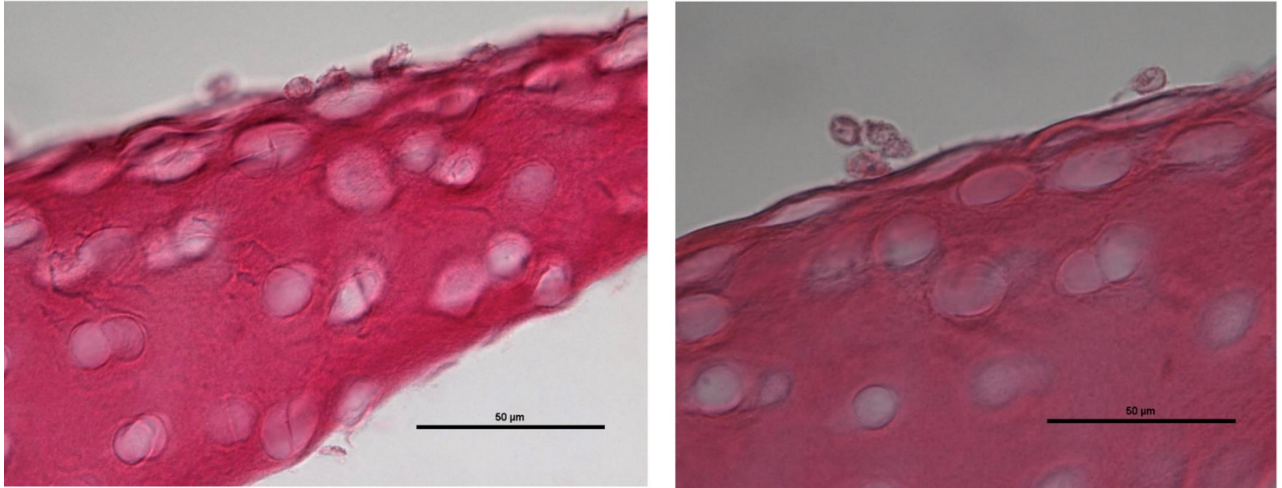


Figura 18: microfotografie al Microscopio ottico dei condrociti coltivati sulle matrici decellularizzate in condizioni di ipossia.

Finalità del presente esperimento è stata quella di valutare l'effetto del contatto prolungato con la matrice decellularizzata sulla morfologia condrocitaria.

Relativamente alla colonizzazione della matrice, considerando la sua natura non porosa non ci aspettavamo una massiva colonizzazione in queste condizioni colturali, infatti non abbiamo osservato cellule all'interno delle lacune precedentemente decellularizzate.

Discussione

Le matrici: decellularizzazione nella medicina rigenerativa

Il protocollo scelto per la decellularizzazione della matrice cartilaginea dei campioni di cartilagine articolare prelevati dalle articolazioni metacarpo- e metatarso-falangee si è dimostrato efficace e ha permesso di rimuovere le cellule presenti nei tessuti prelevati. Questo processo ha la finalità di preservare le proprietà della matrice extracellulare in termini di composizione chimica e caratteristiche strutturali. Lo scopo è quello di eliminare la popolazione cellulare che normalmente risiede nel tessuto cartilagineo, che a causa delle sue proprietà immunogeniche (Stapleton et al., 2008) ostacolano l'utilizzo del tessuto come base per uno materiale da impianto. Tutti i tessuti sono composti da cellule circondate da una matrice extracellulare con cui vi sono delle reciproche interazioni. I prodotti cellulari, incluse le proteinasi, modificano la matrice e i fattori di crescita e le citochine incorporati in essa agiscono come stimoli funzionali modificando il metabolismo e l'attività secretoria delle cellule. Questo sistema diventa ancora più complesso a causa del fatto che queste interazioni tra cellule e matrice extracellulare avvengono all'interno di un ambiente dinamico che risente di influenze esterne come stimoli biomeccanici ed effetti ormonali (Nelson e Bissell, 2006). Il risultato di questi processi determina il mantenimento o meno dell'omeostasi tissutale. Data l'alta complessità di questi processi e i molteplici ruoli della matrice extracellulare i biomateriali ottenuti dalla matrice stessa hanno maggiori probabilità di essere funzionali rispetto a quelli ottenuti tramite l'impiego di composti artificiali. In medicina umana, le matrici biologiche sono già state utilizzate a livello clinico per la rigenerazione di vari organi, anche tramite tessuti di origine animale come xenotrapianti. Procedure di questo tipo sono ad esempio state condotte per la rigenerazione delle valvole cardiache (D'Onofrio et al., 2011), dei tessuti muscolari (Ricchetti et al., 2012), delle pareti vaginali (Armitage et al., 2012) e anche per la rigenerazione di difetti indotti della parete addominale di modelli animali sperimentali (nello specifico con xenotrapianti di origine bovina nella parete addominale di ratti oggetto di studi) (Meyer et al., 2006). Inoltre sono già stati riportati casi di utilizzo di xenotrapianti su modelli animali, come l'utilizzo dei tessuti della mucosa del piccolo intestino per la realizzazione di uno scaffold per la riparazione della giunzione muscolotendinea tra il muscolo gastrocnemio e il tendine calcaneale comune nei cani (Turner et al., 2010; Turner et al., 2012). L'utilizzo di una matrice extracellulare come materiale per la realizzazione di uno scaffold offre il vantaggio di permettere un rimodellamento costruttivo (Badylak, 2007), ossia tende a supportare la formazione di specifici tessuti nel sito di

impianto piuttosto che sviluppare tessuto cicatriziale, che risulta funzionalmente inferiore. In ogni caso l'esito dell'impianto dipende da numerosi fattori come la ritenzione di fattori di crescita all'interno della matrice, la sua topologia di superficie, la modulazione della risposta immunitaria e gli stimoli microambientali esercitati sulle cellule, come il carico biomeccanico (figura 19) (Tottey et al., 2011).

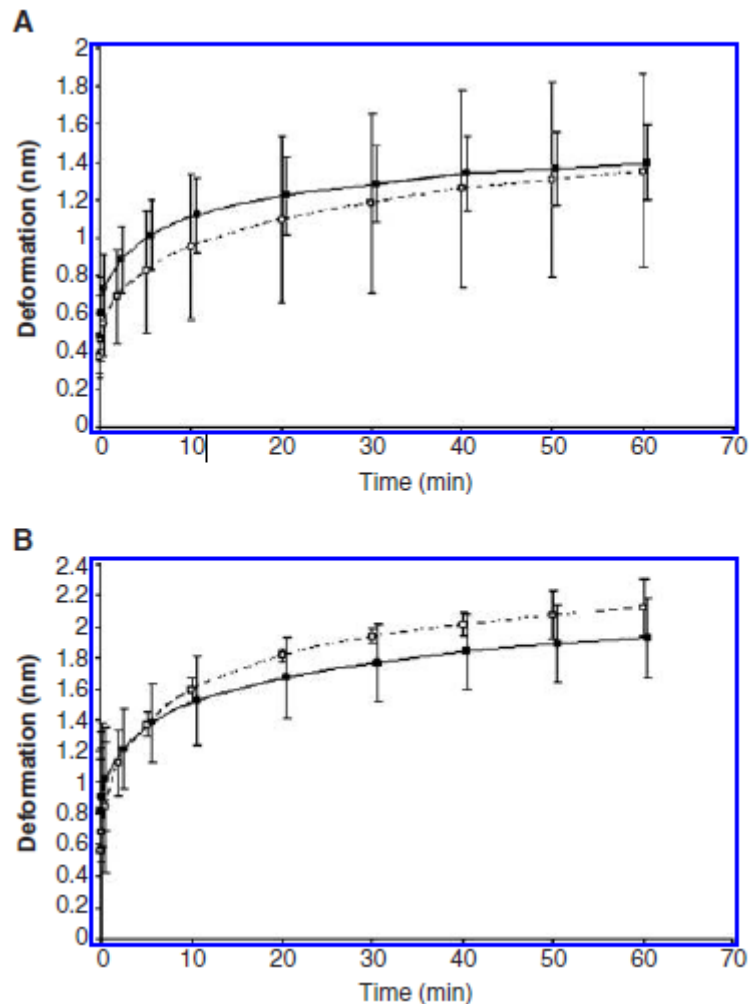


Figura 19: da Stapleton et al., 2008; grafici rappresentanti il confronto nell'entità di deformazione di un tessuto meniscale suino non modificato rispetto a una decellularizzato, sottoposti a un carico compressivo. I campioni sono stati prelevati dalla regione meniscale mediale. □ tessuto non decellularizzato ■ tessuto decellularizzato. (A) sottoposizione a un carico compressivo di entità 1N. Dati espressi con una media dei limiti di confidenza di $(n=6)\pm 96\%$. (B) sottoposizione a un carico compressivo di entità 2N. Dati espressi con una media dei limiti di confidenza di $(n=3)\pm 95\%$.

Matrici cartilaginee decellularizzate

Studi simili sono già stati condotti in precedenza ai fini di sviluppare campioni di cartilagine decellularizzata e scaffold osteocondrali (Elder et al., 2009; Kheir et al., 2011; Schwarz et al., 2012; Benders et al., 2013). Nel complesso le matrici decellularizzate sono prodotte utilizzando trattamenti con diversi passaggi a seconda del tessuto

considerato che comprendono la lisi delle membrane cellulari, la separazione dei componenti cellulari dalla matrice extracellulare, la solubilizzazione dei componenti citoplasmatici e nucleari e la rimozione dei detriti cellulari (Aubin et al., 2013). Vari protocolli di decellularizzazione sono disponibili ma la quantità di materiale cellulare residuo al termine del trattamento è variabile. Non esistono linee guida chiare sul grado di decellularizzazione necessario, in quanto i residui cellulari non sempre ostacolano la rigenerazione del tessuto (Ghanavi et al., 2012; Jin et al., 2007). La risposta immunitaria che si può generare in seguito all'impianto di scaffold biologici acellulari xenogenici o allogenicici è ancora in corso di studi, mentre è risaputo essere parzialmente mediata da macrofagi (Keane et al., 2012). In ogni caso una risposta macrofagica all'impianto di uno scaffold è un evento necessario, in quanto i macrofagi sono coinvolti in seguito nella sua degradazione. Tuttavia essi possono rilasciare numerosi fattori solubili all'attivazione che possono essere benefici o meno per la formazione di nuovi tessuti, in base al fenotipo dei macrofagi. L'attivazione dei macrofagi di tipo M1 porta a un rimodellamento avverso tramite il rilascio di citochine stimolanti effetti catabolici (come IL-1 e IL-6), mentre l'attivazione dei macrofagi di tipo M2 stimola processi di sintesi attraverso l'azione di citochine con azione anabolica (Keane et al., 2012). L'equilibrio tra questi due tipi cellulari in seguito all'impianto tende a spostarsi verso il tipo 2 se il processo di decellularizzazione è risultato efficace (Keane et al., 2012). La natura avascolare della cartilagine comporta una delle difficoltà maggiori nell'avvio della rigenerazione intrinseca ma determina anche il vantaggio di essere in gran parte isolata dal sistema immunitario. Questo consente un numero molto maggiore di opzioni intraprendibili al momento della scelta della fonte di origine della matrice extracellulare (incluse fonti allogeniche e xenogeniche) con minore probabilità di problemi di rigetto dei tessuti (Revell e Athanasiou, 2009). Inoltre la densa natura della matrice extracellulare cartilaginea potrebbe ulteriormente contribuire alla debole immunogenicità o anche assente dell'impianto in quanto proteggerebbe fisicamente i condrociti dalle cellule T e NK che vengono rilasciate in caso di rigetto (Revell e Athanasiou, 2009). Va tenuto conto in ogni caso che il processo può richiedere tempistiche prolungate e compromettere le proprietà meccaniche dei tessuti oggetto di studio (Crapo et al., 2011). È oltretutto importante che vengano preservati i fattori di crescita presenti all'interno della matrice, dati i loro effetti di prevenzione della degradazione della matrice. Tra questi ricordano come già accennato in precedenza l'effetto del TGF- β di stimolo della produzione del collagene di tipo II e dell'inibizione della

produzione di MMP (Thompson et al., 2001), oppure quello delle bone morphogenetic proteins (BMP) di supporto dello sviluppo della cartilagine articolare tramite la regolazione della produzione della matrice extracellulare e l'apoptosi selettiva delle cellule coinvolte (Oshin e Stewart, 2007).

Per quanto riguarda le applicazioni di matrice cartilaginea decellularizzata nel lavoro svolto di la matrice decellularizzata è stata valutata come potenziale microambiente in grado di accogliere una popolazione condrocitaria già differenziata, di cui verrà discusso in seguito. Ma vi sono ulteriori approcci che sono stati oggetto di precedenti studi. Avendo a disposizione le condizioni tissutali a cui sono fisiologicamente sottoposte le cellule del tessuto cartilagineo consegue il vantaggio di poter supportare la rigenerazione della cartilagine articolare senza il bisogno di ulteriori processi per provvedere siti di adesione e segnali biochimici in grado di stimolare il reclutamento e il differenziamento delle cellule progenitrici (Vorotnikova et al., 2010). Ad esempio uno studio ha mostrato una maggiore efficacia della cartilagine articolare suina decellularizzata come base per la semina di cellule stromali mesenchimali di ratto derivanti dal midollo osseo (rBMSC) rispetto alla cartilagine unicamente devitalizzata e alla condrogenesi indotta in vitro in termini di proliferazione cellulare ed espressione genica del collagene di tipo II (figura 20) (Sutherland et al., 2015). Nello specifico nello studio si sono utilizzate rBMSC in cultura all'interno di pellet cellulari con unicamente un MEM apposito (gruppo di controllo), con l'aggiunta di TGF- β 3 ricombinante umano (gruppo TGF- β 3), con particelle di cartilagine decellularizzata chimicamente (gruppo DCC) o con l'aggiunta di particelle di cartilagine fisicamente devitalizzata (DVC).

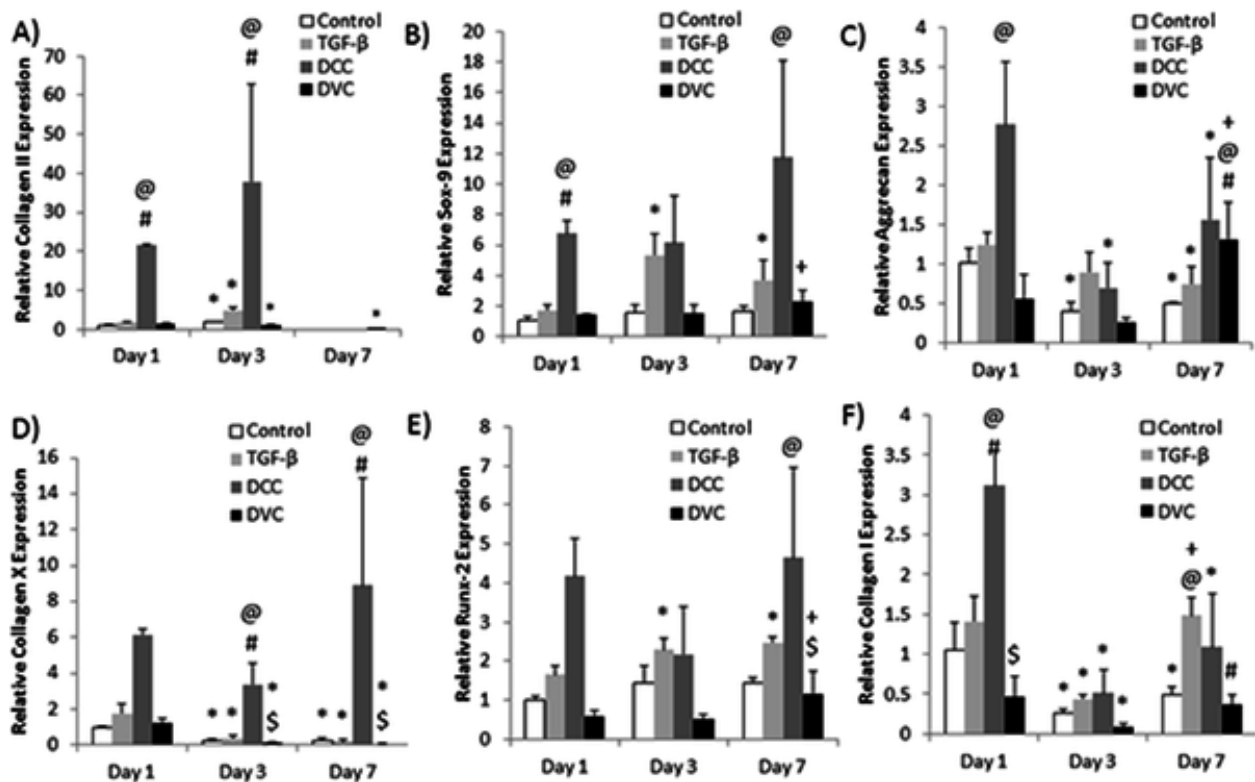


Figura 20: da Sutherland et al., 2015; istogrammi rappresentativi dell'espressione genica relativa di marker condrogenici e osteogenici dei vari gruppi oggetto dello studio (collagene di tipo II, Sox-9, aggrecani, collagene di tipo X, Runx-2 e collagene di tipo I).

Nonostante nello studio non sia stata raggiunta una conclusione sulla della causa per cui la matrice decellularizzata induca con maggiore efficacia nei processi di condrogenesi rispetto a quella devitalizzata è stata avanzata l'ipotesi secondo cui rimuovere i contenuti cellulari e una parte dei GAG permetta alle cellule di infiltrarsi meglio nel biomateriale e fissarsi alla matrice cartilaginea. La matrice extracellulare cartilaginea è stata anche impiegata sotto forma di microparticelle per trasporto di TGF-β3 alle MSC in un ambiente a base di gel di fibrina (Almeida et al., 2016; Almeida et al., 2014). In seguito all'impianto sottocutaneo questo ha maggiormente promosso la formazione di cartilagine ectopica comparata ai normali sistemi di microsferi di gelatina o ai gel di fibrina non funzionalizzati. Mentre la capacità dei componenti della matrice extracellulare di fornire stimoli condroinduttivi alle cellule stromali mesenchimali è stata dimostrata in vivo e in vitro, l'applicabilità clinica di queste strategie necessita di ulteriori studi, in modo da definire con chiarezza il ruolo della matrice extracellulare cartilaginea nel corso della condrogenesi, la possibile risposta immunogenica e l'effettiva efficacia nel rigenerare difetti indotti della cartilagine articolare (Almeida et al., 2016).

Protocolli di decellularizzazione del tessuto cartilagineo

In letteratura esistono diversi metodi utilizzati e possibilmente combinabili tra di loro. Il protocollo applicato in questa tesi deriva da una serie di ottimizzazioni dei processi fisici e chimici messe in atto nel Laboratorio di Anatomia ed Istologia. Un protocollo alternativo è stato considerato nello studio di Antons e colleghi del 2018. Questo si basa sull'esposizione dei campioni all'azione di un detergente legante anidride carbonica (CO₂) e in seguito a un'atmosfera con livelli di CO₂ oltre la soglia critica (Antons et al., 2018). Nello specifico si utilizzarono dei campioni di cartilagine articolare bovina che vennero inizialmente sottoposti a un pretrattamento organizzato in più fasi:

- 6 cicli di congelamento a -80°C e scongelamento, inclusa la fase iniziale di deposito a -80°C per 2 ore e poi a 37°C per 1 ora
- Immersione in tripsina-EDTA allo 0,05% a 37°C per 24 ore
- Esposizione a shock osmotico tramite immersione in una soluzione tampone ipertonica per 20 ore.

In seguito venne adoperato il trattamento principale di lavaggio per 24 ore con LS-54 al 2% (il detergente legante la CO₂) fino alla saturazione dei tessuti durante vigorosa agitazione. In seguito i campioni furono singolarmente sigillati all'interno di sacche di sterilizzazione e posti in autoclave per 1 ora. Qui fu immessa CO₂ pura al 99,9% aumentando poi la pressione a 25Mpa e mantenendo una temperatura di 37°C. Al termine previsto del processo la pressione fu riabbassata velocemente a un ritmo di 10Mpa/minuto e per rimuovere il detergente residuo i campioni furono lavati in PBS durante vigorosa agitazione per 24 ore cambiando il PBS ogni 8 ore. Al controllo istologico si osservò con colorazione EE si osservò la completa rimozione dei nuclei cellulari dal tessuto cartilagineo e tramite colorazione con rosso picrosirio la conservazione del collagene. Tuttavia si riscontrò una severa perdita del contenuto dei GAG tramite colorazione con alcian blu. All'osservazione al SEM la densità della matrice extracellulare cartilaginea appariva diminuita e la trama delle fibre collagene appariva leggermente meno compatta (figura 21).

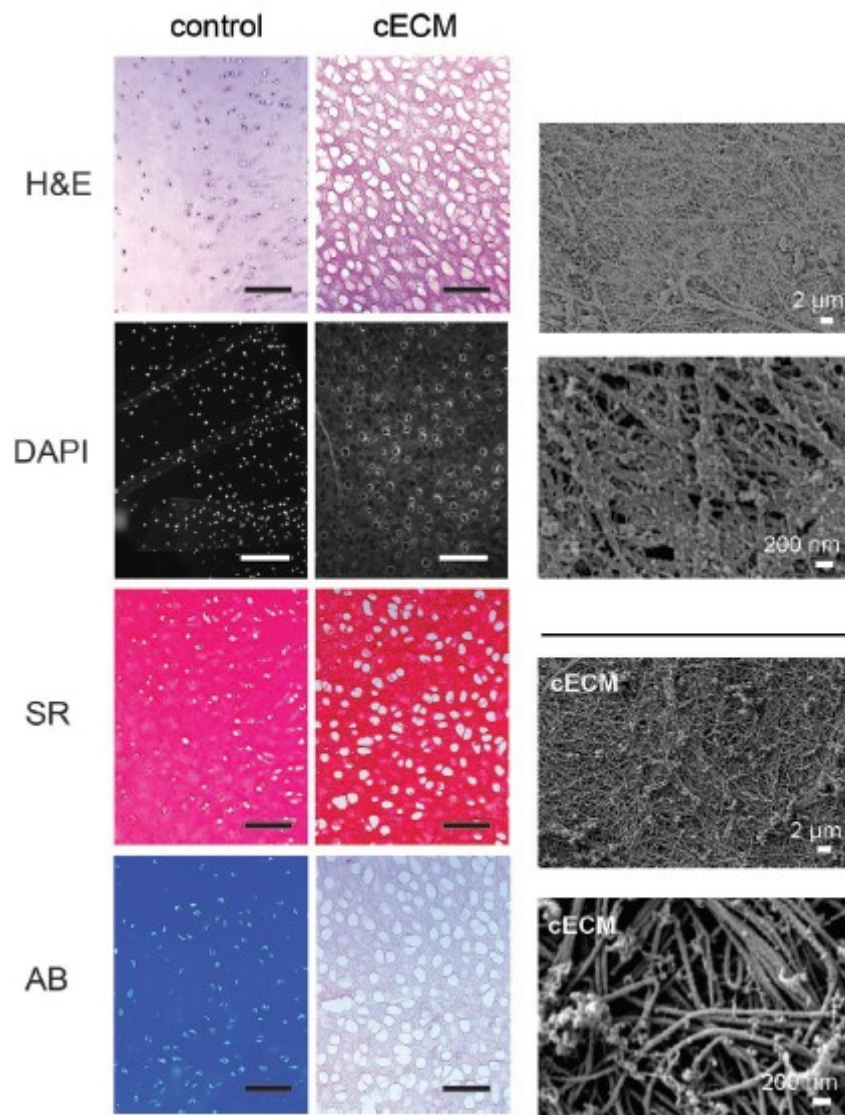


Figura 21: da Antons et al., 2018, modificato. A sinistra: confronto del tessuto prima (control) e dopo (cECM) il trattamento di decellularizzazione. Nelle righe si osservano la colorazione EE, DAPI, rosso picrosirio e alcian blue. A destra: ultrastruttura della cartilagine all'osservazione con SEM a diversi ingrandimenti. Le due immagini nella parte superiore mostrano il tessuto prima del trattamento di decellularizzazione, le due immagini sotto l'aspetto successivo.

Un altro dato ricavabile dalle procedure di laboratorio sono furono le considerazioni sulle proprietà elastiche della cartilagine articolare durante un test di compressione del tessuto. Infatti il processo di decellularizzazione ne ridusse il modulo elastico ($p < 0,0001$) da $12,06 \pm 2,14 \text{ Mpa}$ a $1,17 \pm 0,34 \text{ Mpa}$, mantenendo il $14,44 \pm 2,81\%$ del modulo elastico iniziale. In definitiva va considerato che i processi di decellularizzazione non comportano obbligatoriamente una riduzione significativa dei GAG. Ad esempio la decellularizzazione dei tessuti appartenenti al cuore di ratti oggetto di uno studio precedente tramite SDS immesso con un flusso pulsante ha conservato la maggior parte dei GAG presenti nella matrice extracellulare (Park et al., 2018). Verosimilmente l'ottimizzazione dei protocolli di

decellularizzazione potrebbe ad esempio aumentare significativamente il livello di GAG residui nei tessuti decellularizzati del nucleo polposo secondo i trattamenti attualmente disponibili (Illien-Jünger et al., 2016). I GAG sono importanti per le proprietà viscoelastiche dei tessuti (Lovekamp et al., 2006). La riduzione dei GAG venne presa come possibile spiegazione della disposizione più scomposta delle fibre collagene nell'ultrastruttura della cartilagine dopo la decellularizzazione. Questo ritrovamento fu in accordo con i risultati di Schneider et al. (2016) che indicavano una disposizione simile in seguito al protocollo eseguito anche nel tessuto cartilagineo di origine umana. Per quanto riguarda le proprietà elastiche della matrice extracellulare cartilaginea decellularizzata ritrovamenti simili si ritrovano nello studio di Bautista et al. (2016), secondo cui in seguito a un protocollo di decellularizzazione basato sull'SDS della cartilagine suina il modulo elastico di equilibrio si sarebbe ridotto da 0,145Mpa a 0,035Mpa. Nello studio di Bautista la riduzione del modulo elastico potrebbe essere dovuta al prolungato pre-trattamento, che avrebbe rimosso la maggior parte dei GAG dalla matrice. La perdita dei GAG, che attraggono molecole d'acqua all'interno della matrice, influenza in questo modo le proprietà meccaniche del tessuto attraverso la diminuzione della pressione idrostatica (Bautista et al., 2016). Riassumendo, nel corso dello studio di Antons et al. (2018) l'aggressivo pre-trattamento che si rese necessario utilizzare a causa dell'incompleta decellularizzazione operata dall'esposizione al detergente legante CO₂ e alla CO₂ a concentrazioni oltre la soglia critica fu la causa delle alterazioni delle proprietà meccaniche del tessuto. Una soluzione ipotizzata fu quella di modifica dei parametri dei vari trattamenti utilizzati come la pressione, la durata dei trattamenti, la temperatura e la concentrazione del detergente. Con il protocollo utilizzato i tessuti decellularizzati contenevano residui di detergente e si rese necessario un ulteriore passaggio in PBS per aumentarne la biocompatibilità. Il detergente utilizzato (Dehyphon® LS-54 è un surfactante comune per uso domestico e industriale ed è caratterizzato da proprietà tossiche (in particolare per gli organismi acquatici), riscontrata anche nel corso di studi preliminari a diversi dosaggi. Nello specifico l'LS-54 allo 0,01% in una soluzione di DMEM dimostrò tossicità nei confronti dei condrociti di origine bovina. I condrociti mantennero la loro vitalità con l'LS-54 a una concentrazione dello 0,002%, di conseguenza la rimozione completa del detergente dalla matrice decellularizzata è necessaria. Ma per poterla confermare si renderebbe necessario l'utilizzo di metodiche analitiche come la risonanza magnetica nucleare (Juanssilferro et al., 2011)

Nello studio di Fermor et al. (2015) fu testato un altro protocollo base per ottenere la decellularizzazione di tessuti osteocondrali, riutilizzandolo più volte e apportando variazioni ai trattamenti impiegati. Di conseguenza vennero valutate diverse varianti dello stesso protocollo. I campioni utilizzati avevano origine bovina e furono prelevati tramite incisione delle superfici articolari femorale e patellare mediali. La prima variante del processo prevedeva il congelamento dei campioni a -20°C e in seguito lo scongelamento a 42°C , ripetendo queste operazioni per 4 volte, durante le ultime 3 i campioni vennero mantenuti in immersione in una soluzione ipotonica. In seguito subirono una serie di lavaggi in PBS, per poi essere di nuovo lavati in soluzione ipotonica (soluzione di tris-HCl 10Mm, pH=8; con una soluzione di aprotinina 10KIU mL^{-1}) per 18 ore e poi per 24 ore con una soluzione ipotonica contenente SDS allo 0,1%. Dopo una seconda serie di lavaggi in PBS furono incubati in una soluzione contenente nucleasi (soluzione Tris 50mM a pH 7,5, con 10mM di cloruro di magnesio, 50U mL^{-1} di DNAasi e 1U mL^{-1} di RNAasi). Infine fu eseguita una serie di lavaggi in PBS, un passaggio di sterilizzazione in acido peracetico allo 0,1% e un'ultima serie di lavaggi in PBS. Tutte le incubazioni furono effettuate alla temperatura di 42°C , con l'eccezione del trattamento con la soluzione con la nucleasi che fu condotta a 37°C e quello con acido peracetico a 27°C . Per quanto riguarda la seconda variante del protocollo differiva dalla prima per l'aggiunta di un lavaggio terminale prolungato in PBS per 36 ore alla fine del trattamento. La terza variante aggiunse rispetto alla seconda l'utilizzo di un idropulsore per rimuovere fisicamente i residui di midollo osseo con un sottile getto di PBS in seguito al ciclo di congelamenti e scongelamenti. La quarta variante introduceva l'incubazione dei tessuti osteocondrali a 42°C per 18 ore in PBS dopo il ciclo di congelamenti e l'uso dell'idropulsore. Infine la quinta variante del protocollo aggiunse un lavaggio addizionale in soluzione ipotonica per 24 ore e uno in SDS in soluzione ipotonica per altre 24 ore in seguito all'originale lavaggio in SDS. Inoltre in un'ultima versione vennero effettuati dei lavaggi aggiuntivi a lunga durata in PBS alla fine del trattamento. Alla valutazione dei risultati ottenuti si riscontrò che i tentavi iniziali di decellularizzare i tessuti osteocondrali di origine bovina utilizzando la prima variante del protocollo non ebbero successo e questo condusse a numerose iterazioni del processo. In seguito alle colorazioni EE e DAPI si osservarono alcune cellule presenti nel tessuto cartilagineo e in quello osseo. Il livello del contenuto di GAG della cartilagine in seguito al processo di decellularizzazione fu determinato tramite valutazione dell'assorbanza dei campioni in seguito alla loro

digestione e processazione chimica. Nella valutazione in seguito alla prima variante del protocollo di decellularizzazione non era significativamente differente da quello del tessuto originale (al contrario del risultato del protocollo applicato da Antons et al.) (figura 22), in ogni caso una riduzione fu osservata nelle sezioni della zona superficiale e media della cartilagine rispetto alla cartilagine prima del trattamento in seguito alla colorazione con O Safranina. Tramite un sistema artificiale di compressione fu misurata la deformazione percentuale del tessuto, che non risultava significativamente differente da quella del tessuto originale (figura 23).

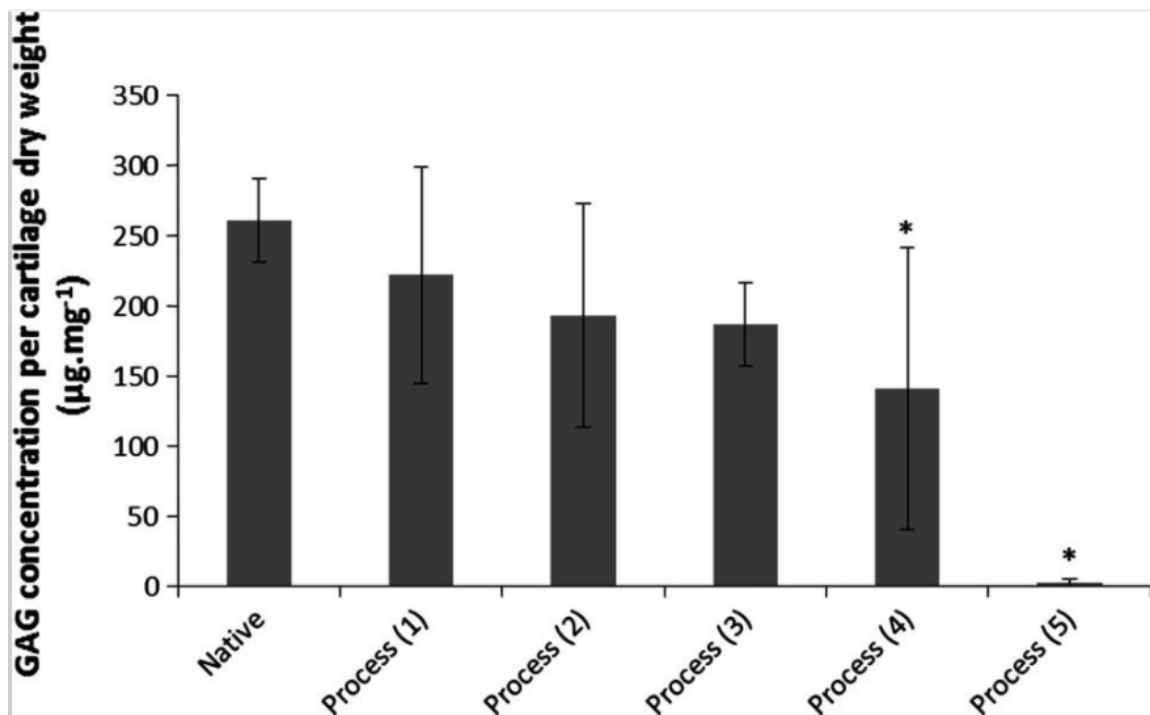


Figura 22: da Fermor et al., 2015; istogramma rappresentante i livelli di GAG contenuti nel tessuto cartilagineo bovino originale e in seguito ai processi di decellularizzazione. I dati sono mostrati come media (tessuto originale e decellularizzato tramite la prima variante con $n=5$ e gli altri con $n=3$) di $\pm 95\%$ di limiti di confidenza. * indica una differenza significativa rispetto al tessuto non trattato con $P < 0,05$.

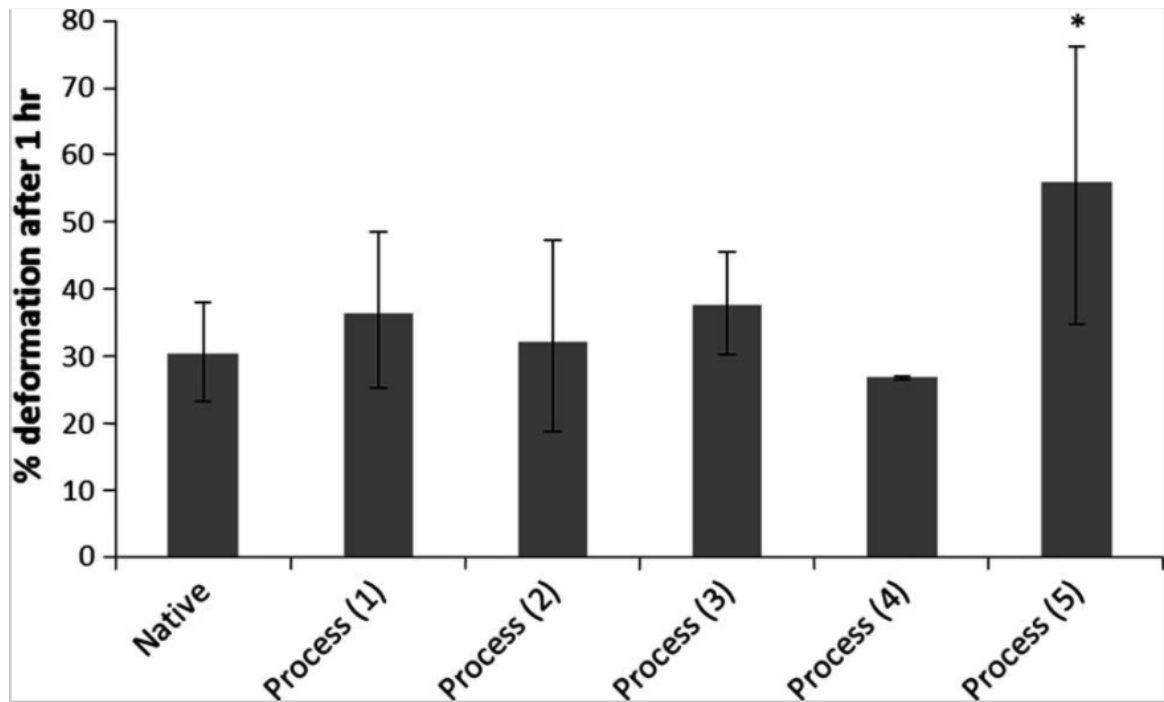


Figura 23: da Fermor et al., 2015; istogramma rappresentante la percentuale di deformazione del tessuto cartilagineo sottoposto a una forza compressiva di 0,8N per 1 ora, prima e dopo il trattamento. L'arcoseno dei dati è stato utilizzato per il calcolo del 95% dei limiti di confidenza e analisi della varianza. I dati sono mostrati come media (con $n=5$ per il tessuto non trattato e trattato con la prima variante e con $n=3$ per gli altri processi) del 95% dei limiti di confidenza. * indica una differenza significativa coi dati riferiti al tessuto non trattato con $P<0,05$.

Alla valutazione del tessuto trattato con la seconda variante del processo si notò che introducendo una fase prolungata di lavaggio con PBS alla fine della prima variante del trattamento di decellularizzazione i campioni mostrarono una riduzione molto maggiore del contenuto cellulare. Alcune cellule nucleate erano ancora visibili nello strato profondo e in quello calcificato della cartilagine e nell'osso subcondrale. Non fu osservata una differenza significativa nel livello dei GAG contenuti nella cartilagine trattata rispetto a quella non trattata, per quanto ci fu comunque una riduzione (figura 22). Allo stesso modo non si riscontrò una differenza significativa nella percentuale di deformazione della cartilagine rispetto a quella prima del trattamento (figura 23). Per quanto riguarda la terza variante del protocollo di decellularizzazione alla valutazione istologica non si riscontrarono danni al tessuto osseo o cartilagineo, ma alcune cellule erano ancora visibili nelle aree più dense del tessuto osseo. Non furono osservate differenze significative tra il livello dei GAG contenuti o le proprietà biomeccaniche del tessuto trattato rispetto a quello originale (figura 22, figura 23). All'analisi istologica si riscontrò tuttavia una visibile riduzione del livello dei GAG presenti all'interno del tessuto. Alla valutazione dei risultati della quarta variante del protocollo applicata si osservò che l'agitazione in PBS per 18 ore a 42°C prima del trattamento con l'idropulsore diminuì la densità del midollo osseo.

Questo permise una rimozione molto più efficace ed estesa, nonostante qualche nucleo cellulare persistette presso la giunzione osteocondrale. Fu tra l'altro osservata una riduzione significativa del contenuto di GAG rispetto al tessuto non trattato (figura 22) che venne anche confermata alla valutazione istologica. Invece la percentuale di deformazione della cartilagine non subì variazioni (figura 23). Con la valutazione dell'effetto della quinta variante del protocollo applicata si riscontrò che i due cicli aggiuntivi di trattamento con soluzione ipotonica e SDS erano necessari per rimuovere con successo tutti i residui di nuclei cellulari visibili all'osservazione istologica dai tessuti osteocondrali. Alla misurazione del livello dei GAG nei campioni tuttavia si osservò che la quasi totalità era stata rimossa (figura 22). Questo ebbe conseguenze sulle proprietà biomeccaniche dei tessuti e la percentuale di deformazione crebbe in maniera considerevole rispetto a quella dei campioni prima del trattamento (dal 30% al 56%) (figura 23). Data l'efficacia nella rimozione dei residui cellulari si mise in pratica una variante aggiuntiva del trattamento, al fine di rimuovere i residui di SDS presenti nei campioni e migliorarlo, nella quale vennero adoperata una fase aggiuntiva di lavaggi in PBS per 4 giorni alla fine del trattamento di decellularizzazione. Questo però ebbe un effetto disgregante sulla matrice cartilaginea, che divenne visibilmente danneggiata tra il secondo e il terzo giorno di trattamento, ritraendosi dal tessuto osseo o staccandosi completamente. La cartilagine rimasta era contratta e meno dura, con un'apparenza gelatinosa e una superficie irregolare e opaca (figura 24). In un precedente studio Schwarz et al. (2012) produssero una matrice extracellulare cartilaginea sottoponendo campioni di cartilagine nasale suina a un trattamento di decellularizzazione che risultò simile a quella ottenuta in quest'ultima variante del protocollo applicato da Fermor et al. e che a sua volta presentava una forte perdita nel livello di GAG contenuti.

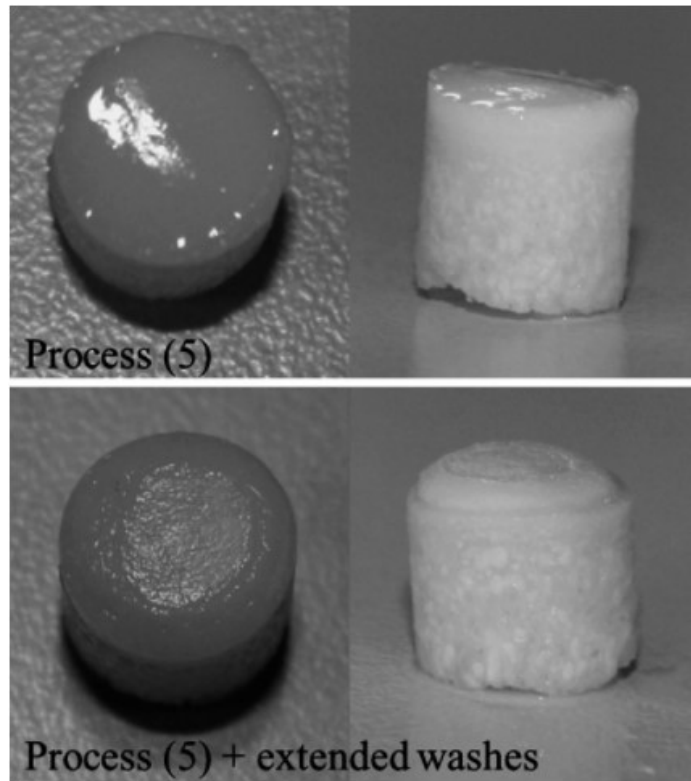


Figura 24: da Fermor et al 2015., immagini macroscopiche dei campioni decellularizzati con diversi protocolli utilizzati. Il pannello superiore mostra la cartilagine liscia e lucente in seguito alla quinta variante del protocollo di trattamento. Il pannello inferiore la superficie della cartilagine che risulta opaca e con una trama a macchie (a sinistra) e la cartilagine contratta e ritratta dall'osso (a destra) in seguito alla variante aggiuntiva con lavaggi prolungati.

Il protocollo di decellularizzazione di Fermor et al. fu sviluppato basandosi sul precedente su uno studio precedente (Greaves et al., 2013) e gli sviluppi dell'originale protocollo per i menischi di origine suina e i tessuti osteocondrali (Stapleton et al., 2008; Stapleton et al., 2011) che dimostrarono come l'aumento delle temperature di incubazione sia in grado di risolvere le problematiche di diffusione delle soluzioni decellularizzanti dovute alla densità della matrice cartilaginea e alto contenuto di GAG. Per arrivare al livello di decellularizzazione ottenuto nella quinta variante del trattamento furono necessarie tutte le operazioni aggiuntive che la distinguevano dalle precedenti varianti, mostrando come fosse necessaria l'allentamento e la rimozione dei residui di midollo osseo prima di introdurre le soluzioni decellularizzanti. Questo avrebbe favorito la diffusione delle soluzioni attraverso il tessuto osseo e il piatto subcondrale. Per rimuovere i residui cellulari dallo strato calcificato della cartilagine e dal tessuto osseo subcondrale, ossia le aree caratterizzate da maggiore densità vennero utilizzati due cicli di lavaggio con una soluzione ipotonica tampone e SDS a bassa concentrazione. Questo numero risultò comunque inferiore a quello dei lavaggi utilizzati in un protocollo simile elaborato in un

precedente studio (Kheir et al., 2011) per tessuti osteocondrali di origine suina. Mentre altri precedenti studi riscontrarono in modo simile un effetto di rimozione dei GAG dalla matrice extracellulare in seguito a trattamenti di decellularizzazione basati sull'SDS (Stapleton et al., 2008; Kheir et al., 2011). L'interruzione ionica delle proteine di legame attraverso l'azione dell'SDS comportava la disaggregazione degli aggregati di acido ialuronico e di conseguenza un aumento della mobilità dei GAG, è stata indicata come potenziale meccanismo della perdita dei GAG dei tessuti (Kheir et al., 2011). Per l'utilizzo di scaffold a livello clinico è essenziale che questi non abbiano effetti di tossicità. L'SDS ha dimostrato di possedere effetti citotossici quando non propriamente rimosso dai tessuti decellularizzati (Rieder et al., 2004). L'SDS è in grado di conferire carica negativa alle proteine, che può portare all'inibizione dei meccanismi di adesione e proliferazione cellulare e quindi alla loro sopravvivenza (Seddon et al., 2004). Per questo venne aggiunto nel corso dello svolgimento della quinta variante del trattamento una microfrazione di SDS radiomarcato, allo scopo di poterlo quantificare in seguito come residuo nei tessuti alla fine dei processi. I risultati mostrarono che la maggior parte dell'SDS era stata rimossa durante i processi di lavaggio dei campioni e che i tessuti decellularizzati contenevano meno di $37,5 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ di SDS (quantitativo espresso come ng di SDS per mg di campione come peso in umido), che corrispondeva a circa lo 0,0375% del peso totale in umido. Nonostante questo livello venisse comunque considerato tossico gli effetti sulle cellule usate nelle colture successive (cellule renali di criceto e fibroblasti di cavie) condotte per verificare eventuali effetti di citotossicità furono minimi. Questo fu probabilmente dovuto al fatto che l'SDS si fosse legato alla struttura tridimensionale del tessuto e che quindi non tutti i residui di SDS fossero disponibili per interagire con le cellule in coltura. In definitiva lo studio di Fermor et al. non raggiunse lo scopo principale di decellularizzazione efficace dei campioni di tessuti osteocondrali di origine bovina, ma risultò comunque utile per mettere in evidenza le difficoltà nel produrre tessuti osteocondrali acellulari, in merito anche della complessità e unicità della struttura della cartilagine articolare.

Alternative alle matrici decellularizzate: terapie cellulari

Le terapie cellulari finalizzate alla riparazione della cartilagine articolare si basano principalmente sull'utilizzo di due tipi cellulari: i condrociti maturi o le cellule stromali mesenchimali (MSC). I condrociti essendo le cellule principali della cartilagine sono una

scelta logica per gli approcci terapeutici basati sull'impianto cellulare e cellule ma presentano ancora molte problematiche da affrontare, tra cui le difficoltà nel condurre le colture di espansione. Nelle colture in monostrato, la sintesi di collagene di tipo II e aggrecani, tipicamente alti nella cartilagine ialina, è ridotta, mentre la produzione di collagene di tipo I e versicani è aumentata (Darling e Athanasiou, 2005). Questi cambiamenti fenotipici sono associati con un'alterazione dell'organizzazione dei fasci di filamenti di actina (o stress fibers) durante la transizione dalla matrice extracellulare cartilaginea sviluppata nelle 3 dimensioni alla coltura monostrato su plastica (Brown e Benya, 1988). Considerando l'importanza dell'ambiente tridimensionale provveduto dall'articolazione durante il suo sviluppo si deduce il vantaggio dell'utilizzo di scaffold che presentino una struttura analoga allo scopo di supportare il mantenimento del fenotipo condrogenico (come quelli derivanti dalle matrici extracellulari decellularizzate e quelli polimerici).

Le MSC offrono un approccio alternativo dalle grandi potenzialità e la possibilità di disporre di una fonte cellulare quasi illimitata in grado di differenziarsi in condrociti incoraggiò molto l'idea dello studio di applicazioni per la gestione di difetti cartilaginei. Inoltre la scoperta che le MSC sostengono il mantenimento del fenotipo dei condrociti quando posti in cocultura in vitro, aumentò le aspettative del campo di ricerca (Dahlin et al., 2014; Wu et al., 2012); gli esiti delle ricerche tuttavia hanno prodotto risultati contrastanti (Xu et al., 2013). In ogni caso la caratterizzazione delle MSC è ancora in corso di approfondimento, e le MSC di origine animale sono meno caratterizzate rispetto a quelle umane (Takemitsu et al., 2012; Screven et al., 2014). Il meccanismo d'azione delle MSC viene correntemente attribuito a processi immunomodulatori piuttosto che alla capacità delle MSC di differenziarsi in condrociti (Prasanna et al., 2010). Questi si manifestano tramite un'attività anti-infiammatoria sia diretta che indiretta tramite il richiamo di cellule reclutate nel sito di lesione attraverso la secrezione paracrina di fattori trofici (Ursini et al., 2019). L'efficacia di molte terapie a base di MSC è stata attribuita a fattori trofici (Baglio et al., 2012; Liang et al., 2014; Zhu et al., 2017) che influenzano gli ambienti tissutali lesionati e i relativi processi rigenerativi quali la migrazione cellulare, la proliferazione, la differenziazione e la sintesi della matrice. In ogni caso le cellule impiegano molto tempo per proliferare e per questo vi è la necessità clinica di tecniche alternative rapidamente impiegabili. Il medium condizionato generato dalle MSC contiene

una grande varietà di biomolecole inclusi fattori di crescita, citochine, chemochine e componenti della matrice extracellulare, che supportano la rigenerazione dei tessuti danneggiati. Ruolo chiave nella distribuzione tissutale di questi fattori da parte delle MSC sono vescicole extracellulari e vescicole legate alla membrana, incluse microvescicole ed esosomi (figura 25) (Lee et al., 2012; Lai et al., 2015), che giocano un importante ruolo nella comunicazione intercellulare oltre che nei processi rigenerativi (Lai et al., 2013).

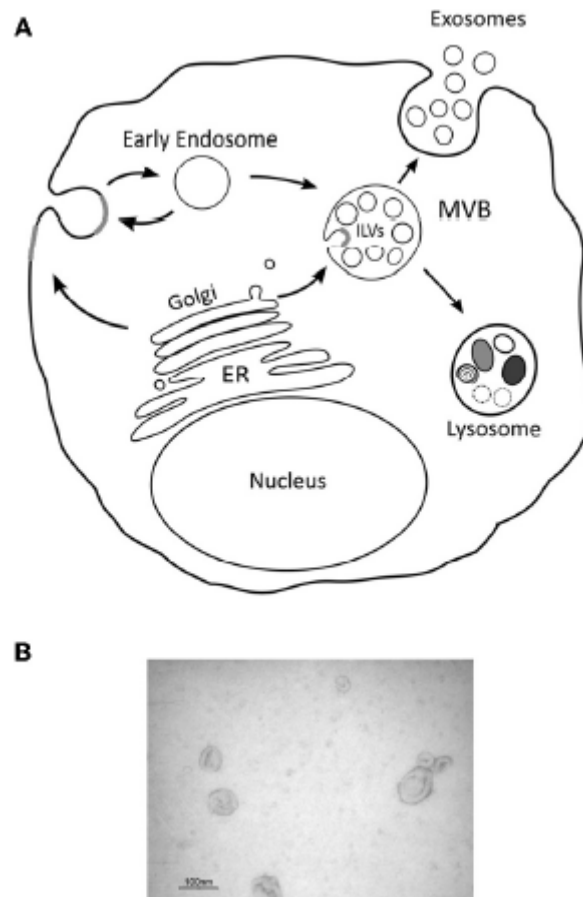


Figura 25: da Baglio et al., 2012, rappresentazione schematica della biogenesi di un esosoma. A: le vescicole intraluminari (ILVs) sono generate dall'introflessione della membrana limitante un sottogruppo di endosomi tardivi chiamati corpi multivescicolari (MVB). Questi possono dirigersi verso la periferia della cellula e dopo la fusione con la membrana cellulare, rilasciano il loro contenuto nello spazio extracellulare. Le vescicole intraluminari ora definite "esosomi" sono poi raccolte dalle cellule target. B: immagine ottenuta tramite microscopia elettronica di esosomi isolati tramite ultracentrifugazione differenziale.

Il medium condizionato, facilmente conservabile attraverso il congelamento senza la necessità di aggiungere sostanze criopreservanti nel lungo periodo, può rappresentare un'alternativa rapidamente disponibile per usi immediati. Per lungo tempo il profilo paracrino e l'uso clinico dei fattori paracrini e trofici delle MSC sono stati scarsamente approfonditi studiati. Villatoro et al. (2019) compararono per la prima volta il profilo

secretorio e la caratterizzazione degli esosomi in una coltura standard monostrato di MSC canine derivanti dal midollo osseo (cBM-MSc) e dal tessuto adiposo (cAD-MSc). Alla fine dello studio dimostrarono rinvennero che le cAD-MSc avevano migliori capacità di proliferazione, mentre le cBM-MSc mostrarono un'attività secretoria significativamente maggiore di alcuni fattori solubili (IL-10, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12p40, IFN- γ , VEGF-A, NGF- β , TGF- β , NO e PGE2) ed esosomi nelle stesse condizioni di coltura standard. Un altro recente studio ha fornito fornì il profilo proteomico delle molecole rilasciate dinamicamente presenti nel medium condizionato delle cBM-MSc e ha dimostrato i loro effetti pro-angiogenetici, che potrebbero avere un'importante correlazione con possibili effetti terapeutici e applicazioni cliniche (Humenik et al., 2019). Le applicazioni delle MSc sono coinvolte in vari approcci terapeutici riguardanti diverse varie specie oltre a quella canina e gli diversi effetti a livello clinico sono già stati considerati. studiati. Ad esempio sono numerosi gli studi che hanno investigato la sicurezza e l'efficacia delle iniezioni intra-articolari, singole o ripetute, di MSc adulte allogeneiche per il trattamento dell'osteoartrite nei cavalli (Ferris et al., 2014; Broeckx et al., 2014; Mariñas-Pardo et al., 2018; Broeckx et al., 2019). Broeckx et al. (2018) riportarono un leggero aumento della temperatura dell'articolazione autolimitante e zoppia in seguito a una singola iniezione intra-articolare di MSc adulte derivanti dal sangue periferico (BD-MSc) in cavalli in salute. Gli stessi effetti furono tuttavia osservati in un gruppo di controllo di cavalli sempre in salute in cui nell'iniezione era stata utilizzata una soluzione salina ipotonica. Inoltre in un altro studio dello stesso gruppo volto a valutare alutante l'efficacia delle BD-MSc allogeneiche in cavalli affetti da osteoartrite delle articolazioni metacarpo- e metatarso-falangee non furono osservati effetti avversi in seguito alla singola iniezione intra-articolare. Gli autori dello studio inclusero l'utilizzo profilattico della somministrazione a livello sistemico di un FANS, che potrebbe averne sottostimato gli effetti (Broeckx et al., 2019). In seguito all'utilizzo di iniezioni ripetute di MSc è stato osservato in alcuni casi lo sviluppo di una risposta immunitaria e l'induzione di anticorpi citotossici agenti contro le MSc adulte allogeneiche è già stata descritta nei cavalli (Pezzanite et al., 2015; Berglund e Schnabel, 2017). Lo studio delle risposte immunitarie agli MHC è tuttavia ancora in corso di studio e le ipotesi in merito non sono concordanti. Nello studio di Prasanna et al. (2010) ad esempio si è osservato che le MSc di origine neonatale mostravano un'espressione minore di MHC-II in corso dell'infiammazione. Al contrario altri autori non hanno messo in evidenza differenze nelle reazioni post-iniezione tra le MSc autologhe e allogeneiche,

sia che avessero un'origine neonatale (Carrade et al., 2011) o derivassero dal midollo osseo da donatori adulti (Ardanaz et al., 2016). Per citare altri utilizzi a livello clinico delle MSC si può prendere in considerazione lo studio di Vilar et al. (2013), nella quale si utilizzarono AD-MSC con l'aggiunta di plasma arricchito in ricco di piastrine (PRP) sfruttandone i fattori di crescita al suo interno in grado di veicolare e potenziare gli effetti delle MSC. I risultati mostrarono un grande potenziali per l'utilizzo clinico nelle terapie di cani affetti da osteoartrite all'articolazione dell'anca. Infatti i cani utilizzati nel corso dello studio migliorarono l'andatura in assenza di effetti collaterali. Un risultato simile venne osservato nello studio di Guercio et al. (2012), dove la somministrazione di AD-MSC portò a un miglioramento clinico di cani affetti da osteoartrite all'articolazione del gomito cubito, maggiore di quello osservato in seguito alla terapia farmacologica. Infine, nello studio di Seo et al. (2013), si osservarono gli effetti delle MSC utilizzate assieme a condrociti maturi e PRP plasma ricco di piastrine aventi come base delle spugne di gelatina e β fosfato tricalcico nel trattamento di difetti osteocondrali artificialmente indotti in un gruppo di cavalli allo scopo di reperire informazioni nel trattamento dell'osteocondrosi. I risultati mostrarono miglioramenti macroscopici e istologici a livello cartilagineo promuovendone la rigenerazione.

Scaffold polimerici

Il protocollo ideale di decellularizzazione dovrebbe rimuovere tutte le cellule e i relativi antigeni, mantenendo contemporaneamente le proprietà biologiche della matrice extracellulare. I potenziali effetti condroinduttivi dei fattori di crescita e dei GAG ritenuti all'interno della matrice cartilaginea sono tuttavia ancora in corso di studio. Inoltre vi sono alcune evidenze che il processo di decellularizzazione possa alterare le proprietà biomeccaniche delle matrici cartilaginee decellularizzate. Allo scopo di aggirare questo problema la riorganizzazione del collagene in cross-legami (Elder et al., 2017) (figura 26) o la combinazione dei componenti della matrice extracellulare cartilaginea con polimeri sintetici (figura 27) offrono una possibile soluzione, mantenendo i vantaggi funzionali delle precedenti soluzioni e limitandone le problematiche (Cui et al., 2003; Chen et al., 2004; Jin et al., 2009; Callahan et al., 2012; Liao et al., 2015).

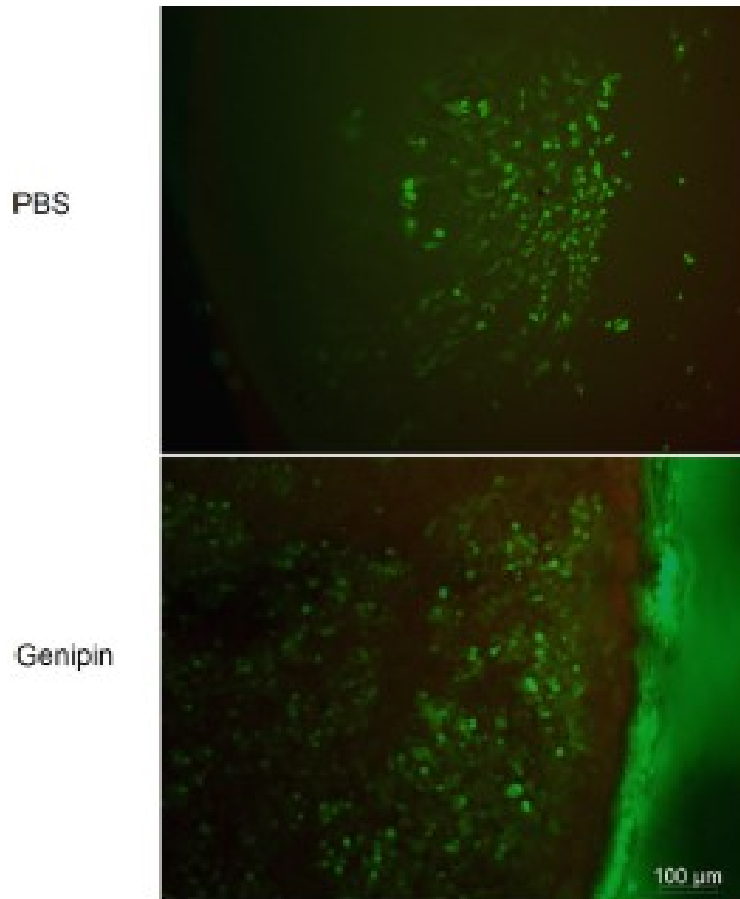


Figura 26: da Elder et al., 2017; vitalità di condrociti di origine suina dopo 5 giorni dalla semina in cartilagine autologa decellularizzata trattata (sopra) con PBS e (sotto) con genipin (un agente naturale cross-legante le fibre collagene), sovrapposizione di fluorescenza verde e rossa. Le cellule vitali convertono tramite enzimi la calceina AM non fluorescente permeante le cellule in calceina fluorescente (verde). Le cellule morte consentono l'ingresso dell'omodimero 1 dell'etidio, che genera fluorescenza in seguito al legame con gli acidi nucleici (rossa).

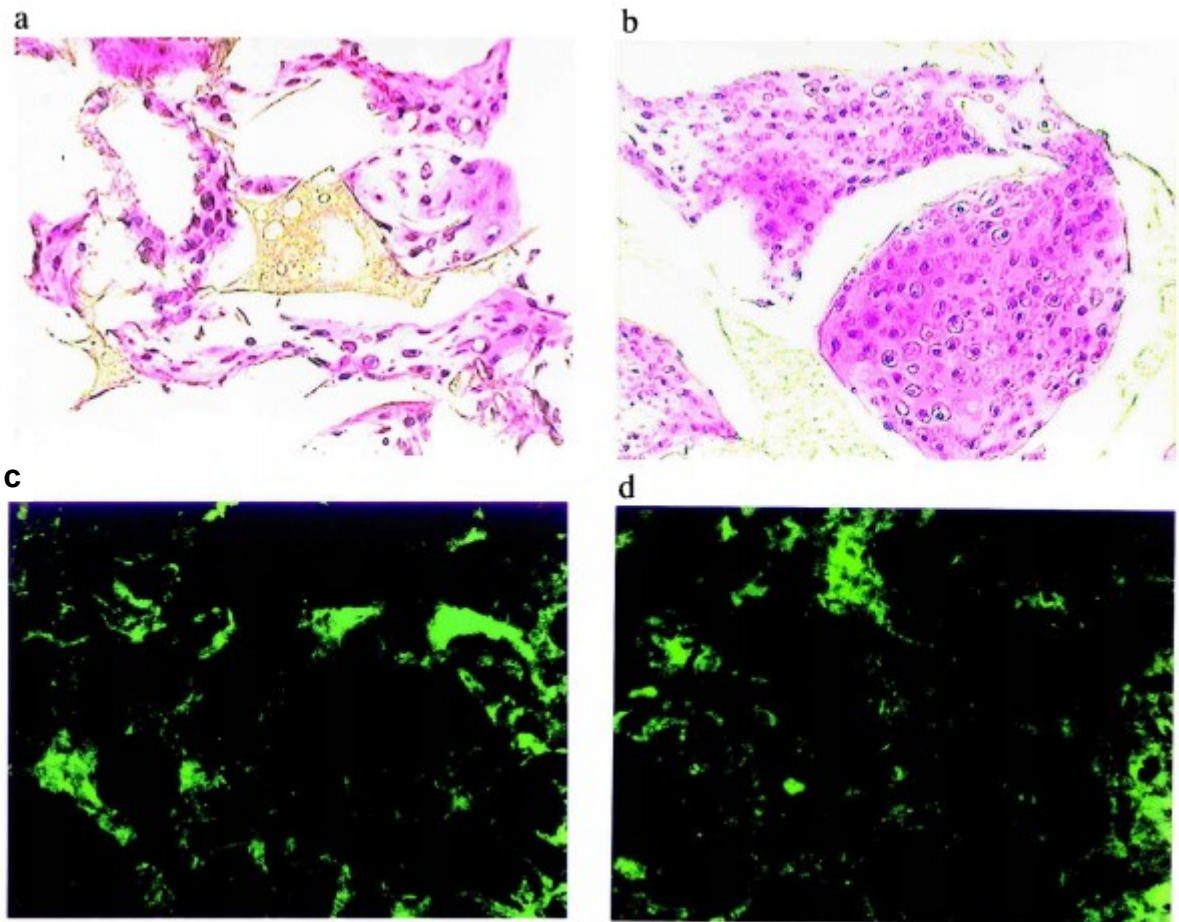


Figura 27: da Chen et al., 2004; colorazione EE (a e b) e colorazione immunohistochimica del collagene di tipo II (c e d) di condrociti bovini in coltura in vitro in spugne di poliacido lattico-co-glicolico-DL ibridato (PLGA) con collagene. Osservazione a 4 settimane (a e c) e 6 settimane (b e d). Ingrandimento x100.

Ad esempio il tessuto cartilagineo decellularizzato può essere combinato con scaffold realizzati in polimeri (ad esempio il PLGA) per aumentarne la resistenza alle forze compressive da una parte (Moutos et al., 2010) e sostenere la differenziazione condrogenica delle MSC dall'altra (Sutherland et al., 2015). Un'altra limitazione nell'utilizzo degli scaffold derivati dalla matrice cartilaginea è dovuta alla contrazione verificabile in presenza di cellule durante la coltura in vitro, che può essere prevenuta tramite l'applicazione di varie tecniche cross leganti del collagene di tipo chimico e fisico, come osservato nello studio di Rowland et al. (2013). In alternativa agli scaffold derivanti dalle matrici extracellulari i condrociti possono essere utilizzati dopo isolamento in combinazione con matrici 3D che presentano la stessa struttura di base. All'interno della cartilagine articolare i condrociti sono posti nelle proprie lacune dove mantengono una forma rotondeggiante. L'isolamento dei condrociti dalla cartilagine articolare e la coltura in monostrato causano cambiamenti fenotipici associati a modificazioni del citoscheletro.

Nelle colture a 2 dimensioni assumono una forma simile a quella dei fibroblasti e si ritrovano stress fibers nella struttura del citoscheletro (Durrant et al., 1999; Langelier et al., 2000). L'uso di uno scaffold tridimensionale analogo alla struttura tissutale nella quale sono normalmente posti i condrociti, rappresenta un tentativo di migliorare la bioingegneria applicata alla cartilagine articolare. Il fenotipo dei condrociti non è influenzato solo dalla composizione del materiale ma anche dalla sua struttura tridimensionale, dalla sua porosità e dalla dimensione delle sue fibre. Ad esempio per fornire evidenza di quest'ultimo punto, in uno studio Li et al. (2006) misero in confronto diretto le nanofibre e le microfibre dello stesso materiale per scaffold, l'L-poli lactide (PLLA). Al contrario delle cellule messe in coltura nello scaffold in microfibre (MFSC) che assunsero una morfologia simile a quella dei fibroblasti e stress fibers di grandi dimensioni, le cellule seminate nello scaffold in nanofibre (NFSC) mantennero la loro forma sferica e un apparente posizionamento nelle proprie lacune, mostrando un'organizzazione delle fibre di actina simile a quella dei condrociti fisiologici, con l'assenza di stress fibers (figura 28).

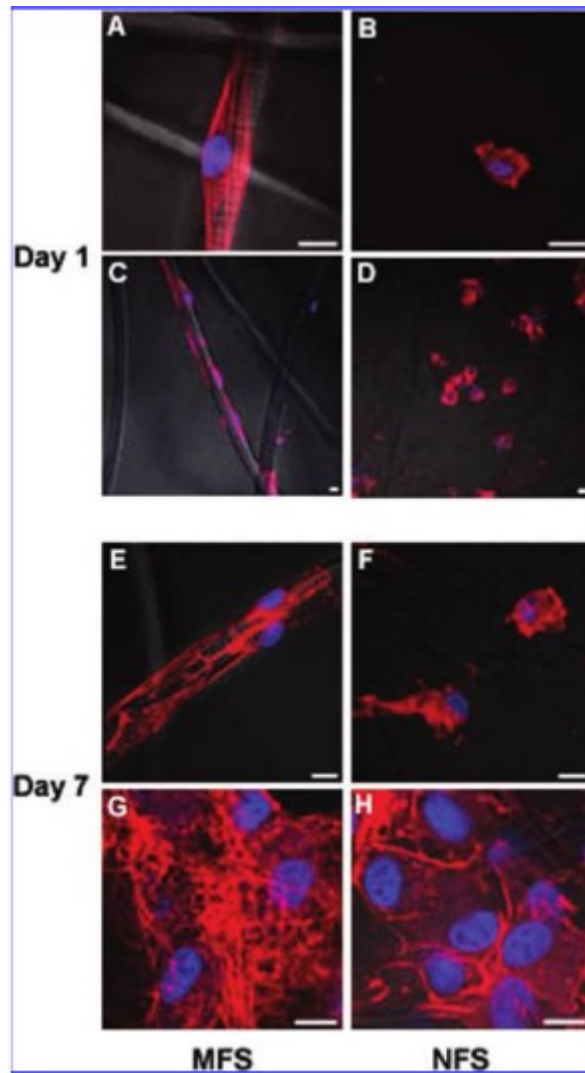


Figura 28: da Li et al., 2006; organizzazione del citoscheletro di actina nei condrociti seminati in microfibre e nanofibre al giorno 1 (A, B, C, D) e 7 (E, F, G, H) osservati tramite microscopia confocale a scansione laser. I filamenti di actina marcati con la TRITC-falloidina appaiono rossi e i nuclei in colorazione DAPI appaiono blu. La barra indicata corrisponde a $25\mu\text{m}$. (A): i condrociti in MFSC presentano grandi stress fibers organizzate. (B) i corti e disorganizzati filamenti di actina sono accumulati nella zona più esterna delle cellule in NFSC. (C): cellule fusiformi attaccate alle microfibre. (D): cellule sferiche cresciute nello spazio tra le nanofibre. (E): cellule appiattite con stress fibers disposte lungo le microfibre. (F): filamenti di actina dispersi nel citoplasma delle cellule in NFSC. (G): aggregati cellulari con stress fibers in MFSC. (H): filamenti di actina accumulati nella zona più esterna delle cellule che formando aggregati in NFSC.

Attraverso lo studio di colture condrocitarie su scaffold sintetici furono valutate anche la distribuzione zonale dei condrociti nello spazio e l'organizzazione dei componenti della matrice extracellulare in base al gradiente di porosità e alla tecnica di semina cellulare. Allo scopo furono realizzati degli scaffold porosi in copolimeri di poli (glicole etilenico)-tereftalato-poli (butilene-tereftalato) (PEGT/PBT) con diverse disposizioni delle fibre: a distanza omogenea (1mm) o secondo un progressivo gradiente (0,5mm nella zona superficiale, 1mm nella zona intermedia e 2mm nella zona profonda). Fu poi osservata

una distribuzione irregolare delle cellule e dei GAG all'interno dello scaffold, a prescindere dal tipo di semina cellulare (statico o dinamico). Così come era irregolare la distribuzione del collagene di tipo II, a causa di una maggiore sintesi per cellula nello strato profondo rispetto alle altre zone. Una limitazione di questo studio era dovuta all'utilizzo di condrociti provenienti da diversi strati (superficiali e profondi) della cartilagine articolare nella coltura eseguita (Woodfield et al., 2005). A questo scopo fu realizzato lo studio di Sharma et al. (2007), che dimostrò che le proprietà biologiche e meccaniche di un biomateriale sono influenzate dall'interazione dei condrociti con i diversi strati dello stesso. I condrociti della zona superficiale furono incapsulati nello strato superficiale di una struttura di idrogel a due strati, mentre in quello profondo furono incapsulati i condrociti provenienti dalla zona profonda. I due strati (superficiale e profondo) erano costituiti da poli (ossido di etilene) diacrilato (PEODA) e furono polimerizzati in modo da avere una zona distinta separante le due popolazioni condrocitarie. In seguito a una coltura di 6 settimane le cellule dello strato superficiale mantennero una morfologia simile mentre quelle dello strato profondo erano caratterizzate da dimensioni maggiori e forma sferica. Queste ultime inoltre produssero una quantità maggiore di GAG, oltretutto il grado di proliferazione cellulare nel complesso nello scaffold diminuì si abbassò rispetto a quello dello strato profondo, suggerendo la presenza di input di comunicazione cellulare tra i due strati. Alla verifica inoltre questo biomateriale dimostrò proprietà meccaniche superiori rispetto alle colture a singolo strato. Perciò questo lavoro offrì un modello di studio per l'interazione tra le diverse zone degli scaffold e fornì nuove conoscenze nell'ambito della rigenerazione tissutale cartilaginea. In un altro esempio di ingegneria tissutale cartilaginea bi-zonale venne utilizzato idrogel termoresponsivo basato sul citosan-g-poli(N-isopropilacrilamide) (CS-g-PNIPAAm) per supportare la proliferazione e la differenziazione di MSC e riprodurre la morfologia cellulare e l'organizzazione delle zone superficiale e media della cartilagine articolare. In seguito furono osservati aumenti della deposizione di collagene e GAG in associazione a una progressiva proliferazione cellulare, sostenendo la conclusione di un efficace differenziamento condrogenico nella coltura. Nello studio l'idrogel fu polimerizzato all'interno di microstampi di poli(glicole etilenico) dimetilacrilato (PEGDMA), che possedevano una microstruttura interna disorganizzata oppure orientata secondo dei microcanali di diverse larghezze. Nei microcanali più stretti si osservò l'allineamento e allungamento delle cellule (simili a quelli dello strato superficiale della cartilagine), mentre quelle risiedenti nei microcanali più larghi avevano un aspetto simile

a quelle della zona intermedia (figura 29) (Mellati et al., 2017). Studi futuri quindi avranno la possibilità di tentare di ricreare un tessuto in macroscala attraverso l'apposizione di diverse microstrutture.

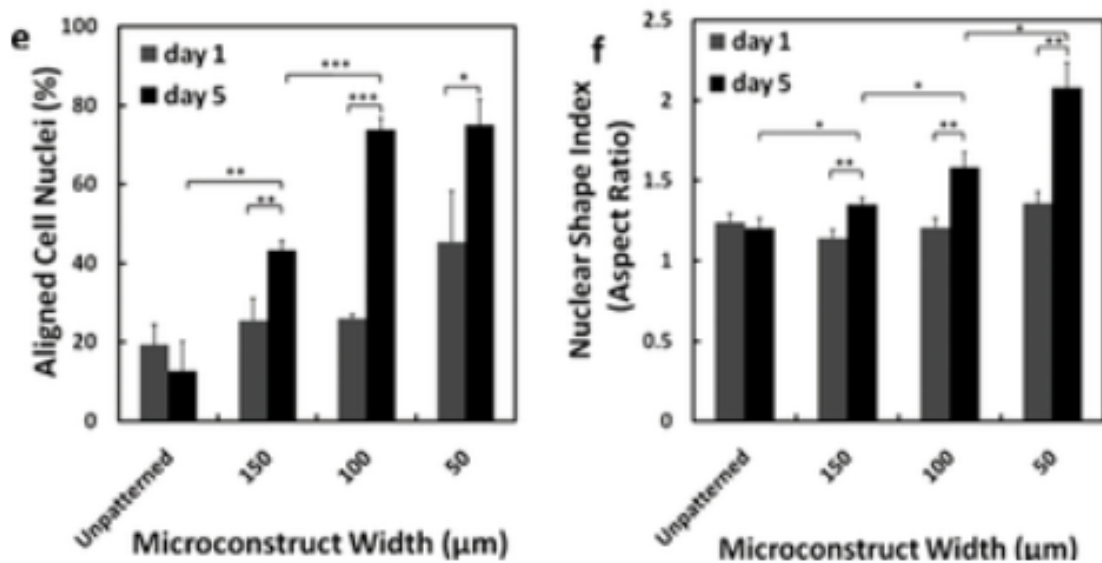


Figura 29: da Mellati et al., 2017, modificato. Rappresentazione delle variazioni di alcuni parametri cellulari dopo coltura in microstampi di gel PEG-DMA con microstruttura orientata in canali o disorganizzata, al giorno 1 e 5. e: media percentuale di nuclei cellulari allineati (non oltre 20° di differenza nell'orientamento). f: indici della forma nucleare media (lunghezza maggiore/lunghezza minore).

Conclusioni

Nell'ambito di questa trattazione è stato condotto in laboratorio un protocollo di decellularizzazione della cartilagine articolare ai fini della valutazione della sua efficacia complessiva. In seguito al trattamento i campioni sono stati oggetto di insemminazione di condrociti per poterne valutare la capacità di consentire il mantenimento della vitalità di questi ultimi e la loro proliferazione. Il processo di decellularizzazione ha avuto successo e all'osservazione tramite microscopio non si sono osservati nuclei cellulari o materiale nucleare residuo, mentre all'osservazione tramite SEM non si è evidenziato un calo della compattezza della matrice extracellulare o punti di eccessiva lassità. Questi risultati non sono stati completamente raggiunti da altri protocolli utilizzati citati nel corso di questa tesi, ad esempio nel protocollo utilizzato da Anton et al. (2018) i campioni al termine del trattamento presentavano un calo della densità della matrice e una trama delle fibre collagene meno compatta. Nel protocollo di Fermor et al. (2015) la decellularizzazione dei campioni è stata ottenuta insieme tuttavia a un'alterazione delle proprietà biomeccaniche di quest'ultimi, con una diminuzione della capacità di resistenza alla deformazione. Inoltre alla quantificazione del contenuto residuo dei GAG nella matrice questi risultavano fortemente diminuiti. Anche la parte riguardante la semina condrocitaria ha avuto successo e a 14 giorni dalla semina sono stati osservati dei condrociti disposti all'interno della matrice extracellulare. Non sono stati osservati condrociti negli strati più profondi della matrice come da aspettative in quanto la tecnica di semina dei condrociti ha permesso la loro deposizione solo sugli strati più superficiali. Tra le limitazioni di questo studio va considerato che non sono state condotte analisi aggiuntive per verificare la capacità del processo di decellularizzazione di conservare la matrice come la quantificazione dei GAG residui nella matrice o l'esecuzione di test di valutazione di resistenza a forze meccaniche deformanti. Allo stesso modo non sono stati condotte valutazioni dell'espressione genica dei condrociti seminati in seguito al periodo di coltura. Tutte queste valutazioni potrebbero essere oggetto di studi futuri e sarebbero in grado di fornire nuove informazioni ai fini della definizione di un protocollo di decellularizzazione efficace e che conservi le proprietà chimiche e strutturali della matrice.

Bibliografia

Adamo, S., M. De Felici, and A. Dolfi. "Istologia di Monesi (7a edizione)." Padova, Piccin (2018).

Allen MJ. Advances in total joint replacement in small animals. *J Small Anim Pract.* 2012 Sep;53(9):495-506.

De Angelis E, Cacchioli A, Ravanetti F, Bileti R, Cavalli V, Martelli P, Borghetti P. Gene expression markers in horse articular chondrocytes: Chondrogenic differentiation IN VITRO depends on the proliferative potential and ageing. Implication for tissue engineering of cartilage. *Res Vet Sci.* 2020 Feb;128:107-117.

Almeida HV, Eswaramoorthy R, Cunniffe GM, Buckley CT, O'Brien FJ, Kelly DJ. Fibrin hydrogels functionalized with cartilage extracellular matrix and incorporating freshly isolated stromal cells as an injectable for cartilage regeneration. *Acta Biomater.* 2016 May;36:55-62.

H.V. Almeida, Y. Liu, G.M. Cunniffe, K.J. Mulhall, A. Matsiko, C.T. Buckley, F.J. O'Brien, D.J. Kelly. Controlled release of transforming growth factor- β 3 from cartilage-extracellular-matrix-derived scaffolds to promote chondrogenesis of human-joint-tissue-derived stem cells. *Acta Biomater.*, 10 (10) (2014), pp. 4400-4409.

Anderson KL, O'Neill DG, Brodbelt DC, Church DB, Meeson RL, Sargan D, Summers JF, Zulch H, Collins LM. Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *Sci Rep.* 2018 Apr 4;8(1):5641.

Antons, J., Marascio, M. G. M., Aeberhard, P., Weissenberger, G., Hirt-Burri, N., Applegate, L. A., Bourban, P.-E.; Pioletti, D. (2018). Decellularised tissues obtained by a CO₂-philic detergent and supercritical CO₂. *European Cells and Materials*, 36, 81-95.

Aragon C. L., Hofmeister E. H., Budsberg S. C. (2007) Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230, 514– 521.

Arai K, Nagashima Y, Takemoto T, Nishiyama T. Mechanical strain increases expression of type XII collagen in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell Struct Funct.* 2008; 33(2):203-10.

Arai K, Tagami M, Hatazoe T, Nishimatsu E, Shimizu Y, Fujiki M, et al. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid, serum and urine from 51 racehorses with carpal bone fracture. *J Vet Med Sci* 2008;70:915–21.

Ardanaz N, Vázquez FJ, Romero A, Remacha AR, Barrachina L, Sanz A, Ranera B, Vitoria A, Albareda J, Prades M, Zaragoza P, Martín-Burriel I, Rodellar C. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Vet Res.* 2016 Mar 31; 12():65.

Armitage S, Seman EI, Keirse MJ. Use of surgisis for treatment of anterior and posterior vaginal prolapse. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:376251.

Asher L, Diesel G, Summers JF, McGreevy PD, Collins LM. Inherited defects in pedigree dogs. Part 1: disorders related to breed standards. *Vet J.* 2009 Dec;182(3):402-11.

Aubin H, Kranz A, Hülsmann J, Lichtenberg A, Akhyari P. Decellularized whole heart for bioartificial heart. *Methods Mol Biol.* 2013;1036:163-78.

S.F. Badylak. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28 (2007), pp. 3587-3593

S.R. Baglio, D.M. Pegtel, N. Baldini. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front. Physiol.*, 3 (2012), p. 359.

Barone R., *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*. Vol. 2 - parte 1: Artrologia (pp 4-199). Edagricole, Milano, Italy, 2012.

J.E. Bauer. Responses of dogs to dietary omega-3 fatty acids. *J Am Vet Med Assoc*, 231 (11) (2007), pp. 1657-1661.

Bautista CA, Park HJ, Mazur CM, Aaron RK, Bilgen B. Effects of Chondroitinase ABC-Mediated Proteoglycan Digestion on Decellularization and Recellularization of Articular Cartilage. *PLoS One*. 2016 Jul 8;11(7):e0158976. doi: 10.1371/journal.pone.0158976. PMID: 27391810; PMCID: PMC4938233.

Benders KE, Weeren P, Badylak SF, Saris DB, Dhert WJ, Malda J. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends Biotechnol*. 2013;31(3):169–176. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.004.

Berglund AK, Schnabel LV. Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. *Equine Vet J*. 2017 Jul; 49(4):539-544.

Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*. 2008;87:77-95. doi: 10.1093/bmb/ldn025. Epub 2008 Aug 1. PMID: 18676397.

Boerman I, Selvarajah GT, Nielen M, Kirpensteijn J. Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma - a meta-analysis. *BMC Vet Res*. 2012 May 15;8:56.

M. Bokarewa, I. Nagaev, L. Dahlberg, et al. Reistin, an adipoline with potent proinflammatory properties. *J Immunol*, 174 (2005), pp. 5789-5795.

Broeckx S, Zimmerman M, Crocetti S, Suls M, Mariën T, Ferguson SJ, Chiers K, Duchateau L, Franco-Obregón A, Wuertz K, Spaas JH. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85917.

Broeckx SY, Seys B, Suls M, Vandenberghe A, Mariën T, Adriaensen E, Declercq J, Van Hecke L, Braun G, Hellmann K, Spaas JH. Equine Allogeneic Chondrogenic Induced

Mesenchymal Stem Cells Are an Effective Treatment for Degenerative Joint Disease in Horses. *Stem Cells Dev.* 2019 Mar 15;28(6):410-422.

Broeckx SY, Spaas JH, Chiers K, Duchateau L, Van Hecke L, Van Brantegem L, Dumoulin M, Martens AM, Pille F. Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells: A GCP target animal safety and biodistribution study. *Res Vet Sci.* 2018 Apr; 117():246-254.

Cimino Brown D. What can we learn from osteoarthritis pain in companion animals? *Clin Exp Rheumatol.* 2017 Sep-Oct;35.

P.D. Brown, P.D. Benya. Alterations in chondrocyte cytoskeletal architecture during phenotypic modulation by retinoic acid and dihydrocytochalasin B-induced reexpression *J. Cell Biol.*, 106 (1) (1988), pp. 171-179.

S. Budsberg. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. J.S. Gaynor, W.W. Muir (Eds.), *Handbook of Veterinary Pain Management ((ed 2))*, Mosby Elsevier, St Louis (2009), pp. 183-209.

S.C. Budsberg, J.W. Bartges. Nutrition and osteoarthritis in dogs: does it Help? *Vet Clin Small Anim*, 36 (2006), pp. 1307-1323.

Cáceres LC, Bonacci GR, Sánchez MC, Chiabrando GA. Activated $\alpha(2)$ macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF- κ B activation in macrophage-derived cell lines. *J Cell Biochem* 2010;15:607–17.

L.A. Callahan, A.M. Ganos, D.L. McBurney, M.F. Dilisio, S.D. Weiner, W.E. Horton Jr., M.L. Becker. ECM production of primary human and bovine chondrocytes in hybrid PEG hydrogels containing type I collagen and hyaluronic acid *Biomacromolecules*, 13 (5) (2012), pp. 1625-1631.

C.S. Carlson, L.D. Cullins, D.J. Meuten. Osteochondrosis of the articular-epiphyseal complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. *Vet Pathol*, 32 (1995), pp. 641-647.

Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy*. 2011 Apr; 13(4):419-30.

Chang X, Yamada R, Yamamoto K. Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:268–73.

G. Chen, T. Sato, T. Ushida, N. Ochiai, T. Tateishi. Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng.*, 10 (3–4) (2004), pp. 323-330.

Chiquet M, Birk DE, Bönemann CG, Koch M Collagen XII: Protecting bone and muscle integrity by organizing collagen fibrils. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Aug; 53():51-4.

Choi G, Schultz MJ, Levi M, van der Poll T. The relationship between inflammation and the coagulation system. *Swiss Med Wkly* 2006;4:139–44.

Clayton HM, Lanovaz JL, Schamhardt HC, Willemen MA, Colborne GR. Net joint moments and powers in the equine forelimb during the stance phase of the trot. *Equine Vet J*. 1998 Sep;30(5):384-9.

Craig LE, Reed A. Age-associated cartilage degeneration of the canine humeral head. *Vet Pathol*. 2013 Mar;50(2):264-8.

Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3233-43.

Cuervo B, Rubio M, Sopena J, Dominguez JM, Vilar J, Morales M, Cugat R, Carrillo JM. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci.* 2014 Jul 31;15(8):13437-60.

Y.L. Cui, A.D. Qi, W.G. Liu, X.H. Wang, H. Wang, D.M. Ma, K.D. Yao. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro. *Biomaterials*, 24 (21) (2003), pp. 3859-3868.

D'Onofrio A, Cresce GD, Bolgan I, Magagna P, Piccin C, Auriemma S, Fabbri A. Clinical and hemodynamic outcomes after aortic valve replacement with stented and stentless pericardial xenografts: a propensity-matched analysis. *J. Heart Valve Dis.*, 20 (2011), pp. 319-325 discussion 326.

R.L. Dahlin, V.V. Meretoja, M. Ni, F.K. Kasper, A.G. Mikos. Chondrogenic phenotype of articular chondrocytes in monoculture and co-culture with mesenchymal stem cells in flow perfusion. *Tissue Eng. Part A*, 20 (21–22) (2014), pp. 2883-2891.

E.M. Darling, K.A. Athanasiou. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res.*, 23 (2) (2005), pp. 425-432.

Lasarzik de Ascurra J, Ehrle A, Einspanier R, Lischer C. Influence of Incubation Time and Incubation Tube on the Cytokine and Growth Factor Concentrations of Autologous Conditioned Serum in Horses. *J Equine Vet Sci.* 2019 Apr;75:30-34.

de Grauw JC. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Vet Q.* 2011 Jun;31(2):77-86.

Deparle LA, Gupta RC, Canerdy TD, Goad JT, D'Altilio M, Bagchi M, Bagchi D. Efficacy and safety of glycosylated undenatured type-II collagen (UC-II) in therapy of arthritic dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2005 Aug;28(4):385-90.

C. Dierks, K. Komm, V. Lampe, et al. Fine mapping of a quantitative trait locus for osteochondrosis on horse chromosome 2. *Anim Genet*, 41 (Suppl 2) (2010), pp. 87-90.

K.F. Duesterdieck-Zellmer, S.A. Semevolos, M.A. Kinsley, et al. Age-related differential gene and protein expression in postnatal cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes. *Gene Expr Patterns*, 17 (1) (2015), pp. 1-10.

L.A. Durrant, C.W. Archer, M. Benjamin, J.R. Ralphs. Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. *J. Anat.*, 194 (Pt 3) (1999), pp. 343-353.

Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009;30(22):3749. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.050.

S. Elder, A. Pinheiro, C. Young, P. Smith, E. Wright. Evaluation of genipin for stabilization of decellularized porcine cartilage. *J. Orthop. Res.*, 35 (9) (2017), pp. 1949-1957.

Epstein M, Rodan I, Griffenhagen G, Kadrlik J, Petty M, Robertson S, Simpson W. 2015 AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2015;51(2):67–84.

Fermor, H. L., Russell, S. L., Williams, S., Fisher, J., & Ingham, E. (2015). Development and characterisation of a decellularised bovine osteochondral biomaterial for cartilage repair. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 26(5), 186.

Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, Schneider RK, Zubrod CJ, Kawcak CE, Goodrich LR. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet Surg*. 2014 Mar; 43(3):255-65.

Foldager CB, Toh WS, Gomoll AH, Olsen BR, Spector M. Distribution of Basement Membrane Molecules, Laminin and Collagen Type IV, in Normal and Degenerated Cartilage Tissues. *Cartilage*. 2014 Apr;5(2):123-32.

Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, Kawcak CE, McIlwraith CW. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:1196–204.

Fujiki M, Shineha J, Yamanokuchi K, Misumi K, Sakamoto H. Effects of treatment with polysulfated glycosaminoglycan on serum cartilage oligomeric matrix protein and C-reactive protein concentrations, serum matrix metalloproteinase-2 and -9 activities, and lameness in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res*. 2007 Aug;68(8):827-33.

Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Innes JF, Clegg PD. Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: markers of collagen degradation and synthesis. *Vet J* 2010;185:36–42.

Ghanavi P, Kabiri M, Doran MR. The rationale for using microscopic units of a donor matrix in cartilage defect repair. *Cell Tissue Res*. 2012 Mar;347(3):643-8.

Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005 Mar 31;434(7033):644-8.

Gobezie R, Kho A, Krastins B, Sarracino DA, Thornhill TS, Chase M, et al. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R36.

Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J*. 2006 Jan;171(1):51-69. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.07.008. PMID: 16427582.

Greaves NS, Benatar B, Baguneid M, Bayat A Single-stage application of a novel decellularized dermis for treatment-resistant lower limb ulcers: positive outcomes

assessed by SIAscopy, laser perfusion, and 3D imaging, with sequential timed histological analysis. *Wound Repair Regen.* 2013 Nov-Dec; 21(6):813-22.

Gregory KE, Keene DR, Tufa SF, Lunstrum GP, Morris NP. Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. *J Bone Miner Res.* 2001 Nov; 16(11):2005-16.

Guercio A, Di Marco P, Casella S, Cannella V, Russotto L, Purpari G, Di Bella S, Piccione G. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int.* 2012 Feb;36(2):189-94. doi: 10.1042/CBI20110304. PMID: 21936851.

Hagen J, Kojah K, Geiger M. Correlations between the equine metacarpophalangeal joint angulation and toe conformation in statics. *Open Vet J.* 2018;8(1):96-103.

Harper TAM. Conservative Management of Hip Dysplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2017 Jul;47(4):807-821.

Hart BL, Hart LA, Thigpen AP, Willits NH. Neutering of German Shepherd Dogs: associated joint disorders, cancers and urinary incontinence. *Vet Med Sci.* 2016 May 16;2(3):191-199.

B. Hegedus, L. Viharos, M. Gervain, et al. The effect of low-level laser in knee osteoarthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg,* 27 (4) (2009), pp. 577-584.

Hemmavanh C, Koch M, Birk DE, Espana EM. Abnormal corneal endothelial maturation in collagen XII and XIV null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 May 7; 54(5):3297-308.

L. Vander Heyden, J.-P. Lejeune, I. Caudron, et al. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Vet Rec,* 172 (2012), p. 68.

Hultén C, Grönlund U, Hirvonen J, Tulamo RM, Suominen MM, Marhaug G, et al. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Vet J* 2002;34:699–704.

F. Humenik, D. Cizkova, S. Cikos, et al. Canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: genomics, proteomics and functional analyses of paracrine factors. *Mol. Cell Proteom.*, 18 (2019), pp. 1824-1835.

Illien-Jünger S, Sedaghatpour DD, Laudier DM, Hecht AC, Qureshi SA, Iatridis JC. Development of a bovine decellularized extracellular matrix-biomaterial for nucleus pulposus regeneration. *J Orthop Res.* 2016 May;34(5):876-88. doi: 10.1002/jor.23088. Epub 2015 Dec 1. PMID: 26509556; PMCID: PMC4898647.

Innes J. F., Costello M., Barr F. J., Rudolf H., Barr A. R. S. (2004) Radiographic progression of osteoarthritis of the canine stifle joint: a prospective study. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 45, 143– 148.

Jackson BF, Reed SR, Price JS, Verheyen KL. Relationship between serum biomarkers of cartilage and bone metabolism and joint injury in young Thoroughbred racehorses in training. *Am J Vet Res.* 2015 Aug;76(8):679-87.

Javaheri B, Razi H, Piles M, de Souza R, Chang YM, Maric-Mur I, Hopkinson M, Lee PD, Pitsillides AA. Sexually dimorphic tibia shape is linked to natural osteoarthritis in STR/Ort mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018 Jun;26(6):807-817.

Jeng L, Hsu HP, Spector M. Tissue-engineered cartilaginous constructs for the treatment of caprine cartilage defects, including distribution of laminin and type IV collagen. *Tissue Eng Part A.* 2013 Oct; 19(19-20):2267-74.

Jerkovic L, Voegelé AF, Chwatal S, Kronenberg F, Radcliffe CM, Wormald MR, et al. Afamin is a novel human vitamin E-binding glycoprotein characterization and in vitro expression. *J Proteome Res* 2005;4:889–99.

Jin CZ, Park SR, Choi BH, Park K, Min BH. In vivo cartilage tissue engineering using a cell-derived extracellular matrix scaffold. *Artif Organs*. 2007 Mar;31(3):183-92. doi: 10.1111/j.1525-1594.2007.00363.x. PMID: 17343693.

R. Jin, L.S. Moreira Teixeira, P.J. Dijkstra, M. Karperien, C.A. van Blitterswijk, Z.Y. Zhong, J. Feijen. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30 (13) (2009), pp. 2544-2551.

John T, Stahel PF, Morgan SJ, Schulze-Tanzil G. Impact of the complement cascade on posttraumatic cartilage inflammation and degradation. *Histol Histopathol* 2007;22: 781–90.

S.A. Johnston, R.M. McLaughlin, S.C. Budsbers. Nonsurgical management of osteoarthritis in dogs. *Vet Clin Small Anim*, 38 (2008), pp. 1449-1470.

Jones HW, Bailey R, Zhang Z, Dunne KA, Blake DR, Cox NL, et al. Inactivation of antithrombin III in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1998;57:162–5.

Juanssilfero AB, Akmal F, Mutalib A, Zulaikha W, Zulkifli W, Jahim J (2011) Characterization of copolymer Dehypon® LS 54 and its application for aqueous two-phase systems paired with the waxy maize starch for protein extraction. *IJASEIT*: DOI: 10.18517/ijaseit.1.1.16.

Kamm JL, Nixon AJ, Witte TH. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. *Equine Vet J* 2010;42:693–9.

C.E. Kawcak, D.D. Frisbie, C.W. McIlwraith, et al. Evaluation of avocado and soybean unsaponifiable extracts for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis *Am J Vet Res*, 68 (6) (2007), pp. 598-604.

Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012 Feb;33(6):1771-81. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.054. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22137126.

Khan SA, McLean MK. Toxicology of frequently encountered nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012 Mar;42(2):289-306, vi-vii.

Kheir E, Stapleton T, Shaw D, Jin Z, Fisher J, Ingham E. Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2011;99(2):283–294. doi: 10.1002/jbm.a.33171.

King MD. Etiopathogenesis of Canine Hip Dysplasia, Prevalence, and Genetics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2017 Jul;47(4):753-767.

M. Kinsley, S.A. Semevolos, K.F. Duesterdieck-Zellmer. Molecular characterization of Wnt/ β -catenin signaling of cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes in early equine osteochondrosis. *J Orthop Res*, 33 (2015), pp. 1433-1438.

B. Kukanich, T. Bidgood, O. Knesl. Clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs. *Vet Anaesth Analg*, 39 (1) (2012), pp. 69-90.

B. Kukanich, M.G. Papich. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 27 (2004), pp. 239-246.

Kuroki K, Cook JL, Stoker AM, Turnquist SE, Kreeger JM, Tomlinson JL. Characterizing osteochondrosis in the dog: potential roles for matrix metalloproteinases and mechanical load in pathogenesis and disease progression. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:225–34.

Kvist AJ, Nyström A, Hultenby K, Sasaki T, Talts JF, Aspberg. A The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent? *Matrix Biol*. 2008 Jan; 27(1):22-33.

R.C. Lai, R.W. Yeo, S.K. Lim. Mesenchymal stem cell exosomes *Semin Cell Dev. Biol.*, 40 (2015), pp. 82-88.

R.C. Lai, R.W. Yeo, K.H. Tan, S.K. Lim. Exosomes for drug delivery — a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol. Adv.*, 31 (2013), pp. 543-551.

E. Langelier, R. Suetterlin, C.D. Hoemann, U. Aebi, M.D. Buschmann. The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J. Histochem. Cytochem.*, 48 (10) (2000), pp. 1307-1320.

B.D. Lascelles, J.S. Gaynor, E.S. Smith, et al. Amantadine in a multimodal analgesic regimen for alleviation of refractory osteoarthritis pain in dogs. *J Vet Intern Med*, 22 (1) (2008), pp. 53-59.

Lauer ME, Fulop C, Mukhopadhyay D, Comhair S, Erzurum SC, Hascall VC. Airway Smooth Muscle Cells Synthesize Hyaluronan Cable Structures Independent of Inter- α -inhibitor Heavy Chain Attachment. *J Biol Chem* 2009;284:5313–23.

M. Lecocq, C.A. Girard, U. Fogarty, et al. Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine Vet J*, 40 (2008), pp. 442-454.

C. Lee, S.A. Mitsialis, M. Aslam, S.H. Vitali, E. Vergadi, G. Konstantinou, K. Sdrimas, A. Fernandez-Gonzalez, S. Kourembanas. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 126 (22) (2012), pp. 2601-2611.

Lemetayer J, Taylor S. Inflammatory joint disease in cats: diagnostic approach and treatment. *J Feline Med Surg*. 2014 Jul;16(7):547-62.

Ley C, Ekman S, Elmén A, Nilsson G, Eloranta ML. Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007;54:346–51.

W.-J. Li, Y.J. Jiang, R.S. Tuan. Chondrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fiber size. *Tissue Eng.*, 12 (7) (2006), pp. 1775-1785.

Li Y, Wu F, Wei J, Lao L, Shen X. The Effects of Laser Moxibustion on Knee Osteoarthritis Pain in Rats. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2020 Jan;38(1):43-50.

X. Liang, Y. Ding, Y. Zhang, H.F. Tse, Q. Lian. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant.*, 23 (2014), pp. 1045-1059.

J. Liao, Y. Qu, B. Chu, X. Zhang, Z. Qian. Biodegradable CSMA/PECA/graphene porous hybrid scaffold for cartilage tissue engineering. *Sci. Rep.*, 5 (2015), p. 9879.

Lin EA, Liu CJ. The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein Cell.* 2010 Jan;1(1):33-47.

Lovekamp JJ, Simionescu DT, Mercuri JJ, Zubiato B, Sacks MS, Vyavahare NR (2006) Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves. *Biomaterials* 27: 1507-1518.

Ludwig EK, van Harreveld PD. Equine Wounds over Synovial Structures. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2018 Dec;34(3):575-590.

Mariñas-Pardo L, García-Castro J, Rodríguez-Hurtado I, Rodríguez-García MI, Núñez-Naveira L, Hermida-Prieto M. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (Horse Allo 20) for the Treatment of Osteoarthritis-Associated Lameness in Horses: Characterization, Safety, and Efficacy of Intra-Articular Treatment. *Stem Cells Dev.* 2018 Sep 1; 27(17):1147-1160.

Martini F.M. Patologie articolari nel cane e nel gatto. *Veterinaria Italiana* 44.1 (2006): 286.

Masuko K, Murata M, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, et al. A metabolic aspect of osteoarthritis: lipid as a possible contributor to the pathogenesis of cartilage degradation. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:347–753.

Mateos J, Lourido L, Fernández-Puente P, Calamia V, Fernández-López C, Oreiro N, et al. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteomics* 2012;8.

K.A. Mathews. Neuropathic pain in dogs and cats: if only they could tell us if they hurt *Vet Clin Small Anim*, 38 (2008), pp. 1365-1414.

A.M. McCoy, S.K. Beeson, R.K. Splan, et al. Identification and validation of risk loci for osteochondrosis in Standardbreds. *BMC Genomics*, 17 (2016), p. 41.

A.M. McCoy, F. Toth, N.I. Dolvik, et al. Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-occurring human and animal disease. *Osteoarthritis Cartilage*, 21 (11) (2013), pp. 1638-1647.

McIlwraith CW. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J*. 2005; 37:473–82.

Meeson RL, Todhunter RJ, Blunn G, Nuki G, Pitsillides AA. Spontaneous dog osteoarthritis - a One Medicine vision. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 May;15(5):273-287.

A. Mellati, C.M. Fan, A. Tamayol, N. Annabi, S. Dai, J. Bi, B. Jin, C. Xian, A. Khademhosseini, H. Zhang, Microengineered 3D cell-laden thermoresponsive hydrogels for mimicking cell morphology and orientation in cartilage tissue engineering, *Biotechnol. Bioeng.* 114 (1) (2017) 217–231.

Meyer T, Schwarz K, Ulrichs K, Höcht B. A new biocompatible material (Lyoplant) for the therapy of congenital abdominal wall defects: first experimental results in rats. *Pediatr Surg Int*. 2006 Apr;22(4):369-74.

Millis, D., & Levine, D. (2013). *Canine rehabilitation and physical therapy*. Elsevier Health Sciences.

E.H. Mittmann, V. Lampe, S. Momke, et al. Characterization of a minimal microsatellite set for whole genome scans informative in warmblood and coldblood horse breeds. *J Hered*, 10 (2010), pp. 246-250.

Mortellaro, C. Pathophysiology of Osteoarthritis. *Vet Res Commun* 27, 75–78 (2003).

F.T. Moutos, B.T. Estes, F. Guilak. Multifunctional hybrid three-dimensionally woven scaffolds for cartilage tissue engineering. *Macromol. Biosci.*, 10 (11) (2010), pp. 1355-1364.

Murray RC, Zhu CF, Goodship AE, Lakhani KH, Agrawal CM, Athanasiou KA. Exercise affects the mechanical properties and histological appearance of equine articular cartilage. *J Orthop Res*. 1999 Sep;17(5):725-31.

Murrell JC, Psatha EP, Scott EM, Reid J, Hellebrekers LJ. Application of a modified form of the Glasgow pain scale in a veterinary teaching centre in the Netherlands. *Vet Rec*. 2008 Mar 29;162(13):403-8.

Nakagawa Y, Fortier LA, Mao JJ, Lee CH, Goodale MB, Koff MF, Uppstrom TJ, Croen B, Wada S, Carballo CB, Potter HG, Rodeo SA. Long-term Evaluation of Meniscal Tissue Formation in 3-dimensional-Printed Scaffolds With Sequential Release of Connective Tissue Growth Factor and TGF-beta3 in an Ovine Model. *Am J Sports Med*. 2019 Sep;47(11):2596-2607.

C.M. Nelson, M.J. Bissell. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22 (2006), pp. 287-309.

Oliviero F, Sfriso P, Baldo G, Dayer JM, Giunco S, Scanu A, et al. Apolipoprotein A-I and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:79–83.

K. Olstad, S. Ekman, C.S. Carlson. An update on the pathogenesis of osteochondrosis. *Vet Pathol*, 52 (2015), pp. 785-802.

K. Olstad, E.H.S. Hendrickson, C.S. Carlson, et al. Transection of vessels in epiphyseal cartilage canals leads to osteochondrosis and osteochondritis dissecans in the femoro-patellar joint of foals; a potential model of juvenile osteochondritis dissecans. *Osteoarthritis Cartilage*, 21 (2013), pp. 730-738.

K. Olstad, B. Ytrehus, S. Ekman, et al. Epiphyseal cartilage canal blood supply to the distal femur of foals. *Equine Vet J*, 40 (2008), pp. 433-439.

Oshin AO, Stewart MC. The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2007;20(3):151-8. doi: 10.1160/vcot-07-02-0018. PMID: 17846679.

Park SM, Yang S, Rye SM, Choi SW. Effect of pulsatile flow perfusion on decellularization. *Biomed Eng Online*. 2018 Feb 1;17(1):15.

Pascual-Garrido C, Guilak F, Rai MF, Harris MD, Lopez MJ, Todhunter RJ, Clohisy JC. Canine hip dysplasia: A natural animal model for human developmental dysplasia of the hip. *J Orthop Res*. 2018 Jul;36(7):1807-1817.

Pettitt RA, German AJ. Investigation and management of canine osteoarthritis. In *Pract*. 2015; 37(S1): 1– 8.

Pezzanite LM, Fortier LA, Antczak DF, Cassano JM, Brosnahan MM, Miller D, Schnabel LV. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Apr 12; 6():54.

Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*. 2010 Feb 2; 5(2):e9016.

B.H. Pypendop, J.E. Ilkiw. Pharmacokinetics of tramadol, and its metabolite O-desmethyl-tramadol in cats. *J Vet Pharmacol Ther*, 31 (2007), pp. 52-59.

Reed SR, Jackson BF, Mc Ilwraith CW, Wright IM, Pilsworth R, Knapp S, Wood JL, Price JS, Verheyen KL. Descriptive epidemiology of joint injuries in Thoroughbred racehorses in training. *Equine Vet J*. 2012 Jan;44(1):13-9.

C.M. Revell, K.A. Athanasiou. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Eng. Part B: Rev.*, 15 (2009), pp. 1-15.

Ricchetti ET, Aurora A, Iannotti JP, Derwin KA. Scaffold devices for rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012 Feb;21(2):251-65.

Richette P, Bardin T. Structure-modifying agents for osteoarthritis: an update. *Joint Bone Spine*. 2004 Jan;71(1):18-23.

T.L. Riddick, K. Dueterdieck-Zellmer, S.A. Semevolos. Gene and protein expression of cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes and full-thickness cartilage in early equine osteochondrosis. *Vet J*, 194 (2012), pp. 319-325.

Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Feb;127(2):399-405. doi: 10.1016/j.jtcvs.2003.06.017. Erratum in: *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015 May;149(5):1469. PMID: 14762347.

S.A. Robertson. Managing pain in feline patients. *Vet Clin North Am Small Anim*, 38 (2008), pp. 1267-1290.

C.R. Rowland, D.P. Lennon, A.I. Caplan, F. Guilak. The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs. *Biomaterials*, 34 (23) (2013), pp. 5802-5812.

Ruehl M, Erben U, Schuppan D, Wagner C, Zeller A, Freise C, Al-Hasani H, Loesekann M, Notter M, Wittig BM, Zeitz M, Dieterich W, Somasundaram R. The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. *J Biol Chem*. 2005 Nov 18; 280(46):38537-43.

Rychel JK. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Top Companion Anim Med*. 2010 Feb;25(1):20-5. doi: 10.1053/j.tcam.2009.10.005. PMID: 20188335.

Sánchez-Enríquez S, Torres-Carrillo NM, Vázquez-Del Mercado M, Salgado-Goytia LR, Rangel-Villalobos H, Muñoz-Valle JF. Increase levels of apo-A1 and apo B are associated in knee osteoarthritis: lack of association with VEGF-460 T/C and +405 C/G polymorphisms. *Rheumatol Int* 2008;29:63–8.

Sanderson R. O., Beata C., Flipo R. M., Genevois J. P., Macias C., Tacke S., Vezzoni A., Innes J. F. (2009) Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Veterinary Record* 164, 418– 424.

Sasaki A, Mizuno M, Mochizuki M, Sekiya I. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs. *World J Stem Cells*. 2019 May 26;11(5):254-269.

Schneider C, Lehmann J, van Osch GJVM, Hildner F, Teuschl A, Monforte X, Miosga D, Heimel P, Priglinger E, Redl H, Wolbank S, Nürnberger S (2016) Systematic comparison of protocols for the preparation of human articular cartilage for use as scaffold material in cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 22: 1095-1107.

Schulz R.M., Bader A., “ Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the

cultivation and stimulation of chondrocytes”, *Eur Biophys J* (2007), 36:539-568.

Schwarz S, Koerber L, Elsaesser AF, Goldberg-Bockhorn E, Seitz AM, Dürselen L, Ignatius A, Walther P, Breiter R, Rotter N. Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:2195–2209. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0705.

Vaughan-Scott T, Taylor JH. The pathophysiology and medical management of canine osteoarthritis. *J S Afr Vet Assoc*. 1997 Mar;68(1):21-5.

R. Screven, E. Kenyon, M.J. Myers, et al. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 161 (2014), pp. 21-31.

Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1666(1):105–17.

Semevolos SA. Osteochondritis Dissecans Development. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2017 Aug;33(2):367-378.

Seo JP, Tanabe T, Tsuzuki N, Haneda S, Yamada K, Furuoka H, Tabata Y, Sasaki N. Effects of bilayer gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in horses. *Res Vet Sci*. 2013 Dec;95(3):1210-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.08.016. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24054973.

B. Sharma, C.G. Williams, T.K. Kim, D.N. Sun, A. Malik, M. Khan, K. Leong, J.H. Elisseeff, Designing zonal organization into tissue-engineered cartilage, *Tissue Eng*. 13 (2) (2007) 405–414.

W.D. Shingleton, E.J. Mackie, T.E. Cawston, et al. Cartilage canals in equine articular/epiphyseal growth cartilage and a possible association with dyschondroplasia. *Equine Vet J*, 29 (1997), pp. 360-364.

Sofat N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. Review. *Int J Exp Pathol* 2009;90:463–79.

Sprackman L, Dakin SG, May SA, Weller R. Relationship between the shape of the central and third tarsal bones and the presence of tarsal osteoarthritis. *Vet J.* 2015 Apr;204(1):94-8.

Stapleton TW, Ingram J, Katta J, Knight R, Korossis S, Fisher J, Ingham E. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(4):505–18.

A.J. Sutherland, E.C. Beck, S.C. Dennis, G.L. Converse, R.A. Hopkins, C.J. Berkland, M.S. Detamore. Decellularized cartilage may be a chondroinductive material for osteochondral tissue engineering. *PLoS One*, 10 (5) (2015), p. e0121966.

Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J* 2009;179:10–24.

Szewczyk M, Lechowski R, Zabielska K. What do we know about canine osteosarcoma treatment? Review. *Vet Res Commun.* 2015 Mar;39(1):61-7.

H. Takemitsu, D. Zhao, I. Yamamoto, Y. Harada, M. Michishita, T. Arai. Comparison of bone marrow and adipose tissue derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet. Res.*, 8 (2012), p. 150.

Taylor DW, Ahmed N, Parreno J, Lunstrum GP, Gross AE, Diamandis EP, Kandel RA. Collagen type XII and versican are present in the early stages of cartilage tissue formation by both redifferentating passaged and primary chondrocytes. *Tissue Eng Part A.* 2015 Feb; 21(3-4):683-93.

Thibault M, Poole AR, Buschmann MD. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res.* 2002 Nov;20(6):1265-73.

Thompson CC, Clegg PD, Carter SD. Differential regulation of gelatinases by transforming growth factor beta-1 in normal equine chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001 May;9(4):325-31.

Tan Timur U, Caron M, van den Akker G, van der Windt A, Visser J, van Rhijn L, Weinans H, Welting T, Emans P, Jahr H. Increased TGF-beta and BMP Levels and Improved Chondrocyte-Specific Marker Expression In Vitro under Cartilage-Specific Physiological Osmolarity. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 13;20(4):795.

Todesco S., Gambari P.F., "Malattie reumatiche", McGraw-Hill, Milano 2002

Totley S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, Zhang L, Jiang H, Medberry CJ, Reines B, Badylak SF. The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials.* 2011 Jan;32(1):128-36.

Trumble TN, Trotter GW, Oxford JR, McIlwraith CW, Cammarata S, Goodnight JL, et al. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am J Vet Res* 2001;62:1467–77.

Turner NJ, Badylak JS, Weber DJ, Badylak SF. Biologic scaffold remodeling in a dog model of complex musculoskeletal injury. *J Surg Res.* 2012 Aug;176(2):490-502.

Turner NJ, Yates AJ Jr, Weber DJ, Qureshi IR, Stolz DB, Gilbert TW, Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as an inductive scaffold for regeneration of a functioning musculotendinous junction. *Tissue Eng Part A.* 2010 Nov;16(11):3309-17. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0169. Epub 2010 Aug 1. PMID: 20528669.

Ursini TL, Amelse LL, Elkhenany HA, Odoi A, Carter-Arnold JL, Adair HS, Dhar MS- Retrospective analysis of local injection site adverse reactions associated with 230 allogenic administrations of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in 164 horses. *Equine Vet J.* 2019 Mar; 51(2):198-205.

Vieth R, Vitamin D. Toxicity, policy, and science. *J Bone Miner Res* 2007; 22:S264–8.

Vilar JM, Morales M, Santana A, Spinella G, Rubio M, Cuervo B, Cugat R, Carrillo JM. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res.* 2013 Jul 2;9:131.

A.J. Villatoro, C. Alcoholado, M.C. Martín-Astorga, V. Fernández, M. Cifuentes, J. Becerra. Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 208 (2019), pp. 6-15.

Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, Cordero K, Bedelbaeva K, Gourevitch D, Heber-Katz E, Badylak SF, Braunhut SJ. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol.* 2010 Oct;29(8):690-700.

Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, et al. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritis cartilage- mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6 and IL-8 production. *Mediators Inflamm* (Epub 13 Aug 2009).

Wang G, Zhang Y, Zhao X, Meng C, Ma L, Kong Y. MicroRNA-411 inhibited matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes. *Am J Transl Res.* 2015; 7(10):2000-6.

Wang Y, Gludish DW, Hayashi K, Todhunter RJ, Krotscheck U, Johnson PJ, Cummings BP, Su J, Reesink HL. Synovial fluid lubricin increases in spontaneous canine cruciate ligament rupture. *Sci Rep.* 2020 Oct 7;10(1):16725.

T. Woodfield, C.V. Blitterswijk, J.D. Wijn, T. Sims, A. Hollander, J. Riesle. Polymer scaffolds fabricated with pore-size gradients as a model for studying the zonal organization within tissue-engineered cartilage constructs. *Tissue Eng.*, 11 (9–10) (2005), pp. 1297-1311.

L. Wu, H.J. Prins, M.N. Helder, C.A. van Blitterswijk, M. Karperien. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng. Part A*, 18 (15–16) (2012), pp. 1542-1551.

Wu SM, Pizzo SV. α 2-Macroglobulin from Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid: Functional Analysis Defines a Role for Oxidation in Inflammation. *Arch Biochem Biophys* 2001;391:119–26.

L. Xu, Q. Wang, F. Xu, Z. Ye, Y. Zhou, W.S. Tan. Mesenchymal stem cells downregulate articular chondrocyte differentiation in noncontact coculture systems: implications in cartilage tissue regeneration. *Stem Cells Dev.*, 22 (11) (2013), pp. 1657-1669.

Yamanokuchi K, Tagami M, Nishimatsu E, Shimizu Y, Hirose Y, Komatsu K, et al. Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. *Equine Vet J* 2009;4:41–6.

Yu Y, Wang S, Zhou Z. Cartilage Homeostasis Affects Femoral Head Necrosis Induced by Methylprednisolone in Broilers. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 8;21(14):4841.

Zachary, J. F., & McGavin, D. (2015). *Patologia veterinaria sistematica*. Elsevier srl.

Zhang L., Hu J., Athanasiou K.A., “The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration”, *Crit Rev Biomed Eng.* (2009), 37(1-2):1-57.

Y. Zhu, Y. Wang, B. Zhao, X. Niu, B. Hu, Q. Li, J. Zhang, J. Ding, Y. Chen, Y. Wang. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther*, 8 (2017), p. 64.