

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze dello sviluppo e del movimento umano. Progetto  
n°1: discipline delle attività motorie e sportive**

**Ciclo XXV°**

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/F4 - MALATTIE APPARATO LOCOMOTORE E  
MEDICINA FISICA E RIABILITATIVA**

**Settore Scientifico disciplinare: MED/33 - MALATTIE APPARATO LOCOMOTORE**

**TITOLO TESI  
VALUTAZIONE SPERIMENTALE DELLA RIGENERAZIONE DELLA  
CARTILAGINE ARTICOLARE DOPO STIMOLAZIONE BIOFISICA CON  
CAMPI ELETTROMAGNETICI PULSATI IN ASSOCIAZIONE A  
TRATTAMENTI CHIRURGICI**

**Presentata dal Dottor Matteo Cadossi**

**Coordinatore Dottorato**

**Professor Salvatore Squatrito**

**Relatore**

**Professor Maurilio Marcacci**

**Esame finale anno 2013**

# INDICE

<b>Introduzione</b>	<b>3</b>
Fase di ingegneria tissutale – sviluppo e manipolazione del costrutto in coltura	8
Intervento chirurgico e fase di valutazione – impianto del costrutto per la riparazione del difetto cartilagineo e valutazione clinica	14
CEMP come strategia per la difesa del costrutto	18
Fase di ingegneria tissutale in vitro: effetto anabolico dei CEMP sulla cartilagine e sui condrociti	19
Fase chirurgica: effetto della stimolazione con CEMP sul microambiente infiammatorio	23
Effetto anti-infiammatorio dei CEMP mediante l'up-regolazione dei recettori adenosinici A <sub>2A</sub>	24
Studi Clinici	28
<b>Materiali e metodi</b>	<b>32</b>
Analisi microtomografica	37
Analisi istologica	38
Analisi statistica	40
<b>Risultati</b>	<b>41</b>
Risultati microtomografici	42
Risultati istologici	42
<b>Discussione</b>	<b>45</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>55</b>
<b>Iconografia</b>	<b>75</b>

# INTRODUZIONE

Le lesioni della cartilagine ialina rappresentano la prima causa di disabilità mondiale. Ogni anno negli Stati Uniti d'America oltre 250.000 pazienti necessitano di un'artroscopia di ginocchio, a causa di lesioni della cartilagine articolare.<sup>1</sup> Oltre il 60% dei pazienti sottoposti ad artroscopia di ginocchio presenta lesioni della cartilagine articolare definite secondo i criteri di valutazione dell'International Cartilage Repair Society.<sup>2</sup>

La storia naturale delle lesioni cartilaginee non trattate conduce all'osteoartrosi (OA). Negli USA tra il 6% e il 12% della popolazione lamenta dolore alle ginocchia,<sup>3</sup> oltre 300.000 protesi di ginocchio sono eseguite ogni anno e si stima un incremento fino a 3.48 milioni nel 2030.<sup>4</sup>

Considerando che la cartilagine articolare possiede proprietà riparative assai limitate, le procedure chirurgiche che mirano a promuovere la rigenerazione del tessuto cartilagineo continueranno ad aumentare nel corso degli anni. Per trattare efficacemente le lesioni cartilaginee è necessario ottenere un tessuto con le stesse caratteristiche meccaniche e funzionali della cartilagine ialina e promuovere l'integrazione del tessuto rigenerato con la cartilagine ospite e l'osso subcondrale.<sup>5</sup>

Per raggiungere questi obiettivi diverse tecniche chirurgiche sono state proposte come ad esempio la condroabrasione o le microfratture che hanno lo scopo di reclutare le cellule midollari stromali dall'osso subcondrale. Altre tecniche mirano a riempire il difetto cartilagineo mediante condrociti autologhi

coltivati *ex-vivo*, cellule mesenchimali staminali (MSC) di derivazione osteomidollare o trapianti osteocartilaginei.<sup>6</sup>

Fino ad ora tuttavia, la ricerca clinica non ha ancora individuato un approccio terapeutico che sia effettivamente in grado di riprodurre la composizione biologica e le proprietà meccaniche della cartilagine ialina articolare originale. Anche se attualmente nessun trattamento può essere ritenuto definitivo per la riparazione cartilaginea, numerosi studi sono stati condotti per ottimizzare i trattamenti esistenti. In particolare quelli basati sulle tecniche di ingegneria tissutale mirano ad accelerare la rigenerazione cartilaginea e/o osteocartilaginea, per permettere ai pazienti di ritornare a svolgere una vita normale e prevenire o almeno ritardare l'insorgenza dell'OA.

Le tecniche di ingegneria tissutale hanno lo scopo di superare le attuali limitazioni dei trattamenti chirurgici tradizionali cercando di rigenerare un tessuto funzionalmente efficace nell'area del difetto cartilagineo. Esse richiedono una fase iniziale di coltura *in vitro* dei condrociti o di MSC in presenza di una matrice extracellulare (ECM) naturale o sintetica (scaffold) da impiantare successivamente nell'area della lesione.

Una procedura *one-step*, che prevede il trapianto di un pool di cellule mononucleate di origine midollare è stata recentemente proposta al fine di evitare una doppia procedura chirurgica e limitare i costi relativi all'espansione cellulare *in vitro*.<sup>7</sup> Per superare queste problematiche e in linea

con le recenti acquisizioni nel campo della medicina rigenerativa si è rivolta l'attenzione verso un tipo di cellule che potesse replicare e differenziare spontaneamente verso una linea sia di tipo cartilagineo che osseo, senza quindi richiedere una fase laboratoristica. Le MSC rispondono a queste caratteristiche, e sono facilmente prelevabili dalla cresta iliaca del paziente. Le MSC possono essere impiantate previa espansione ed isolamento in laboratorio o dopo un breve procedimento di eliminazione dei globuli rossi; questa seconda opzione consente di impiantare, oltre alle MSC, l'insieme delle cellule mononucleate e di tutti quei fattori presenti nel midollo osseo che costituiscono un microambiente ad altissimo potenziale rigenerativo. In questo caso si parla di trapianto di cellule mononucleate midollari (TCMM) e si rende possibile una procedura che in un solo intervento coniughi la fase di prelievo e la fase di impianto.

Un altro semplice approccio è quello di impiantare uno scaffold bioattivo capace di reclutare e stimolare le cellule proprie del paziente mirando ad ottenere una rigenerazione tessutale in funzione di una combinazione di stimoli chimici, strutturali e topografici.<sup>8</sup>

Nonostante i recenti progressi la rigenerazione cartilaginea rimane complessa; infatti, dopo l'impianto del costrutto la degenerazione del tessuto neoformato e della cartilagine circostante è assai frequente.<sup>9,10</sup> La rigenerazione cartilaginea spesso esita in un tessuto fibrocartilagineo privo

dell'organizzazione istologica a strati che caratterizza la cartilagine ialina.<sup>10</sup> Quando si riesce nell'intento di riprodurre una cartilagine ialina, essa è tipicamente immatura e non costituisce una reale superficie articolare. Da un punto di vista funzionale, il tessuto riparativo non è meccanicamente competente e pertanto risulta incapace di assorbire gli stress meccanici applicati alla cartilagine articolare. Inoltre, l'integrazione laterale tra la cartilagine ospite e il tessuto rigenerato è spesso mancante, pertanto una degenerazione futura è pressoché inevitabile.<sup>10</sup>

Le lesioni cartilaginee che si verificano su un processo degenerativo cronico presentano ulteriori problemi tuttora irrisolti. L'intera superficie articolare è spesso coinvolta: sia i condrociti che i sinoviociti secernono citochine pro-infiammatorie ed enzimi proteolitici che hanno effetti importanti sul costrutto bio-ingegnerizzato e/o sulle cellule impiantate. L'ambiente articolare è infiammato e a seguito di un intervento chirurgico la concentrazione delle citochine pro-infiammatorie nel liquido sinoviale è ulteriormente aumentata.

Pertanto, esiste la necessità di migliorare le tecnologie attualmente disponibili al fine di produrre sostituti tessutali più efficaci che permettano risultati clinici migliori e più duraturi nel tempo. Questi obiettivi sono stati chiaramente definiti da Butler che ha proposto il paradigma dell'ingegneria tissutale funzionale (Functional Tissue Engineering) i cui principi sono stati espressi mediante una FTE road map.<sup>11,12</sup> Essa rappresenta uno strumento utile per

ideare e fabbricare costrutti bio-ingegnerizzati, ed è stata concepita come una strategia in due fasi: (1) fase di ingegneria tessutale *in vitro*; (2) fase clinica: intervento chirurgico e valutazione.<sup>13</sup>

Da un'attenta revisione della letteratura sulla stimolazione biofisica e sulle strategie di ingegneria tessutale per la rigenerazione cartilaginea, abbiamo ipotizzato un duplice ruolo della stimolazione con Campi Elettromagnetici Pulsati (CEMP): *in vitro*, essi stimolano la proliferazione cellulare, la colonizzazione dello scaffold e la sintesi di ECM; *in vivo*, una volta impiantato il costrutto, favoriscono le attività anaboliche delle cellule impiantate e del tessuto circostante e proteggono lo stesso dagli effetti catabolici dell'infiammazione.

### **Fase di ingegneria tessutale – sviluppo e manipolazione del costrutto in coltura**

Metodi biologici sono stati ottimizzati per la sintesi *in vitro* di un tessuto bio-ingegnerizzato partendo dai condrociti o dalle MSC del paziente.<sup>14</sup> La preparazione del tessuto *in vitro* deriva dalla combinazione di biomateriali e cellule, la cui attività può essere influenzata dall'aggiunta di molecole segnale, come ad esempio fattori di crescita o modulata da stimoli fisici. Diversi tipi di biomateriali sono stati proposti come scaffold (tabella 1). Essi dovrebbero essere in grado di favorire la proliferazione cellulare, la

colonizzazione e la sintesi di ECM da parte delle cellule coltivate. Dovrebbero inoltre servire da carrier per i condrociti una volta impiantati nel sito di lesione.<sup>15</sup>

Tabella 1. Materiali utilizzati in ingegneria tissutale: sintetici, naturali e compositi.

Sintetici	Naturali	Compositi
acido poli-L-glicolico (PLGA) acido poli-L-lattico (PLLA) acido poli-D,L-lattico (PDLLA) acido poli-D,L-lattico-co-glicolico (PDLLCG) poli(propilene fumarato) (PPF) poli(etilene glicol) (PEG) poli(N-isopropilacriamide) (PNIPAAm) poli( $\alpha$ -idrossi-estere) poli(etilene glicol diacrilato) (PEGDA) poli(uretano) (PU) poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL) poli(etilene glicol)-tereftalato-poli(butilene tereftalato) (PEGT/PBT) poli(1,8-octanediol citrato) (POC)	agarosio alginato cellulosa chitosano condroitin solfato collagene colla di fibrina (Tissucol®) gelatina acido ialuronico (HYAFF11®) seta	PLGA (tessuto a maglia) + microspugna in collagene PLLA/amalgama alginato Col I microspugna in rete di PDLLCG PFF e HA/idrogel di collagene I Fotocrosslinkable PEG idrogel Graft-chitosano-NIPAAm PEGDA idrogel coniugati con peptidi collagene mimetici divinil, tetra funzionale PEG + multivinil, multifunzionale PVA gel di omo e copolimeri idrogel di fibrina + sistemi a base di PU scaffold cellulosa attivata da Ca(OH) <sub>2</sub> e rivestiti in CaP idropropil metilcellulosa silanizzata (Si-HPMC) TGF- $\beta$ 1 in microsfele di PLGA incorporate in crosslinked genipin-PEG idrogel TGF- $\beta$ 1 e insulin like growth factor-1 (IGF-1) microincapsulati in gelatine in combinazione con scaffold OPF b-FGF incorporato all'interno di scaffold di copolimeri in poli-lattico/caprolattone BMP-2 incapsulata in PLA scaffold

Per ottenere *in vitro* un costrutto bio-ingegnerizzato, le condizioni di coltura (terreno, fattori di crescita, tensione di ossigeno, coltura bi o tridimensionale) e le caratteristiche chimiche e morfologiche dello scaffold hanno profonde implicazioni sulla vitalità, la proliferazione, la differenziazione/de-differenziazione cellulare e la sintesi della ECM.<sup>15,16</sup> L'aggiunta alla coltura di citochine viene utilizzata per favorire la proliferazione cellulare e indirizzarne la differenziazione, allo stesso modo anche stimoli fisici di tipo elettrico (campi magnetici) o meccanico (pressione, taglio, ultrasuoni pulsati) si sono

dimostrati efficaci nel promuovere la proliferazione cellulare e incrementare le attività anaboliche dei condrociti e la sintesi della ECM.

Pelttari ha descritto come condrociti prelevati da articolazioni, se coltivati in colture bidimensionali, vadano incontro a de-differenziazione con perdita della capacità di sintesi di collagene di tipo II o aggregano.<sup>17</sup> I tentativi effettuati per limitare il fenomeno della de-differenziazione durante l'espansione cellulare di colture in monostrato mediante la semina delle cellule su piastre rivestite di proteine che mimano l'ECM come ad esempio gel di agarosio (fibronectina, collagene di tipo I o II) o in ambienti che supportino una morfologia cellulare 3D come gel, scaffolds e micro-carriers porosi non sono ancora riusciti a mantenere in modo convincente il fenotipo condrocitario nativo associato ad un'estesa espansione cellulare.<sup>18</sup> Dall'altro lato, condrociti espansi in presenza di specifici fattori di crescita, che limitino il processo di de-differenziazione, mostrano una miglior capacità di sintetizzare ECM e rispondono in modo più efficace a stimoli condrogenici durante successive colture tridimensionali su scaffold.<sup>18</sup>

Similmente ai condrociti dell'OA, i condrociti coltivati *ex vivo* esprimono una varietà di citochine pro-infiammatorie, recettori per citochine ed enzimi proteolitici la cui produzione è incrementata dall'aumentare dei passaggi culturali e dalla stimolazione con IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ .<sup>19</sup>

Per ciò che riguarda il metodo di semina cellulare, in condizioni statiche è generalmente difficile distribuire le cellule all'interno dello scaffold in modo efficace ed omogeneo e successivamente sostenerle con adeguate quantità di nutrienti per supportarne la crescita, la funzione e la vitalità attraverso l'intero spessore del costrutto. Per superare le limitazioni dei sistemi di coltura statici sono stati sviluppati dei sistemi che si basano sulla perfusione diretta continua e monitorata di una sospensione cellulare e del mezzo di coltura attraverso i pori dello scaffold. I sistemi di perfusione diretta mostrano un'elevata efficacia nella semina cellulare in modo uniforme all'interno dello scaffold, mantenendo un'ottima vitalità cellulare per lunghi periodi di tempo. Gli stress di taglio indotti dal flusso nei sistemi di perfusione sono stati inoltre utilizzati per incrementare la proliferazione e la differenziazione delle cellule.<sup>20</sup>

Lisignoli ha descritto l'effetto del TGF- $\beta$ , associato a scaffold di acido ialuronico sulla differenziazione in senso condrocitario *in vitro* di MSC.<sup>21</sup> Un modello simile sempre *in vitro*, (MSC/acido ialuronico/TGF- $\beta$ ) è stato utilizzato per studiare l'influenza di questo fattore di crescita sulla secrezione di citochine che contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi cartilaginea: IL-8, interferon- $\gamma$ -inducibile proteina-10, stroma derived factor-1, B-cell attracting chemokine-1 e i loro recettori. Durante la differenziazione *in vitro* di MSC umane in senso condrocitario, la sintesi di chemochine o l'espressione dei loro recettori viene finemente regolata esattamente come accade fisiologicamente nella cartilagine articolare normale. Questo fenomeno

suggerisce un ruolo di questi fattori nel processo di differenziazione e maturazione dei costrutti simil-cartilaginei *in vitro* e nella regolazione dell'omeostasi cartilaginea.<sup>22</sup>

Anche l'attività delle proteasi sembra essere notevolmente importante, esse hanno un ruolo non solo nella digestione dei coaguli di fibrina ma anche nel processo di condrogenesi e nell'attivazione dei fattori di crescita.<sup>23</sup> In particolare, le metalloproteasi della matrice (MMP) hanno un ruolo nella transizione delle MSC a condrociti maturi.<sup>24</sup> L'mRNA delle MMP10, MMP11 e MMP13 è significativamente up-regolato durante il processo di differenziazione di MSC umane espresse in coltura. In particolare si pensa che l'MMP13 abbia un ruolo chiave nelle fasi tardive della condrogenesi. L'inibizione selettiva della MMP13 impedisce la degradazione del collagene di tipo II senza interferire con il processo di rigenerativo guidato dalle MSC.<sup>25</sup>

Una revisione critica condotta da Ahmed sottolinea precisamente come i materiali e gli stimoli (fisici o chimici) influenzino la differenziazione dei condrociti.<sup>6</sup> Diverse combinazioni tra scaffolds e agenti bioattivi: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, FGF-2, IGF-1, proteine correlate all'ormone paratiroideo sono in grado di aumentare l'adesione, la proliferazione cellulare e la sintesi di ECM.

Infine, la cartilagine articolare è sottoposta ad una fine regolazione del gradiente di ossigeno. Strobel e Wernik hanno dimostrato come basse

tensioni di ossigeno durante le fasi di differenziazione di colture condrocitarie, da un lato aumentino le attività anaboliche cellulari e dall'altro riducano l'azione degli enzimi catabolici ritenuti responsabili della degradazione dell'ECM.<sup>26,27</sup>

Il carico articolare è uno stimolo fisico importante per il mantenimento dell'omeostasi del tessuto cartilagineo. Anche nelle colture *in vitro* tuttavia, gli stimoli fisici (meccanici o elettrici) possono influenzare la sintesi dei costrutti bio-ingegnerizzati. In uno studio *in vitro*, Trinidad ha mostrato come la pressione idrostatica intermittente sia in grado di inibire il rilascio di mediatori quali le MMP della matrice e citochine pro-infiammatorie da parte di condrociti umani artrosici.<sup>28</sup> Angele ha evidenziato come l'applicazione di uno stimolo meccanico incrementi la sintesi di ECM da parte dei progenitori di cellule mesenchimali differenziate *in vitro*.<sup>29</sup> Risultati simili sono stati descritti da Miyanishi il quale ha rilevato un aumento di dieci volte dei livelli di mRNA per il collagene di tipo II e l'aggrecano quando veniva applicata una pressione idrostatica intermittente a MSC adulte *in vitro*.<sup>30</sup> Tanimoto ha descritto come un eccesso di stimolo meccanico possa incrementare sia la secrezione che l'attività degli enzimi di degradazione ialuronidasi (HYAL-1 e HYAL-2).<sup>31</sup>

Wescoe ha studiato il ruolo dell'ambiente biochimico e biofisico nella differenziazione in senso condrocitario di cellule staminali evidenziando come i parametri spaziali e temporali di applicazione dello stimolo e la scelta del

corretto momento dell'impianto del costruito bio-ingegnerizzato debbano ancora essere ottimizzati.<sup>32</sup>

Tuttavia anche considerando e controllando tutti i parametri sopra menzionati relativi agli scaffolds e agli stimoli a cui le cellule sono sensibili, la fase ultima del processo bio-ingegneristico *in vitro*, richiede una valutazione delle proprietà biologiche e biomeccaniche del tessuto di sintesi prima che esso sia impiantato. Il risultato *in vivo* dipenderà inoltre dalle capacità di rimodellamento e di integrazione del costruito con il tessuto ospite.

### **Intervento chirurgico e fase di valutazione – impianto del costruito per la riparazione del difetto cartilagineo e valutazione clinica**

Lo scenario del sito di lesione *in vivo* è completamente differente rispetto alle condizioni di un ambiente ben controllato *in vitro*. Nell'ambiente articolare potenti mediatori ad attività catabolica possono influenzare il metabolismo dei condrociti ed il mantenimento dell'integrità della ECM.<sup>19-33</sup>

La maggior parte delle procedure di ingegneria tissutale per la riparazione della cartilagine articolare vengono eseguite a seguito di traumi. L'eziopatogenesi traumatica altera l'ambiente articolare determinando un aumento della concentrazione delle citochine pro-infiammatorie durante la fase acuta dell'infiammazione. Nel lungo periodo, un innalzamento cronico

dei livelli di IL-1 e IL-6 nel liquido sinoviale potrebbe essere responsabile della degenerazione cartilaginea portando allo sviluppo dell'OA.<sup>34-36</sup> E' stato dimostrato come l'IL-1 induca l'espressione di alcune MMP e dell'aggrecanasi con conseguente degradazione di molti dei componenti della ECM.<sup>42</sup> Questa citochina infine previene la sintesi di alcuni enzimi inibitori (inibitori tissutali delle MMP), con conseguente marcata riduzione della produzione del collagene di tipo II e dell'aggrecano.<sup>9,18-20</sup> Come l'alterazione dell'omeostasi articolare nell'OA possa influenzare il risultato clinico in pazienti con lesioni cartilaginee a carattere degenerativo trattate mediante procedure di medicina rigenerativa deve ancora essere determinato.

Inoltre, se da una parte è ben noto l'aumento della concentrazione di citochine, proteasi e fattori di crescita nel liquido sinoviale di pazienti con OA, dall'altra non è sufficientemente sottolineato come altre condizioni patologiche possano alterare la concentrazione di questi markers.<sup>43</sup> L'intervento chirurgico stesso, rappresenta un elemento scatenante una risposta infiammatoria con effetti negativi sulla cartilagine. L'effetto del microambiente articolare sul costrutto bio-ingegnerizzato è importante nei giorni immediatamente successivi all'intervento chirurgico (tabella 2).

Tabella 2. Citochine e fattori di crescita presenti nel microambiente articolare in presenza di lesioni cartilaginee e dopo intervento chirurgico.

<b>Bibliografia</b>	<b>Citochine ed enzimi</b>	<b>Effetti correlati</b>
9,18,20	↑ IL-1	↓TIMPs, collagene di tipo II, aggregano
37	↑ IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$	↑citochine infiammatorie, MMP, aggrecanasi, COX2, NO ↓sintesi ECM, TIMP
38	↑ IL-1	↑MMP, aggrecanasi, degradazione ECM ↓collagene di tipo II
15,16,40	↑ IL-1	↑MMP, aggrecanasi, degradazione ECM
43	↑ IL-6	↑effetti catabolici del TNF- $\alpha$ ↓proteoglicani, ECM
44	↑ bFGF, IL-1, IGF-1	↑Proteina C Reattiva
45	↑ IL-1 $\beta$	Inibizione della differenziazione in senso condrocitario delle MSC

L'innalzamento della concentrazione di IL-1 è stata documentata dopo chirurgia articolare ed i suoi livelli hanno trovato una corrispondenza con la severità del danno cartilagineo.<sup>42</sup>

Schmal ha misurato la concentrazione di aggrecano, bFGF, IGF-1 e IL-1 $\beta$  nel liquido sinoviale di soggetti sani (IL-1 $\beta$  non misurabile) e di pazienti candidati ad intervento chirurgico di microfratture o di trapianto di condrociti autologhi (ACI).<sup>44</sup> L'IL-1 $\beta$  aumentava immediatamente dopo l'intervento chirurgico e correlava positivamente con i livelli di Proteina C reattiva.

L'importanza del controllo dell'ambiente articolare deriva dall'osservazione che la bontà del risultato clinico dopo ACI è inversamente proporzionale alla

concentrazione di citochine pro-infiammatorie nel liquido sinoviale al momento dell'intervento chirurgico.<sup>44</sup> Inoltre in presenza di IL-1 la differenziazione delle MSC vira verso un fenotipo fibroblastico, i condrociti trapiantati sintetizzano fibrocartilagine e si osserva un incremento delle attività cataboliche e di degradazione della ECM. In un ambiente infiammatorio si osserva il rilascio di PGE-2 che promuove l'apoptosi condrocitaria. Infatti, in uno studio pubblicato da Lima, è stato dimostrato come la cartilagine bio-ingegnerizzata esposta a concentrazioni di IL-1 $\alpha$  durante le prime fasi della coltura, non sviluppi adeguate proprietà meccaniche e funzionali persino dopo che l'IL-1 $\alpha$  sia stata rimossa dal mezzo di coltura.<sup>33</sup> Questo fenomeno sottolinea come persino esposizioni transitorie a fattori chimici, che possono derivare dall'infiammazione, possono avere effetti a lungo termine e favorire lo sviluppo di un tessuto immaturo a livello articolare.

Recentemente è stato osservato come approcci di medicina rigenerativa che mirano a riparare lesioni cartilaginee post-traumatiche, in presenza di un ambiente infiammatorio caratterizzato da alte concentrazioni di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  non riescano ad indirizzare il differenziamento di cellule progenitrici in senso condrocitario. Infatti, l'IL-1 $\beta$  e il TNF- $\alpha$  inibiscono la differenziazione condrocitaria delle MSC umane attraverso vie biochimiche NF- $\kappa$ B dipendenti.<sup>45</sup>

Al fine di limitare l'effetto negativo delle citochine pro-infiammatorie sulla cartilagine bio-ingegnerizzata, è stato suggerito che il costrutto venisse impiantato ad uno stadio di maturazione più avanzato ovvero funzionalmente più maturo. La presenza della ECM potrebbe pertanto proteggere le cellule sia da insulti meccanici che da assalti chimici.<sup>19,33</sup>

Il ruolo potenzialmente negativo della risposta infiammatoria conseguente a traumi o ad interventi chirurgici è attualmente riconosciuto come un importante bersaglio soprattutto per prevenire l'OA. E' stato suggerito l'utilizzo di inibitori delle caspasi, di fattori di crescita, di inibitori di citochine, di citochine anti-infiammatorie, di inibitori degli enzimi che degradano la ECM e di antiossidanti al fine di contrastare l'effetto negativo della risposta infiammatoria.<sup>42</sup> Queste opzioni terapeutiche farmacologiche potrebbero essere adottate per proteggere la cartilagine rigenerata.<sup>37</sup>

### **CEMP come strategia per la difesa del costrutto**

Il rationale dell'impiego della stimolazione biofisica mediante CEMP come adiuvante delle tecniche di ingegneria tissutale per la riparazione della cartilagine articolare nasce da due importanti osservazioni:

- a) L'incremento delle attività anaboliche dei condrociti e degli espianti cartilaginei esposti a CEMP.

b) La capacità della stimolazione con CEMP, grazie all'attività agonista per il recettore adenosinico  $A_{2A}$ , di prevenire gli effetti catabolici dell'infiammazione associata all'OA, al trauma chirurgico o alla lesione cartilaginea stessa.

### **Fase di ingegneria tissutale *in vitro*: effetto anabolico dei CEMP sulla cartilagine e sui condrociti**

Diversi lavori hanno analizzato gli effetti *in vitro* dei CEMP su colture di condrociti, di sinoviociti o su espianti (tabella 3).

Tabella 3. Studi *in vitro* sull'effetto della stimolazione biofisica su condrociti, sinoviociti e tessuto articolare.

<b>Caratteristiche del segnale</b>	<b>Tempo di esposizione</b>	<b>Modello sperimentale</b>	<b>Ipotesi/scopo dello studio</b>	<b>Risultato</b>	<b>Ref</b>
Frequenza: 6.4Hz Intensità: 0.4mT Impulso: 230µs	5 giorni	Condrociti articolari umani	Effetto dei CEMP sulla proliferazione e sulla sintesi dei GAG	Aumento della sola proliferazione cellulare	46
Frequenza: 75Hz Intensità: 2.3mT Impulso: 1.3ms	6, 12, 18, 24, 30 ore	Colture monostrato di condrociti articolari e nasali umani	Effetto dei CEMP sulla proliferazione con o senza FCS	Aumento della proliferazione in presenza di FCS	47
Frequenza: 75Hz Intensità: 2.3mT Impulso: 1.3ms	1, 6, 9, 18 ore e esposizione continua per 3 e 6 giorni	Condrociti articolari umani	Effetto dei CEMP sulla proliferazione	Aumento della proliferazione dopo 9 e 18 ore di esposizione in condizioni di alta e bassa densità. Incremento della proliferazione durante i primi tre giorni di coltura in condizione di bassa densità cellulare	48
Frequenza: <30Hz Intensità: 10-20G Impulso: 67ms	3 ore al giorno per 3 giorni	Condrociti articolari umani in alginato con o senza IL-1β	Effetto dei CEMP sulla sintesi di PG e sulla morfologia dei condrociti	IL-1β induce un marcato danno cellulare osservato all'analisi mediante TEM e una riduzione della sintesi di PG. La stimolazione con CEMP ripristina la struttura cellulare e la sintesi di PG	49

Caratteristiche del segnale	Tempo di esposizione	Modello sperimentale	Ipotesi/scopo dello studio	Risultato	Ref
Frequenza: 75Hz Intensità: 2.3mT Impulso: 1.3ms	24 ore	Espianti di cartilagine articolare bovina	Effetto dei CEMP sulla riduzione della sintesi di PG indotta dall'IL-1 $\beta$	Aumento della proliferazione cellulare e della sintesi di PG. IL-1 $\beta$ diminuisce la sintesi di PG e ne aumenta il rilascio con conseguente riduzione del contenuto netto di PG nel tessuto. Negli espanti esposti a IL-1 $\beta$ , i CEMP aumentano la sintesi di PG senza modificarne il rilascio	50
Frequenza: 75Hz Intensità: 1.5mT Impulso: 1.3ms	24 ore	Condrociti articolari bovini e espanti di tessuto cartilagineo bovino	Effetto dei CEMP e dell' IGF-1 sulla sintesi di PG	I CEMP aumentano la sintesi di PG negli espanti cartilaginei. IGF-1 aumenta la sintesi di PG in modo dose-dipendente. L'effetto dei due stimoli è additivo. Su condrociti in monostrato l'IGF-1 stimola la sintesi di PG in modo dose-dipendente. Questo effetto non si osserva con i CEMP	51
Frequenza: 200Hz Intensità: 40mT	24 minuti al giorno per 7 giorni	Espanti cartilaginei di mucca e vitello	Effetto dei CEMP sulla sintesi della ECM in relazione all'età e al danno cartilagineo	I CEMP favoriscono la sintesi delle macromolecole della ECM negli espanti di tessuti integri, ma sono privi di effetti su quelli danneggiati. L'effetto catabolico dell'IL-1 $\beta$ viene in parte contrastato dai CEMP solo negli espanti provenienti da animali giovani. I CEMP hanno un effetto condroprotettivo età-dipendente, ma non modificano la struttura cartilaginea quando essa è compromessa	52
Frequenza: 2-11Hz Intensità: 0.5-2mT Impulso: 1.3ms	1, 4, 9 e 24 ore con differenti valori di picco di campo magnetico (0.5, 1, 1,5 e 2mT) e differenti frequenze (2, 37, 75 e 110Hz)	Espanti di cartilagine articolare bovina	Effetto dell'esposizione a CEMP con differenti parametri sulla regolazione della sintesi di PG	Nessuna differenza nel contenuto di DNA tra espanti esposti e non esposti. La sintesi di PG è aumentata significativamente negli espanti esposti con un effetto massimo osservato a 1.5Mt	53
Frequenza: 10-370Hz Intensità: 0.7-5.4mT Impulso: 1.3ms	1, 6 ore	Condrociti articolari umani	Effetto dei CEMP sulla morfologia cellulare	L'esposizione a CEMP determina una modificazione della morfologia cellulare: da una forma stellata verso una sferica. Questa modifica morfologica si ottiene modificando l'intensità e la frequenza del campo da 1.3 a 3.1mT e da 500 a 100Hz rispettivamente	54
CMS Intensità: 0.6T CEMP Frequenza: 21.2MHz Impulso: 15ms	72 ore	Condrociti articolari umani	Effetto dei CEMP sull'attività metabolica dei condrociti	CMS incrementano la vitalità e la proliferazione cellulare. Più colture rispondenti a CMS che non ha CEMP	55
Frequenza: 75Hz Intensità: 1.6mT Impulso: 1.3ms	Breve termine: 12 ore on/12 ore off ogni 24 ore. Lungo termine: 4 ore al giorno per 10 giorni	Condrociti articolari umani ottenuti da membrane MACI® precedentemente impiantate	Verificare il potenziale riparativo dei CEMP	Incremento del numero di cellule nella fase del ciclo SG2M sia negli studi a breve che a lungo termine quando esposte a CEMP	56

Caratteristiche del segnale	Tempo di esposizione	Modello sperimentale	Ipotesi/scopo dello studio	Risultato	Ref
Frequenza: 75Hz Intensità: 1.5mT Impulso: 1.3ms	Una settimana	Condrociti e fibroblasti tipo-sinovociti bovini	Effetto dei CEMP sulla densità di recettori adenosinici A <sub>2A</sub> e A <sub>3A</sub>	I CEMP determinano una up-regolazione dei recettori adenosinici A <sub>2A</sub> e A <sub>3A</sub> con conseguente aumento delle attività correlate a queste vie metaboliche in entrambi i tipi cellulari	57
CEM sinusoidali: Frequenza: 50Hz Intensità: 2mT CEMP: Frequenza: 16.7Hz Intensità: 2mT Impulso: 4ms	1, 3, 7 e 14 giorni	Condrociti articolari umani coltivati su gel collagene di tipo I	Effetto della stimolazione su condrociti isolati da ginocchia artrosiche	Non differenze significative nell'espressione genica dell'aggregano e del collagene di tipo II tra i diversi gruppi di trattamento e controlli	58
Frequenza: 75Hz Intensità: 1.8-3mT Impulso: 1.3ms	24 ore	Condrociti articolari suini inclusi in gel di atelocollagene	Effetto dei CEMP sulla riparazione cartilaginea	Aumento della proliferazione cellulare e dell'espressione di aggregano e collagene di tipo II. Riduzione della sintesi di GAG a 3 settimane	59
Frequenza: 75Hz Intensità: 1.5mT Impulso: 1.3ms	1-7 giorni	Espianti di cartilagine umana da pazienti con OA	Effetto dei CEMP sul metabolismo dei PG. Gli espanti sono stati coltivati in presenza di IL-1 $\beta$ e/o IGF-1	L'esposizione a CEMP e a IGF-1 aumenta le attività anaboliche degli espanti cartilaginei, la sintesi di PG e contrasta l'attività catabolica dell'IL-1 $\beta$ nell'OA di grado I e III secondo la classificazione di Outerbridge	60
Frequenza: 75Hz Intensità: 1.8-3mT Impulso: 1.3ms	2 ore al giorno per 3 settimane	Condrociti articolari suini inclusi in un film di chitosano	Effetto dei CEMP sul comportamento dei condrociti coltivati in film di chitosano	Al termine della terza settimana i condrociti esposti a CEMP depositano il 28% in più di GAG rispetto ai controlli e il 24-27% in più di collagene di tipo II a 2 e 3 settimane	61
Frequenza: 75Hz Intensità: 1.5mT Impulso: 1.3ms	24 ore	Fibroblasti sinoviali umani da pazienti artrosici	Effetto dei CEMP sull'infiammazione in presenza di IL-1 $\beta$	Effetto anti-infiammatorio dei CEMP attraverso l'up-regolazione dei recettori adenosinici A <sub>2A</sub> e A <sub>3A</sub>	62

Abbreviazioni: CEMP-campi elettromagnetici pulsati, GAG-glicosaminoglicani, CMS-campi magnetici statici, FCS-siero fetale di vitello, PG-proteoglicani, TEM-microscopio elettronico a trasmissione.

La maggior parte di questi studi ha dimostrato come l'esposizione a CEMP influenzi l'attività condrocitaria in diversi modelli sperimentali (colture in monostrato, espanti cartilaginei, presenza di scaffolds tridimensionali), aumentando significativamente la proliferazione cellulare e la sintesi di componenti specifici della ECM come proteoglicani (PG) e collagene di tipo

II. 49,50,52,60,62

Inoltre , in un modello sperimentale su espianti cartilaginei umani, Ongaro ha dimostrato come la stimolazione con CEMP sia in grado di aumentare la sintesi di PG in misura analoga all'Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), il più importante fattore di crescita anabolico per la cartilagine. L'effetto dell'esposizione contemporanea a CEMP e IGF-1 sull'attività metabolica dei condrociti è risultato additivo.<sup>60</sup>

Nel complesso questi dati *in vitro* supportano un ruolo attivo della stimolazione biofisica nella fase di sviluppo e di manipolazione del costrutto bio-ingegnerizzato in coltura. In condizioni sperimentali ottimali come ad esempio in un ambiente *in vitro* perfettamente controllato in termini di mezzo di coltura, fattori di crescita, tensione di ossigeno e caratteristiche dello scaffold, l'applicazione dello stimolo fisico favorisce la proliferazione e la colonizzazione cellulare dello scaffold così come la sintesi della ECM cartilaginea. Alcuni autori hanno pertanto ipotizzato un ruolo per la stimolazione biofisica a partire dalle fasi *in vitro* durante le colture cellulari su scaffold, suggerendo come la combinazione tra ingegneria tissutale e CEMP a bassa frequenza possa migliorare le tecniche attuali per la riparazione cartilaginea.<sup>55,61</sup>

## **Fase chirurgica: effetto della stimolazione con CEMP sul microambiente**

E' stato dimostrato come i CEMP contrastino l'effetto negativo della citochina IL-1 $\beta$  sulla produzione dei componenti della ECM in espianti di tessuto cartilagineo.<sup>49,50,52,60</sup> Su queste basi abbiamo ipotizzato come la stimolazione biofisica durante la fasi dell'impianto chirurgico possa prevenire l'effetto catabolico indotto dalle molecole infiammatorie sia sulla cartilagine impiantata che su quella circostante proteggendo il costrutto bio-ingegnerizzato nel lungo periodo.

Dati recenti evidenziano come l'attività dell'IL-1 $\beta$  inibisca l'espressione di specifici markers condrocitari quali l'aggrecano ed il collagene di tipo II così come la sintesi di PG durante la differenziazione in senso condrocitario di MSC indotta da TGF- $\beta$ 3. Tutte queste attività sono efficacemente contrastate dalla stimolazione con CEMP (figura 1A e B).

E' noto come i sinoviociti contribuiscano enormemente alla regolazione del microambiente articolare attraverso la secrezione di un'ampia gamma di mediatori dell'infiammazione come ad esempio le prostaglandine E2 (PGE-2).<sup>63</sup> Studi recenti sui sinoviociti, mostrano come l'esposizione a CEMP sia in grado di inibire significativamente il rilascio di PGE-2 così come di IL-6 e di IL-8, e di promuovere la sintesi di IL-10, citochina ad attività anti-infiammatoria.<sup>62,64</sup>

Abbiamo ipotizzato un ruolo della stimolazione biofisica nel mantenimento della ECM, dell'integrità della cartilagine trapiantata/rigenerata e nel migliorarne la sua integrazione con la cartilagine ospite.

Anche se a tutt'oggi non ci sono studi in vivo sugli effetti dei CEMP su costrutti cartilaginei bio-ingegnerizzati, è tuttavia stato dimostrato l'effetto positivo della stimolazione biofisica nel favorire l'integrazione e prevenire il riassorbimento di innesti osteocondrali in un modello sperimentale nella pecora. Questo effetto si associa ad un controllo dell'ambiente articolare documentato da una riduzione della concentrazione di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nel liquido sinoviale degli animali trattati rispetto ai controlli.<sup>65</sup>

### **Effetto anti-infiammatorio dei CEMP mediante l'up-regolazione dei recettori adenosinici A<sub>2A</sub>**

L'adenosina è normalmente presente a basse concentrazioni nel liquido extracellulare ma la sua concentrazione cresce significativamente in presenza di stress metabolici quali l'ipossia, l'ischemia o l'infiammazione.<sup>66,67</sup>

L'adenosina determina diversi effetti biologici attraverso il legame con quattro diversi recettori adenosinici chiamati rispettivamente: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> accoppiati con differenti proteine G.<sup>68,69</sup> I recettori adenosinici A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> sono associati a proteine G che mediante l'adenilato ciclasi stimolano l'accumulo di AMP ciclico (figura 2A e B).<sup>70</sup> La presenza di AMP ciclico influisce su

numerose vie metaboliche intracellulari che determinano un'inibizione del rilascio di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  favorendo la risoluzione dell'infiammazione articolare.<sup>70,71</sup> La stimolazione dei recettori adenosinici A<sub>2A</sub> in cellule mononucleate del sangue periferico inibisce la produzione di TNF- $\alpha$ .<sup>72</sup> La via metabolica mediata dall'attivazione dei recettori adenosinici A<sub>2A</sub> è inoltre indispensabile per mantenere un corretto bilanciamento tra la risposta cellulare a patogeni infettivi e una risposta infiammatoria eccessiva.<sup>73</sup> I segnali cellulari innescati dalle citochine pro-infiammatorie convergono sull'attivazione del fattore nucleare kappa B (NF- $\kappa$ B) il quale promuove la trascrizione e la produzione di citochine.<sup>74</sup> Ci sono evidenze in diversi modelli cellulari inclusi i sinoviociti umani, che la stimolazione dei recettori adenosinici A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> determini l'inibizione dell'NF- $\kappa$ B.<sup>75-77</sup> Sia nei condrociti che nei sinoviociti, l'NF- $\kappa$ B è un regolatore chiave dell'espressione della ciclo-ossigenasi-2 e delle MMP, è responsabile inoltre dell'espressione di un'ampia gamma di geni in risposta all'infezione e all'infiammazione.<sup>78,79</sup> E' stato postulato come l'NF- $\kappa$ B non solo giochi un ruolo cruciale nella risposta pro-infiammatoria dei condrociti correlata a stress intra ed extracellulari ma anche nel controllo del loro programma di differenziazione. In particolare l'NF- $\kappa$ B, influisce sull'accumulo e sull'organizzazione delle proteine della ECM e ha un ruolo positivo indiretto sui regolatori della differenziazione terminale dei condrociti.<sup>80</sup> Poiché molti degli stimoli catabolici della cartilagine si estrinsecano attraverso l'attivazione della via dell'NF- $\kappa$ B, l'inibizione di questa

via potrebbe rappresentare un target terapeutico per le patologie articolari.<sup>81</sup>

L'adenosina inoltre riduce i livelli di citochine pro-infiammatorie come ad esempio il TNF- $\alpha$  e l'IL-1 $\beta$  nell'artrite reumatoide.<sup>82-84</sup>

I recettori adenosinici  $A_{2A}$  sono stati pertanto farmacologicamente caratterizzati; i loro agonisti, in uno studio sperimentale condotto su conigli, sono stati in grado di inibire il danno cartilagineo nel trattamento di artriti settiche attraverso l'inibizione del rilascio di IL-8.<sup>85</sup> Inoltre i recettori adenosinici  $A_{2A}$  sono primariamente coinvolti nella riparazione tissutale e la loro stimolazione accelera la guarigione delle ferite.<sup>86</sup>

La stimolazione con CEMP agisce a livello dei recettori della membrana cellulare ed influenza la distribuzione delle proteine di membrana.<sup>87,88</sup> Studi *in vitro* condotti su neutrofili umani suggeriscono come la stimolazione biofisica influenzi l'attività dell'adenilato ciclasi e la produzione di anioni superossido attraverso l'up-regolazione dei recettori adenosinici localizzati sulla superficie dei neutrofili.<sup>89,90</sup> I CEMP attraverso i recettori adenosinici  $A_{2A}$ , limitano l'infiammazione riducendo l'espressione della ciclo-ossigenasi 2 (COX<sub>2</sub>) e di conseguenza la sintesi di PGE-2 in sinoviociti bovini.<sup>64</sup> Questi effetti potrebbero essere attribuiti alla capacità dei CEMP di potenziare l'attivazione dei recettori adenosinici  $A_{2A}$  con conseguente inibizione della via metabolica dell'NF $\kappa$ B e decremento della sintesi di molecole infiammatorie. La

stimolazione con CEMP infatti, in colture di sinoviociti e condrociti bovini determina un up-regolazione dei recettori adenosinici  $A_{2A}$  e  $A_3$ .<sup>91</sup>

Numerosi studi mostrano come la stimolazione biofisica rappresenti uno strumento terapeutico efficace per limitare la degradazione della cartilagine e controllare l'infiammazione associata a patologie articolari. Attraverso la modulazione dell'attività dei condrociti e dei sinoviociti i CEMP sono uno strumento efficace nel prevenire l'insorgenza e la progressione dell'OA in modelli animali.<sup>92-94</sup>

Questi studi mostrano chiaramente il bersaglio molecolare dei CEMP suggerendo un loro potenziale utilizzo come agenti anti-infiammatori. Essi trovano il loro meccanismo d'azione nell'up-regolazione dei recettori adenosinici che si traduce nella trascrizione dei geni della superfamiglia del TGF- $\beta$  e nel conseguente incremento delle attività anaboliche condrocitarie.<sup>9,65,95-99</sup> Questi effetti dei CEMP *in vitro* si traducono *in vivo* nel fenomeno della condroprotezione.

Nella riparazione cartilaginea il TGF- $\beta$  ha un ruolo fondamentale. Il TGF- $\beta$ 1 stimola la sintesi di collagene di tipo II e limita la sintesi delle citochine pro-infiammatorie.<sup>63</sup> Boopalan ha studiato l'effetto dei CEMP sulla riparazione di difetti osteocondrali articolari a tutto spessore nelle ginocchia dei conigli. I difetti venivano eseguiti a livello della troclea e riempiti con scaffold di calciofosfato che fornisce alle cellule midollari un supporto strutturale da

colonizzare e in cui proliferare. Gli autori hanno riscontrato una guarigione completa del difetto osteocondrale negli animali stimolati con CEMP.<sup>100</sup>

Alcuni autori hanno studiato l'effetto dose risposta della stimolazione con CEMP su colture cellulari ed espianti cartilaginei con l'obiettivo di identificare i parametri più efficaci in termini di ampiezza e frequenza del segnale e di tempo di esposizione al fine di poterli utilizzare in studi clinici.<sup>53</sup> I risultati di altre ricerche mostrano una stretta relazione tra le caratteristiche fisiche del segnale e la risposta biologica, evidenziando come la mancanza di effetti che alcuni studi riportano possa essere attribuita a segnali inefficaci.<sup>58,98</sup>

Sulla base di queste considerazioni, la stimolazione biofisica potrebbe essere efficace nel promuovere la formazione di nuova cartilagine nell'ambito di un costrutto bio-ingegnerizzato, nel proteggerla da un micro-ambiente infiammatorio quando impiantata chirurgicamente e nel favorire la sua integrazione con il tessuto osseo e cartilagineo circostante.

## **Studi Clinici**

Zorzi in uno studio prospettico randomizzato in doppio cieco ha valutato l'effetto dei CEMP dopo trattamento artroscopico di lesioni cartilaginee del ginocchio.<sup>101</sup> L'ipotesi era quella che i pazienti potessero beneficiare della stimolazione biofisica controllando precocemente l'infiammazione e

ritornando a svolgere le loro attività di vita quotidiane. Lo studio ha dimostrato che il risultato clinico dei pazienti nel gruppo attivo è stato migliore rispetto a quello del gruppo di controllo in termini di dolore, assunzione di anti-infiammatori non steroidei (NSAIDs) e funzionalità articolare persino a tre anni di follow-up. Sulla base delle conoscenze pre-cliniche gli autori hanno concluso che i CEMP sono in grado di controllare in modo efficace il processo infiammatorio determinando una condroprotezione duratura nel tempo.

In un altro studio, Benazzo ha dimostrato come la stimolazione con CEMP fosse efficace nell'accorciare i tempi di recupero di pazienti sottoposti a ricostruzione del legamento crociato anteriore permettendogli un precoce ritorno all'attività sportiva.<sup>102</sup>

Un ulteriore studio clinico ha mostrato un effetto benefico dei CEMP in pazienti sottoposti a trapianto di condrociti autologhi. I pazienti erano stati stimolati per sessanta giorni nel immediato post-operatorio; a due anni di follow-up, il gruppo di trattamento ha ottenuto un miglior risultato clinico sia nelle attività quotidiane della vita che nel ritorno all'attività sportiva rispetto al gruppo di controllo (85% vs. 33%).<sup>103</sup>

Dai risultati di questi studi clinici emerge come la stimolazione biofisica determini una precoce risoluzione del processo infiammatorio (effetto a breve termine) e mantenga il risultato clinico nel tempo a 2-3 anni di follow-up (effetto a lungo termine).

Inoltre è importante considerare come il campo magnetico generato da un solenoide che abbraccia anatomicamente l'articolazione da trattare sia disegnato per permettere la contemporanea esposizione di tutte le strutture articolari: l'intera estensione ed il completo spessore della cartilagine, l'osso subcondrale e la membrana sinoviale. Gli effetti a breve termine possono essere spiegati attraverso l'effetto anti-infiammatorio conseguente all'attivazione dei recettori adenosinici  $A_{2A}$ . Per gli effetti a lungo termine si può ipotizzare che il controllo precoce degli eventi infiammatori prevenga l'effetto catabolico delle citochine pro-infiammatorie sull'intera cartilagine articolare preservandola nel tempo. Inoltre, l'effetto anabolico sui condrociti che determina un incremento della sintesi di PG potrebbe mantenere la competenza meccanica del tessuto cartilagineo.

Sulla base della vasta documentazione pre-clinica e degli ottimi risultati clinici abbiamo ipotizzato un possibile ruolo della stimolazione biofisica con CEMP in associazione ad alcuni degli interventi chirurgici comunemente effettuati per la riparazione delle lesioni osteocondrali.

Lo scopo di questo studio è stato quello di:

- comprendere la risposta della cartilagine articolare, sottoposta a lesione iatrogena, alla stimolazione biofisica con CEMP;

- valutare l'effetto della stimolazione biofisica associata a tecniche chirurgiche per la riparazione cartilaginea quali: l'inserimento di scaffold e il trapianto di cellule mononucleate midollari (TCMM) su scaffold.

# MATERIALI E METODI

Lo studio è realizzato in accordo con la legislazione europea ed italiana sulle sperimentazioni animali (Decreto legge del 27 Gennaio 1992, No.116) ed approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli.

Il modello sperimentale sul coniglio è stato messo a punto dopo avere eseguito diversi interventi chirurgici e numerose valutazioni cliniche e istologiche al fine di minimizzare le complicanze quali la lussazione della rotula e di scegliere uno scaffold adeguato per la riparazione di un difetto osteocondrale.

Venti conigli adulti maschi di razza New Zeland (Charles River, Calco, Lecco, Italia) del peso medio di 3,3Kg sono stati utilizzati. I conigli sono stati stabulati in gabbie di Plexiglas (40 x 25 x 18cm) in condizioni controllate (temperatura della stanza  $22\pm 0.5$  °C; umidità relativa  $55\pm 5\%$ ; 12 ore di luce e 12 ore di buio) e nutriti mediante dieta standard (Piccioni, Settimo Milanese, Italia) ed acqua *ad libitum*.

Gli animali sono stati operati in anestesia generale indotta dall'iniezione intramuscolare di 44mg/kg di Ketamina (Ketavet 100, Farmaceutici Gellini SpA, Aprilia, Italia) e 3mg/kg di xilazina (Rompun Bayer AG, Leverkusen, Germania) e mantenuti in ventilazione assistita ( $O_2$ : 1l/min;  $N_2O$ : 0.4l/min; isofluorano: 2.5-3%).

Immediatamente prima della procedura chirurgica alcuni animali sono stati sottoposti ad aspirazione di midollo osseo mediante l'inserimento di un ago

16 gauge nella cresta iliaca posteriore. Una siringa da 10ml inumidita mediante una soluzione salina con eparina (1:1.000 eparina in 100ml al 0.9% di cloruro di sodio) e stata connessa all'ago e il midollo osseo è stato aspirato in frazioni da 1.5–2ml, la rotazione simultanea dell'ago impediva il ritorno venoso. Un volume di aspirato di circa  $6\pm 1.5$ ml è stato prelevato e inserito in provette sterili contenenti 0.5ml di soluzione eparinica diluita 1:1.000 per prevenirne la coagulazione. Il prelievo è stato immediatamente processato attraverso centrifugazione isopicnica per concentrare le MSC. In breve un analogo volume di soluzione salina tamponata (PBS) è stata aggiunta al prelievo di midollo osseo, la miscela è stata successivamente stratificata su Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) non diluita con densità di 1.083g/ml e successivamente centrifugata per 30 minuti a 600g. Lo strato cellulare a bassa densità è stato separato, lavato, contato ( $2.03\pm 1.38 \times 10^6$  cellule/ml), e risospeso in 200 $\mu$ l di PBS per l'impianto chirurgico immediato. L'intera procedura è stata eseguita in condizioni di sterilità.

Attraverso un'artrotomia laterale del ginocchio con lussazione mediale della rotula si è ottenuta una completa esposizione del condilo femorale mediale (CFM). Con frese di diametro progressivamente crescente sino ad un diametro di 4mm e direzione perpendicolare alla superficie di carico del CFM si è eseguita una lesione osteocondrale di 5mm di profondità.

La lesione osteocondrale effettuata nel ginocchio destro di ogni coniglio è stata lasciata a guarigione spontanea. Quella del ginocchio sinistro è stata assegnata a uno dei due gruppi di trattamento:

- Inserimento di scaffold in collagene IOR-G (Novagenit, Mezzolombardo, Trento, Italia);
- Inserimento di scaffold in collagene IOR-G imbibito di cellule mononucleate midollari (figura 3).

La capsula articolare e la cute sono state suturate secondo i piani chirurgici.

Antibiotici (cefazolina, Bristol Mayer Squibb, Sermoneta, Italia, 100mg/kg) e analgesici (metamizole cloruro, Farmolisina, Vetem SpA, Porto Empedocle, Italia, 50mg/kg) sono stati somministrati nell'immediato post-operatorio.

Indipendentemente dal trattamento eseguito, a partire dalla prima giornata post-operatoria, la metà degli animali è stata sottoposta a stimolazione biofisica con campi magnetici: 1.5mT, 75Hz per 6 ore al giorno (I-ONE, Igea SpA, Carpi, Italia) fino alla data del sacrificio. Due solenoidi sono stati posizionati all'esterno della gabbia e collegati ad uno stimolatore.

Le gabbie utilizzate per la stimolazione biofisica erano lunghe 40cm, alte 20cm e larghe 20cm, ed erano fatte di Plexiglas. Ogni coniglio veniva mantenuto in una posizione fissa durante la stimolazione (figura 4) e lasciato libero di muoversi nella gabbia durante le restanti 18 ore. Le medesime

condizioni sono state applicate agli animali del gruppo di controllo, tuttavia gli stimolatori non erano energizzati.

La tabella 4 mostra la distribuzione dei campioni nei vari gruppi di trattamento.

Tipo di trattamento	Numero di campioni		Lato
	Stimolati	Non stimolati	
Guarigione spontanea	10	10	Destro
Inserimento di scaffold collagenico IOR-G	5	5	Sinistro
Inserimento di scaffold collagenico IOR-G imbibito di cellule mononucleate midollari	5	5	Sinistro

A 40 giorni dall'intervento chirurgico gli animali sono stati sacrificati mediante iniezione endovenosa di Tanax (Hoechst, Frankfurt am Main, Germania) ed i femori distali sono stati prelevati e destinati all'analisi microtomografica e istologica. Prima dell'espianto è stato effettuato un esame clinico e macroscopico dell'articolazione del ginocchio valutando la posizione della rotula. I campioni sono stati ripuliti dai tessuti molli e fotografati. Sono stati fissati in paraformaldeide tamponata al 4% per 48 ore e successivamente processati secondo le modalità per il tessuto osseo non decalcificato. Sono stati disidratati attraverso passaggi in alcool a gradazioni crescenti (un giorno per ogni passaggio: 50°, 75°, 95° x 2 and 100° x 2), poi inclusi in blocchetti di polimetilmetacrilato (Merck, Schuchardt, Hohenbrunn, Germania).

## **Analisi microtomografica**

Tutti I campioni sono stati scansionati con il sistema microtomografico Skyscan 1172 (Bruker, Micro-CT, Belgio) prima dell'inclusione in polimetilmetacrilato necessaria all'analisi istologica. E' stato applicato un voltaggio alla sorgente di raggi X di 100kV e una corrente di 100 $\mu$ A interponendo tra la sorgente e i campioni un filtro di alluminio di spessore 0.5mm. I campioni sono stati fatti ruotare di 180° con angoli consecutivi di rotazione di 0.4° (software Skyscan 1172 version 1.5 build 8). Al termine di un'acquisizione di circa 45 minuti, sono state ottenuti dataset di immagini in formato TIFF (4000 x 2096 pixels) con risoluzione nominale delle immagini di scansione di 6.5 $\mu$ m. La ricostruzione in sezioni microtomografiche è stata condotta tramite software NRecon (version 1.6.2.0) ottenendo dataset di immagini in formato JPG (4000 x 4000) con risoluzione nominale sempre di 6.5 $\mu$ m. Non sono state usate correzioni a parte lo specifico allineamento relativo ad ogni singola acquisizione e un basso ring artifact reduction dovuto al piccolo angolo di rotazione. Le immagini JPG microtomografiche compongono l'intero volume dei campioni analizzati e possono essere digitalmente elaborate per ottenere sezioni in ognuno dei piani anatomici (trasversale coronale e sagittale).

Abbiamo pianificato di eseguire le seguenti misurazioni che risultano tuttora in corso:

- Densità ossea **BV/TV** (in %) espressa come il rapporto tra il volume trabecolare osseo e il volume totale di interesse considerato (figura 5);
- Trabecular Thickness **Tb.Th** (in  $\mu\text{m}$ ) calcolato in modo modello-indipendente descritto da Hildebrand and Ruegsegger<sup>104</sup> sull'intero volume di interesse;
- Trabecular Separation **Tb.Sp** (in  $\mu\text{m}$ ) calcolato come il Tb.Th;
- Trabecular Number **Tb.N** (in  $\text{mm}^{-1}$ ) calcolato come il numero di intersezioni attraverso una struttura trabecolare per unità di lunghezza su un casuale percorso lineare attraverso il volume di interesse;
- Densità ossea all'interno del difetto **DBV/TV** (in %) espressa come rapporto tra il volume dell'osso neoformato all'interno del difetto osseo e il volume cilindrico del difetto di diametro 4mm e altezza 5mm (figura 6).

## **Analisi istologica**

I blocchetti sono stati sezionati lungo un piano parallelo all'asse maggiore del femore utilizzando un microtomo con lama diamantata Leica 1600 (Leica SpA, Milano, Italia), ottenendo una serie di sezioni di  $100\pm 10\mu\text{m}$  di spessore.

Successivamente le sezioni sono state assottigliate e lucidate (Struers Dap-7, Struers Tech, Danimarca) fino al raggiungimento di uno spessore di  $30\pm 10\mu\text{m}$ .

Sono state ottenute 3 sezioni successive per ogni campione colorate con Safranina-O (30 minuti) e Fast Green (2 minuti) ed utilizzate per l'analisi istologica. La Safranina-O si lega alla cartilagine ed è considerata un'alternativa al Blu di Toluidina. Il Fast Green contiene dei gruppi acrilici che si legano al tessuto osseo dandogli una colorazione sul verde. Questo tipo di colorazione rappresenta la colorazione standard per il tessuto osteocartilagineo.

L'analisi è stata eseguita con un microscopio Olympus BX41 (Olympus Italia Srl, Milano, Italia) a diversi ingrandimenti (1.25x, 2x, 20x and 40x). Per ogni campione le 3 sezioni centrali del volume della lesione sono state esaminate ed è stato ottenuto un valore medio.

I campioni sono stati valutati da due osservatori indipendenti mediante un punteggio di O'Driscoll appositamente modificato (tabella 5) per una valutazione il più completa possibile del tessuto osteocartilagineo rigenerato. La media dei due valori è stata considerata come valore di riferimento per quel campione.

Tabella 5: punteggio di O'Driscoll modificato, punteggio massimo 43 di cui 31 per il tessuto cartilagineo e 12 per quello osseo.

<b>Voci del punteggio</b>	<b>Valore minimo-massimo</b>
Morfologia del tessuto	0-4
Colorazione della matrice	0-3
Regolarità della superficie	0-3
Integrità della struttura	0-2
Allineamento della neocartilagine con il tessuto circostante	0-2
Presenza di clusters	0-2
Ipocellularità	0-3
Segni di degenerazione nella cartilagine adiacente	0-3
Legame con la cartilagine adiacente	0-2
Distribuzione delle cellule	0-3
Spessore della neocartilagine	0-2
Continuità del tidemark	0-2
Ripristino dell'osso subcondrale	0-4
Infiltrazione ossea nell'area del difetto	0-4
Legame con l'osso adiacente	0-4
Morfologia dell'osso subcondrale	0-4

## **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test non parametrico per campioni indipendenti U di Mann-Whitney.

Si tratta di un test esatto e scelto poiché i gruppi hanno una numerosità molto bassa, al di sotto dei 7-8 campioni per gruppo.

La significatività statistica è stata fissata per valori di  $p < 0.05$ .

# RISULTATI

Il decorso post-operatorio è stato regolare in 19 animali su venti (95%). In un unico caso (5%) si è verificata la lussazione laterale della rotula causando un'atrofibrosi del ginocchio. Il coniglio è stato sacrificato anzitempo ed è stato pertanto escluso dalle analisi (figura 7).

Nei rimanenti animali nessuna complicanza è stata osservata. All'analisi macroscopica durante l'espanto, l'articolazione aveva un aspetto normale con la presenza di un tessuto riparativo nell'area della lesione (figura 8).

### **Risultati microtomografici**

Le analisi microtomografiche sono tuttora in corso. La figura 9 mostra il confronto tra due lesioni osteocondrali lasciate a guarigione spontanea una esposta e una non esposta a CEMP.

### **Risultati istologici**

Il punteggio dello score di O'Driscoll modificato nei vari gruppi di trattamento e le relative significatività statistiche sono riportate in tabella 6 e 7 rispettivamente.

Tabella 6: valore medio del punteggio di O'Driscoll modificato nei vari gruppi di trattamento.

Punteggio di O'Driscoll modificato	Guarigione spontanea	Guarigione spontanea con stimolazione biofisica	Scaffold collagenico	Scaffold collagenico con stimolazione biofisica	TCMM su scaffold collagenico	TCMM su scaffold collagenico con stimolazione biofisica
<b>Cartilagine</b>	11.75	17.5	19.5	20.4	19.25	25.2
<b>Osso</b>	5.5	8.25	10.5	11.6	11.25	10.8
<b>Totale ± dev.st (Range)</b>	17.25±6.4 (7-25)	25.75±5.84 (36-17)	30±3.9 (25-34)	32±3.6 (26-35)	30.5±4.1 (25-35)	36±2.55 (38-32)

Tabella 7: valori di p tra animali esposti e non esposti a stimolazione biofisica, le caselle evidenziate in giallo mostrano differenze statisticamente significative.

Gruppi di trattamento	Punteggio totale	Cartilagine	Osso
Guarigione spontanea vs. Guarigione spontanea e CEMP	0.021	0.028	0.083
Scaffold vs. Scaffold e CEMP	0.413	0.556	0.556
Scaffold e TCMM vs. Scaffold, TCMM e CEMP	0.032	0.016	0.556
Guarigione spontanea vs. Scaffold	<0.0001	<0.0001	0.003
Scaffold vs. Scaffold e TCMM	1.000	1.000	0.680
Guarigione spontanea e CEMP vs. Scaffold e CEMP	0.004	0.016	0.034
Scaffold e CEMP vs. Scaffold , TCMM e CEMP	0.056	0.008	0.421

I punteggi ottenuti nelle lesioni osteocartilaginee lasciate a guarigione spontanea sono stati significativamente più alti negli animali sottoposti a stimolazione biofisica rispetto a quelli di controllo ( $p=0.021$ ) (figura 10). Anche tra le lesioni trattate mediante TCMM su scaffold collagenico ( $p=0.032$ ) (figura 11) si sono osservati punteggi significativamente maggiori negli animali stimolati rispetto ai controlli.

Paragonando i punteggi nel gruppo di trattamento con il solo scaffold collagenico nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra gli animali stimolati e quelli di controllo ( $p=0.413$ ).

Effettuando un'analisi tra i gruppi di animali non stimolati abbiamo osservato un miglioramento statisticamente significativo quando la lesione è stata trattata con scaffold collagenico rispetto alla guarigione spontanea ( $p<0.0001$ ). L'aggiunta allo scaffold di TCMM non ha prodotto benefici significativi ( $p=1$ ).

Tra gli animali esposti a CEMP, il trattamento con scaffold collagenico ha migliorato significativamente lo score istologico rispetto alle lesioni guarite spontaneamente ( $p=0.004$ ). Il TCMM su scaffold ha consentito di ottenere punteggi ancora più alti rispetto al solo scaffold, mostrando una tendenza statistica a favore di questa metodica, anche se in modo non significativo ( $p=0.056$ ). Tuttavia analizzando separatamente i punteggi relativi al tessuto cartilagineo ed al tessuto osseo ottenuti con le due metodiche (solo scaffold o TCMM) , il TCMM ha prodotto punteggi significativamente maggiori ( $p=0.008$ ) per ciò che riguarda il tessuto cartilagineo. Nessuna differenza si è osservata sul versante del tessuto osseo ( $p=0.421$ ).

# DISCUSSIONE

L'importanza della medicina rigenerativa nell'ambito delle differenti specialità medico-chirurgiche è ormai universalmente riconosciuta. A differenza del tessuto osseo la rigenerazione della cartilagine rimane un problema tuttora irrisolto.

I risultati clinici dell'ingegneria tissutale per la riparazione cartilaginea sono estremamente variabili e talvolta contrastanti.<sup>103</sup> E' stato infatti puntualizzato come esistano fattori paziente-specifici e fattori lesione-specifici che possono influenzare il risultato clinico dopo il trapianto di condrociti autologhi.<sup>105</sup>

Nonostante i buoni risultati clinici a breve termine, il tessuto rigenerato fallisce nel tempo poiché non possiede le proprietà meccaniche e funzionali della cartilagine articolare integra. Per esempio, la fibrocartilagine che si origina dalle microfratture determina un miglioramento degli score clinici ma a circa due anni di follow-up tende a degradarsi con conseguente peggioramento della sintomatologia.<sup>106</sup> Gli scaffolds utilizzati in associazione alle microfratture migliorano la qualità della cartilagine ialina e aumentano la percentuale di riempimento del difetto esitando tuttavia in un tessuto fibroso.

Anche il TCMM presenta alcuni limiti. La differenziazione *in situ* delle MSC è insufficiente per un'efficacia a lungo termine e la loro manipolazione *in vitro* non conduce alla formazione di tessuto ialino. La differenziazione in senso condrocitario delle MSC esita in una differenziazione parafisiologica con l'espressione simultanea di markers cartilaginei (collagene di tipo II e SOX-9),

di ipertrofia tessutale (collagene di tipo X e MMP-13) e ossei (osteopontina e sialoproteine).

Il successo delle terapie a base di MSC rimarrà limitato fintanto che non si riuscirà ad impedire la presenza di tessuto fibroso e ipertrofico.

Esiste pertanto la necessità di migliorare la qualità del tessuto di riparazione dopo il trattamento chirurgico delle lesioni osteocondrali.

Diversi elementi possono influire negativamente sul successo di una procedura di medicina rigenerativa tuttavia l'infiammazione locale è probabilmente il fattore più critico nell'ingegneria tessutale.

Il microambiente di un'articolazione sottoposta ad intervento chirurgico dovrebbe essere considerato come la variabile più importante che influisce sul successo di una terapia rigenerativa; esso ha un forte impatto sulla degradazione *in situ* e sulla sopravvivenza del tessuto cartilagineo bioingegnerizzato e in ultima analisi sul successo della procedura rigenerativa. Il controllo del microambiente è inoltre estremamente importante per la rigenerazione cartilaginea *in situ* che origina dalle cellule midollari dopo microfratture dell'osso subcondrale o dalla differenziazione in senso condrocitario di MSC trapiantate.<sup>23</sup>

Il nostro studio ha mostrato come difetti osteocondrali critici nel coniglio lasciati alla guarigione spontanea non siano in grado di riparare

spontaneamente ed esitano nella formazione di un tessuto fibrocartilagineo (punteggio medio 17.25). Analoghi risultati sono stati osservati da Lietman et al.<sup>107</sup>

La stimolazione biofisica si dimostrata efficace nel migliorare significativamente la qualità del tessuto rigenerato sia osseo che cartilagineo nei difetti osteocondrali lasciati a guarigione spontanea.

Il trattamento mediante inserimento del solo scaffold collagenico si è dimostrato efficace nel promuovere una risposta ripartiva con punteggi significativamente migliori rispetto alle lesioni lasciate a guarigione spontanea sia in presenza che in assenza di stimolazione biofisica ( $p=0.034$  e  $p=0.003$  rispettivamente). Paragonando la qualità istologica del tessuto rigenerato delle lesioni trattate mediante l'inserimento del solo scaffold abbiamo osservato un effetto positivo della stimolazione biofisica sebbene in modo non significativo, (O'Driscoll modificato: 32 vs. 30).

L'effetto della stimolazione biofisica è risultato maggiormente efficace ed evidente in presenza di MSC. Le MSC hanno la potenzialità di differenziare in un fenotipo condrocitario tuttavia la presenza di citochine pro-infiammatorie in particolare di IL-1 $\beta$  è in grado di inibire la condrogenesi.<sup>108</sup> Riteniamo che l'attività antiinfiammatoria dei CEMP abbia contrastato in modo efficace l'effetto condrolesivo dell'IL-1 $\beta$  migliorando significativamente la rigenerazione cartilaginea rispetto alle lesioni non stimulate (O'Driscoll

modificato: 36 vs. 30.5,  $p=0.032$ ). Questo risultato trova conferma nel fatto che in assenza di stimolazione con CEMP il TCMM non ha prodotto risultati significativamente migliori rispetto al trattamento con il solo scaffold (O'Driscoll modificato: 30.5 vs. 30,  $p=1$ ). Le MSC trapiantate in presenza di alte concentrazioni di citochine pro-infiammatorie faticano a differenziare verso un fenotipo cartilagineo ialino con conseguente riduzione del punteggio istologico osservato.

Le strategie terapeutiche utilizzate per la riparazione delle lesioni osteocondrali in questo studio sperimentale sono attualmente eseguite nella pratica clinica.<sup>7</sup> I risultati ottenuti in questo studio, da un punto di vista istologico hanno mostrato un miglioramento progressivo partendo dalla lesione lasciata a guarigione spontanea assimilabile ad una microfrattura, all'inserimento del solo scaffold collagenico sino al TCMM su scaffold. La stimolazione biofisica ha ottimizzato ulteriormente i risultati di queste procedure tuttavia siamo ancora lontani dal riprodurre un tessuto cartilagineo perfettamente ialino, integrato e funzionalmente analogo alla normale cartilagine articolare.

In questo studio lo scaffold collagenico utilizzato non era più visibile all'analisi istologica a 40 giorni dall'intervento. Questo elemento rappresenta un vantaggio terapeutico e si avvicina in parte a nuove ipotesi di lavoro che non prevedono la necessità dell'utilizzo di scaffolds.

L'ingegneria tessutale "scaffold-free" nasce dal concetto che un tessuto è un materiale generato dall'attività cellulare, pertanto la manipolazione ed il controllo di queste attività è di primaria importanza rispetto al fornire una struttura di supporto meccanica e chimica attraverso uno scaffold.<sup>109</sup>

In questo tipo di approccio le cellule sono raggruppate in clusters o in foglietti bidimensionali e successivamente manipolate e posizionate in costrutti 3D utilizzando i clusters come "mattoni" o i foglietti come strati da sovrapporre.

Questo tipo di approccio ha alcuni vantaggi sulle metodiche con scaffolds quali:

- l'assenza di problematiche legate alla compatibilità dei prodotti di degradazione del materiale;
- le cellule sono coltivate in condizioni più simili al microambiente 3D dell'organismo permettendo una miglior comunicazione intercellulare;
- i clusters cellulari che assolvono funzioni d'organo complesse sono molto sensibili al microambiente locale e hanno minori probabilità di de-differenziarsi e perdere la loro funzione specifica.

Esistono tuttavia delle situazioni in ingegneria tessutale in cui la presenza di uno scaffold è importante poiché:

- gli scaffolds possono fornire un'adeguata resistenza meccanica mentre viene sintetizzata la ECM;

- l'assemblaggio di vasti costrutti cellulari partendo da clusters o da colture 2D è limitato dal trasporto di ossigeno, dalla diffusione dei nutrienti e dei prodotti di degradazione fino allo sviluppo di un sistema vascolare.

E' assai probabile che un approccio ibrido (utilizzo di scaffold a rapido riassorbimento) tra quello con scaffold e quello scaffold-free possa combinare i vantaggi di entrambe le metodiche. I risultati del nostro studio si avvicinano pertanto a questo tipo di scenario.

Un ulteriore approccio estremamente innovativo è rappresentato dal bioprinting definito come il posizionamento di elementi biochimici, materiali biologici e cellule con una risoluzione spaziale molto inferiore al  $\mu\text{m}$ .<sup>110</sup> La finalità del bioprinting è quella di riprodurre tessuti biologici posizionando diversi tipi cellulari in specifiche posizioni o indirizzando alcuni precursori verso un determinato differenziamento fenotipico. Fabbricare uno specifico tessuto richiede la possibilità di stampare in 3D e di posizionare cellule e molecole in modo estremamente controllato.

Il nostro studio presenta alcune limitazioni: la scarsa numerosità di campioni per gruppo di trattamento potrebbe essere alla base del mancato raggiungimento della significatività statistica tra animali stimolati e non stimolati nelle lesioni trattate con scaffold, sebbene un miglioramento dello score sia comunque stato registrato (O'Driscoll modificato: 32 vs. 30).

Un'altra limitazione risiede nell'aver valutato gli animali ad un unico tempo sperimentale di 40 giorni. Tempi sperimentali più lunghi avrebbero potuto portare ad un'ulteriore maturazione del tessuto rigenerato oppure ad un suo progressivo deterioramento. Tuttavia riteniamo che il controllo dell'ambiente articolare sia più importante nelle fasi immediatamente successive all'impianto quando la reazione infiammatoria scatenata dalla lesione stessa e dal trauma chirurgico è molto più intensa. Il controllo del microambiente articolare dovrebbe consentire lo sviluppo di un rigenerato più maturo e pertanto più duraturo nel tempo.

Il completamento dei risultati con le valutazioni microtomografiche potrà fornire ulteriori elementi di analisi e di discussione.

La rigenerazione del tessuto cartilagineo è ancora elusiva. Nonostante i notevoli progressi e le interessanti prospettive dell'ingegneria tissutale un trattamento definitivo non è ancora disponibile.

La stimolazione biofisica rappresenta una terapia non invasiva e priva di effetti collaterali, in grado di migliorare la qualità istologica del tessuto rigenerato dopo intervento chirurgico di medicina rigenerativa.

# CONCLUSIONI

A differenza del tessuto osseo la rigenerazione della cartilagine rimane una sfida ancora aperta.<sup>111</sup>

L'intervento chirurgico di medicina rigenerativa scatena esso stesso una risposta infiammatoria, che rappresenta un elemento potenzialmente negativo sia per la cartilagine articolare che per il costrutto bioingegnerizzato e può pertanto esitare in risultati clinici contrastanti. I risultati delle ricerche *in vitro* e *in vivo* così come studi clinici di livello I, suggeriscono come la stimolazione biofisica con CEMP occupi un posto di rilievo per ottimizzare il successo delle tecniche di medicina rigenerativa.

Una road map per l'ingegneria tessutale funzionale dovrebbe prevedere l'impiego della stimolazione biofisica dopo l'impianto di un costrutto (figura 12) con un duplice obiettivo: proteggerlo dagli effetti catabolici delle citochine pro-infiammatorie e stimolare le attività anaboliche delle cellule trapiantate e della cartilagine circostante.

# BIBLIOGRAFIA

1. Emans, P.J., van Rhijn, L.W., Welting, T.J., Cremers, A., Wijnandsa, N., Spaapen, F., Vonckenb, J.W., and Shastric, V. P. Autologous engineering of cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 3418, 2010.
2. Vijayan, S., Bentley, G., Briggs, T.W.R., Skinner, J.A., Carrington, R.W.J., Pollock, R., and Flanagan, A.M. Cartilage repair: A review of stanmore experience in the treatment of osteochondral defects in the knee with various surgical techniques. *Indian J Orthop* 44, 238, 2010.
3. Ramsey, D.K., and Russell, M.E. Unloader braces for medial compartment knee osteoarthritis: implications on mediating progression. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach* 1, 416, 2009.
4. Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., and Halpern, M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 89, 780, 2007.
5. Redman, S.N., Oldfield, S.F., and Archer, C.W. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9, 23, 2005.
6. Ahmed, T.A., and Hincke, M.T. Strategies for Articular Cartilage Lesion Repair and Functional Restoration. *Tissue Eng Part B* 16, 305, 2010.
7. Giannini, S., Buda, R., Cavallo, M., Ruffilli, A., Cenacchi, A., Cavallo, C., and Vannini, F. Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury* 41, 1196, 2010.

8. Hing, K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 362, 2821, 2004.
9. Byung-Soo, K., In-Kyu, P., Takashi, H., Hu-Lin, J., Yun-Jaie, C., Toshiro, A., et al. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 36, 238, 2011.
10. Becerra, J., Andrades, J.A., Guerado, E., Zamora-Navas, P., López-Puertas, J.M., and Reddi, A.H. Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 617, 2010.
11. Butler, D.L., Goldstein, S.A., and Guilak, F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng* 122, 570, 2000.
12. Butler, D.L., Shearn, J.T., Juncosa, N., Dressler, M.R., and Hunter, S.A. Functional tissue engineering parameters toward designing repair and replacement strategies. *Clin Orthop Relat Res* S190 Suppl 427, 2004.
13. Butler, D.L., Juncosa-Melvin, N., Boivin, G.P., Galloway, M.T., Shearn, J.T., Gooch, C., and Awad, H. Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *J Orthop Res* 26, 1, 2008.
14. Getgood, A., Brooks, R., Fortier, L., and Rushton, N. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? *J Bone Joint Surg Br* 91, 565, 2009.

15. Schlegel, W., Nurnberger, S., Hombauer, M., Albrecht, C., Vecsei, V., and Marlovits, S. Scaffold-dependent differentiation of human articular chondrocytes. *Int J Mol Med* 22, 691, 2008.
16. Martin, I., Baldomero, H., Tyndall, A., Niederwieser, D., and Gratwohl, A. A Survey on Cellular and Engineered Tissue Therapies in Europe in 2008. *Tissue Eng Part A* 10, 2419, 2010.
17. Pelttari, K., Wixmerten, A., and Martin, I. Do we really need cartilage tissue engineering?. *Swiss Med Wkly* 139, 602, 2009.
18. Aulthouse, A.L., Beck, M., Griffey, E., Sanford, J., Arden, K., Machado, M.A., and Horton, W.A. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 659, 1989.
19. Francioli, S., Cavallo, C., Grigolo, B., Martin, I., and Barbero, A. Engineered Cartilage Maturation Regulates Cytokine Production and Interleukin-1b Response. *Clin Orthop Relat Res* 469, 2773, 2011.
20. Timmins, N.E., Scherberich, A., Früh, J.A., Heberer, M., Martin, I. and Jakob, M. Three-Dimensional Cell Culture and Tissue Engineering in a T-CUP (Tissue Culture Under Perfusion). *Tissue Eng* 13, 2021, 2007.
21. Lisignoli, G., Cristino, S., Piacentini, A., Zini, N., Noël, D., Jorgensen, C., and Facchini, A. Chondrogenic differentiation of murine and human mesenchymal stromal cells in a hyaluronic acid scaffold: differences in gene expression and cell morphology. *J Biomed Mater Res A* 77, 497, 2006.

22. Cristino, S., Piacentini, A., Manferdini, C., Codeluppi, K., Grassi, F., Facchini, A., and Lisignoli, G. Expression of CXC chemokines and their receptors is modulated during chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells grown in three-dimensional scaffold: evidence in native cartilage. *Tissue Eng Part A* 14, 97, 2008.
23. Richter, W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med* 266, 390, 2009.
24. Mannello, F., Tonti, F., Bagnara, G.P., and Papa, S. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 475, 2006.
25. Bertram, H., Boeuf, S., Wachters, J., Boehmer, S., Heisel, C., Hofmann, M.W., Piecha, D., and Richter, W. Matrix metalloprotease inhibitors suppress initiation and progression of chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Stem Cells Dev* 18, 881, 2009.
26. Ströbel, S., Loparic, M., Wendt, D., Schenk, A.D., Candrian, C., Raija, L.P., Lindberg, R.L.P., Moldovan, F., Barbero, and A., Martin, I. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther* 12, R34, 2010.
27. Wernike, E., Li, Z., Alini, M., and Grad, S. Effect of reduced oxygen tension and long-term mechanical stimulation on chondrocyte-polymer constructs. *Cell Tissue Res* 331, 473, 2008.

28. Trindade, M.C., Shida, J., Ikenoue, T., Lee, M.S., Lin, E.Y., Yaszay, B., Yerby, S., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L. Intermittent hydrostatic pressure inhibits matrix metalloproteinase and pro-inflammatory mediator release from human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 729, 2004.
29. Angele, P., Yoo, J.U., Smith, C., Mansour, J., Jepsen, K.J., Nerlich, M., Johnstone, B. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 21, 451, 2003.
30. Miyanishi, K., Trindade, M.C., Lindsey, D.P., Beaupré, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L. Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. *Tissue Eng* 12, 1419, 2006.
31. Tanimoto, K., Kitamura, R., Tanne, Y., Kamiya, T., Kunimatsu, R., Yoshioka, M., Tanaka, N., Tanaka, E., and Tanne, K. Modulation of hyaluronan catabolism in chondrocytes by mechanical stimuli. *J Biomed Mater Res A* 93, 373, 2010.
32. Wescoe, K.E., Schugar, R.C., Chu, C.R., and Deasy, B.M. The role of biochemical and biophysical environment in chondrogenic stem cell differentiation assay and cartilage tissue engineering. *Cell Biochem Biophys* 52, 85, 2008.

33. Lima, E.G., Tan, A.R., Tai, T., Bian, L., Stoker, A.M., Athesian, G.A., Cook, J.L., and Hung, C.T. Differences in Interleukin-1 Response Between Engineered and Native Cartilage. *Tissue Eng Part A* 14, 1721, 2008.
34. Bigoni, M., Sacerdote, P., Turati, M., Franchi, S., Gandolla, M., Gaddi, D., Moretti, S., Munegato, D., Augusti, C.A., Bresciani, E., Omeljaniuk, R.J., Locatelli, V., Torsello, A. Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury. *J Orthop Res*. 2012. doi: 10.1002/jor.22208. [Epub ahead of print]
35. Berg, E.E., Pollard, M.E., Kang, Q. Interarticular bone tunnel healing. *Arthroscopy* 17, 189, 2001 .
36. Sellam, J., Berenbaum, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 625, 2010.
37. Tanzil, G.S. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Ann Anat* 191, 325, 2009.
38. Pujol, J.P., Chadjichristos, C., Legendre, F., Bauge, C., Beauchef, G., Andriamanalijaona, R., Galera, P., and Boumediene, K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect Tissue Res* 49, 293, 2008.
39. Wood, D.D., Ihrie, E.J., Dinarello, C.A., and Cohen, P.L. Isolation of an interleukin-1 like factor from human joint effusions. *Arthr. Rheum* 26, 975, 1983.

40. Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J. Evidence for the involvement of interleukin-1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID. *J Rheumatol* 16, 19, 1989.
41. Farahat, M.N., Yanni, G., Poston, R., and Panayi, G.S. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and ostoarthritis. *Ann Rheum Dis* 52, 870, 1993.
42. Lotz, M.K., Kraus, V.B. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res Ther* 12, 211, 2010.
43. Lohmander, L.S., Dahlberg, L., Eyre, D., Lark, M., Thonar, E.J.M.A., and Ryd L. Longitudinal and cross-sectional variability in markers of joint metabolism in patients with knee pain and articular cartilage abnormalities. *Osteoarthritis Cartilage* 6, 351, 1998.
44. Schmal, H., Mehlorn, A., Stoffel, F., Kostler, W., Sudkamp, N.P., and Niemeyer, P. In vivo quantification of intraarticular cytokines in knee during natural and surgically induced cartilage repair. *Cytotherapy* 11, 1065, 2009.
45. Wehling, N., Palmer, G.D., Pilapil, C., Liu, F., Wells, J.W., Müller, P.E., Evans, C.H., and Porter, R.M. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum* 60, 801, 2009.

46. Sakai, A., Suzuki, K., Nakamura, T., Norimura, T., and Tsuchiya, T. Effects of pulsing electromagnetic fields on cultured cartilage cells. *Int Orthop* 15, 341, 1991.
47. Pezzetti, F., De Mattei, M., Caruso, A., Cadossi, R., Zucchini, P., Carinci, F., Traina, V., and Sollazzo, V. Effects of Pulsed Electromagnetic Fields on Human Chondrocytes: An In Vitro Study. *Calcif Tissue Int* 65, 396, 1999.
48. De Mattei, M., Caruso, A., Pezzetti, F., Pellati, A., Stabellini, G., Sollazzo, V., Traina, G.C. Effects of pulsed electromagnetic fields on human articular chondrocyte proliferation. *Connect Tissue Res* 42, 269, 2001.
49. Fioravanti, A., Nerucci, F., Collodel, G., Markoll, R., and Marcolongo, R. Biochemical and morphological study of human articular chondrocytes cultivated in the presence of pulsed signal therapy. *Ann Rheum Dis* 61, 1032, 2002.
50. De Mattei, M., Pasello, M., Pellati, A., Stabellini, G., Massari, L., Gemmati, D., and Caruso, A. Effects of electromagnetic fields on proteoglycan metabolism of bovine articular cartilage explants. *Connect Tissue Res* 44, 154, 2003.
51. De Mattei, M., Pellati, A., Pasello, M., Ongaro, A., Setti, S., Massari, L., Gemmati, D., and Caruso, A. Effects of physical stimulation with

electromagnetic field and insulin growth factor-I treatment on proteoglycan synthesis of bovine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 793, 2004.

52. Bobacz, K., Graninger, W.B., Amoyo, L., and Smolen, J.S. Effect of pulsed electromagnetic fields on proteoglycan biosynthesis of articular cartilage is age dependent. *Ann Rheum Dis* 65, 949, 2006.

53. De Mattei, M., Fini, M., Setti, S., Ongaro, A., Gemmati, D., Stabellini, G., Pellati, A., and Caruso, A. Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 163, 2007.

54. Jahns, M.E., Lou, E., Durdle, N.G., Bagnall, K., Raso, V.J., Cinats, D., Barley, R.D., Cinats, J., and Jomha, N.M. The effect of pulsed electromagnetic fields on chondrocyte morphology. *Med Biol Eng Comput* 45, 917, 2007.

55. Stolfa, S., Skorvánek, M., Stolfa, P., Rosocha, J., Vasko, G., and Sabo, J. Effects of static magnetic field and pulsed electromagnetic field on viability of human chondrocytes in vitro. *Physiol Res* 56 Suppl 1, S45, 2007.

56. Nicolin, V., Ponti, C., Baldini, G., Gibellini, D., Bortul, R., Zweyer, M., Martinelli, B., and Narducci, P. In vitro exposure of human chondrocytes to pulsed electromagnetic fields. *Eur J Histochem* 51, 203, 2007.

57. Varani, K., De Mattei, M., Vincenzi, F., Gessi, S., Merighi, S., Pellati, A., Ongaro, A., Caruso, A., Cadossi, R., and Borea, P.A. Characterization of adenosine receptors in bovine chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes exposed to low frequency low energy pulsed electromagnetic fields. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 292, 2008.
58. Schmidt-Rohlfing, B., Silny, J., Woodruff, S., and Gavenis, K. Effects of pulsed and sinusoid electromagnetic fields on human chondrocytes cultivated in a collagen matrix. *Rheumatol Int* 28, 971, 2008.
59. Chang, C.H., Loo, S.T., Liu, H.L., Fang, H.W., and Lin, H.Y. Can low frequency electromagnetic field help cartilage tissue engineering? *J Biomed Mater Res A* 92, 843, 2010.
60. Ongaro, A., Pellati, A., Masieri, F.F., Caruso, A., Setti, S., Cadossi, R., Biscione, R., Massari, L., Fini, M., and De Mattei, M. Chondroprotective effects of pulsed electromagnetic fields on human cartilage explants. *Bioelectromagnetics* 32, 543, 2011.
61. Chang, S.H., Hsiao, Y.W., and Lin, H.Y. Low-frequency electromagnetic field exposure accelerates chondrocytic phenotype expression on chitosan substrate. *Orthopedics* 34, 20, 2011.
62. Ongaro, A., Varani, K., Masieri, F.F., Pellati, A., Massari, L., Cadossi, R., Vincenzi, F., Borea, P.A., Fini, M., Caruso, A., and De Mattei, M.

Electromagnetic fields (EMFs) and adenosine receptors modulate prostaglandin E(2) and cytokine release in human osteoarthritic synovial fibroblasts. *J Cell Physiol* 227, 2461, 2012.

63. Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklemler Hastalik Cerrahisi* 21, 2, 2010.

64. De Mattei, M., Varani, K., Masieri, F.F., Pellati, A., Ongaro, A., Fini, M., Cadossi, R., Vincenzi, F., Borea, P.A., and Caruso, A. Adenosine analogs and electromagnetic fields inhibit prostaglandin E2 release in bovine synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 252, 2009.

65. Benazzo, F., Cadossi, M., Cavani, F., Fini, M., Giavaresi, G., Setti, S., Cadossi, R., and Giardino, R. Cartilage repair with osteochondral autografts in sheep: effect of biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields. *J Orthop Res* 26, 631, 2008.

66. Gessi, S., Merighi, S., Fazzi, D., Stefanelli, A., Varani, K., and Borea, P.A. Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opin Investig Drugs* 20, 1591, 2011.

67. Gessi, S., Merighi, S., Varani, K., and Borea, P.A. Adenosine receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 61, 41, 2011.

68. Burnstock, G. Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci (Elite Ed)* 3, 896, 2011.

69. Borea, P.A., Gessi, S., Bar-Yehuda, S., and Fishman, P. A3 adenosine receptor: pharmacology and role in disease. *Handb Exp Pharmacol* 193, 297, 2009.
70. Varani, K., Vincenzi, F., Tosi, A., Targa, M., Masieri, F.F., Ongaro, A., De Mattei, M., Massari, and L., Borea, P.A. Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes. *Br J Pharmacol* 160, 101, 2010.
71. Gomez, G., and Sitkovsky, M.V. Targeting G protein-coupled A2a adenosine receptors to engineer inflammation in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 410, 2003.
72. Forrest, C.M., Harman, G., McMillan, R.B., Stoy, N., Stone, T.W., and Darlington, L.G. Modulation of cytokine release by purine receptors in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 23, 89, 2005.
73. Kreth, S., Kaufmann, I., Ledderose, C., Luchting, B., and Thiel, M. Reduced ligand affinity leads to an impaired function of the adenosine A2A receptor of human granulocytes in sepsis. *Cell Mol Med* 13, 985, 2009.
74. Wang, C.T., Lin, Y.T., Chiang, B.L., Lin, Y.H., and Hou, S.M. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1237, 2006.

75. Lee, J.Y., Jhun, B.S., Oh, Y.T., Lee, J.H., Choe, W., Baik, H.H., Ha, J., Yoon, K.S., Kim, S.S., and Kang, I. Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF-kappaB activation in murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett* 396, 1, 2006.
76. Martin, L., Pingle, S.C., Hallam, D.M., Rybak, L.P., and Ramkumar, V. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 71, 2006.
77. Varani, K., Vincenzi, F., Tosi, A., Targa, M., Masieri, F.F., Ongaro, A., De Mattei, M., Massari, L., and Borea, P.A. Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes. *Br J Pharmacol* 160, 101, 2010.
78. Shakibaei, M., John, T., Schulze-Tanzil, G., Lehmann, I., Mobasheri, A. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 73, 1434, 2007.

79. Csaki, C., Keshishzadeh, N., Fischer, K., Shakibaei, M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 75, 677, 2008.
80. Marcu, K.B., Otero, M., Olivotto, E., Borzì, R.M., Goldring, M.B. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets* 11, 599, 2010.
81. Roman-Blas, J.A., Jimenez, S.A. NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 839, 2006.
82. Tesch, A.M., MacDonald, M.H., Kollias-Baker, C., and Benton, H.P. Chondrocytes respond to adenosine via A2 receptors and activity is potentiated by an adenosine deaminase inhibitor and a phosphodiesterase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 34, 2002.
83. Tesch, A.M., MacDonald, M.H., Kollias-Baker, C., and Benton, H.P. Endogenously produced adenosine regulates articular cartilage matrix homeostasis: enzymatic depletion of adenosine stimulates matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 349, 2004.
84. Varani, K., Massara, A., Vincenzi, F., Tosi, A., Padovan, M., Trotta, F, and Borea, P.A. Normalization of A2A and A3 adenosine receptor up-regulation in rheumatoid arthritis patients by treatment with anti-tumor necrosis factor alpha but not methotrexate. *Arthritis Rheum* 60, 2880, 2009.

85. Cohen, S.B., Leo, B.M., Baer, G.S., Turner, M.A., Beck, G., and Diduch, D.R. An adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist reduces interleukin-8 expression and glycosaminoglycan loss following septic arthrosis. *J Orthop Res* 23, 1172, 2005.
86. Montesinos, M.C., Desai, A., Chen, J.F., Yee, H., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S., and Cronstein, B.N. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A<sub>2A</sub> receptors. *Am J Pathol* 160, 2009, 2002.
87. Chiabrera, A., Bianco, B., Moggia, E., and Kaufman, J.J. Zeeman-Stark modeling of the RF EMF interaction with ligand binding. *Bioelectromagnetics* 21, 312, 2000.
88. Varani, K., Vincenzi, F., Targa, M., Corciulo, C., Fini, M., Setti, S., Cadossi, R., and Borea, P.A. Effect of Pulsed Electromagnetic Field Exposure on Adenosine Receptors in Rat Brain. *Bioelectromagnetics* [Epub ahead of print], 2011.
89. Varani, K., Gessi, S., Merighi, S., Iannotta, V., Cattabriga, E., Spisani, S., Cadossi, R., and Borea, P.A. Effect of low frequency electromagnetic fields on A<sub>2A</sub> adenosine receptors in human neutrophils. *Br J Pharmacol* 136, 57, 2002.
90. Varani, K., Gessi, S., Merighi, S., Iannotta, V., Cattabriga, E., Pancaldi, C., Cadossi, R., and Borea, P.A. Alteration of A<sub>3</sub> adenosine receptors in

human neutrophils and low frequency electromagnetic fields. *Biochem Pharmacol* 66, 1897, 2003.

91. Varani, K., De Mattei, M., Vincenzi, F., Gessi, S., Merighi, S., Pellati, A., Ongaro, A., Caruso, A., Cadossi, R., and Borea, P.A. Characterization of adenosine receptors in bovine chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes exposed to low frequency low energy pulsed electromagnetic fields. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 292, 2008.

92. Ciombor, McK., Aaron, R. K., Wang, S., and Simon, B. Modification of osteoarthritis by pulsed electromagnetic field—a morphological study. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 455, 2003.

93. Fini, M., Giavaresi, G., Carpi, A., Nicolini, A., Setti, S., Giardino, R. Effects of pulsed electromagnetic fields on articular hyaline cartilage:review of experimental and clinical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 388, 2005.

94. Fini, M., Torricelli, P., Giavaresi, G., Nicoli Aldini, N., Cavani, F., Setti, S., Nicolini, A., Carpi, A., e Giardino, R. Effect of pulsed electromagnetic field stimulation on knee cartilage, subchondral and epyphiseal trabecular bone of aged Dunkin Hartley guinea pigs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62, 709, 2008.

95. Aaron, R.K., Boyan, B.D., Ciombor, D.M., Schwartz, Z., and Simon, B.J. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* 419, 30, 2004.

96. Aaron, R.K., Wang, S., and Ciombor, D.M. Upregulation of basal TGFbeta1 levels by EMF coincident with chondrogenesis--implications for skeletal repair and tissue engineering. *J Orthop Res* 20, 233, 2002.
97. Benthien, J.P., Schwaninger, and M., Behrens, P. We do not have evidence based methods for the treatment of cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19, 543, 2011.
98. Fini, M., Giavaresi, G., Carpi, A., Nicolini, A., Setti, S., and Giardino, R. Effects of pulsed electromagnetic fields on articular hyaline cartilage: review of experimental and clinical studies. *Biomed Pharmacother* 59, 388, 2005.
99. Sollazzo, V., Palmieri, A., Pezzetti, F., Massari, L., and Carinci, F. Effects of pulsed electromagnetic fields on human osteoblastlike cells (MG-63): a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 468, 2260, 2010.
100. Boopalan, P.R.J.V.C., Arumugam, S., Livingston, A., Mohanty, M., and Chittaranjan, S. Pulsed electromagnetic field therapy results in healing of full thickness articular cartilage defect. *Int Orthop* 35, 143, 2011.
101. Zorzi, C., Dall'Oca, C., Cadossi, R., and Setti, S. Effects of pulsed electromagnetic fields on patients' recovery after arthroscopic surgery: prospective, randomized and double-blind study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15, 830, 2007.

102. Benazzo, F., Zanon, G., Pederzini, L., Modonesi, F., Cardile, C., Falez, F., Ciolli, L., La Cava, F., Giannini, S., Buda, R., Setti, S., Caruso, G., and Massari, L. Effects of biophysical stimulation in patients undergoing arthroscopic reconstruction of anterior cruciate ligament: prospective, randomized and double blind study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16, 595, 2008.
103. Massari, L., Cadossi, R., Traina, G.C., and study group CRES. Impiego della stimolazione biofisica per l'osteogenesi riparativa e per la condroprotezione articolare. *G.I.O.T.* 34, S171, 2008.
104. Hildebrand, T., Ruegsegger, P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comp Meth Biomech Biomed Eng* 1, 15, 1997.
105. Harris, J.D., Siston, R.A., Pan, X., and Flanigan, D.C. Autologous Chondrocyte Implantation: A Systematic Review. *J Bone Joint Surg Am* 92, 2220, 2010.
106. Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R.J., Kreuz, P.C., Mandelbaum, B.R., *Am J Sports Med* 37, 2053, 2009.
107. Lietman, S.A., Miyamoto, S., Brown, P.R., Inoue, N., and Reddi, A.H. The temporal sequence of spontaneous repair of osteochondral defects in the knee of rabbits is dependent on the geometry of the defect. *J Bone Joint Surg Br* 84, 600, 2002.

108. Ongaro, A., Pellati, A., Setti, S., Masieri, F.F., Aquila, G., Fini, M., Caruso, A., and De Mattei, M. Electromagnetic fields counteract IL-1 $\beta$  activity during chondrogenesis of bovine mesenchymal stem cells. *J Tissue Regen Med* 17, 2012.
109. Derby, D. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science* 338, 16, 2012.
110. Mironov, V., Reis, N., Derby, B. Review: Bioprinting: a beginning. *Tissue Eng* 12, 4, 2006.
111. Huey, D.J., Hu, J.C., Athanasiou, K.A. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* 338, 16, 2012.

# ICONOGRAFIA

Figura 1A.

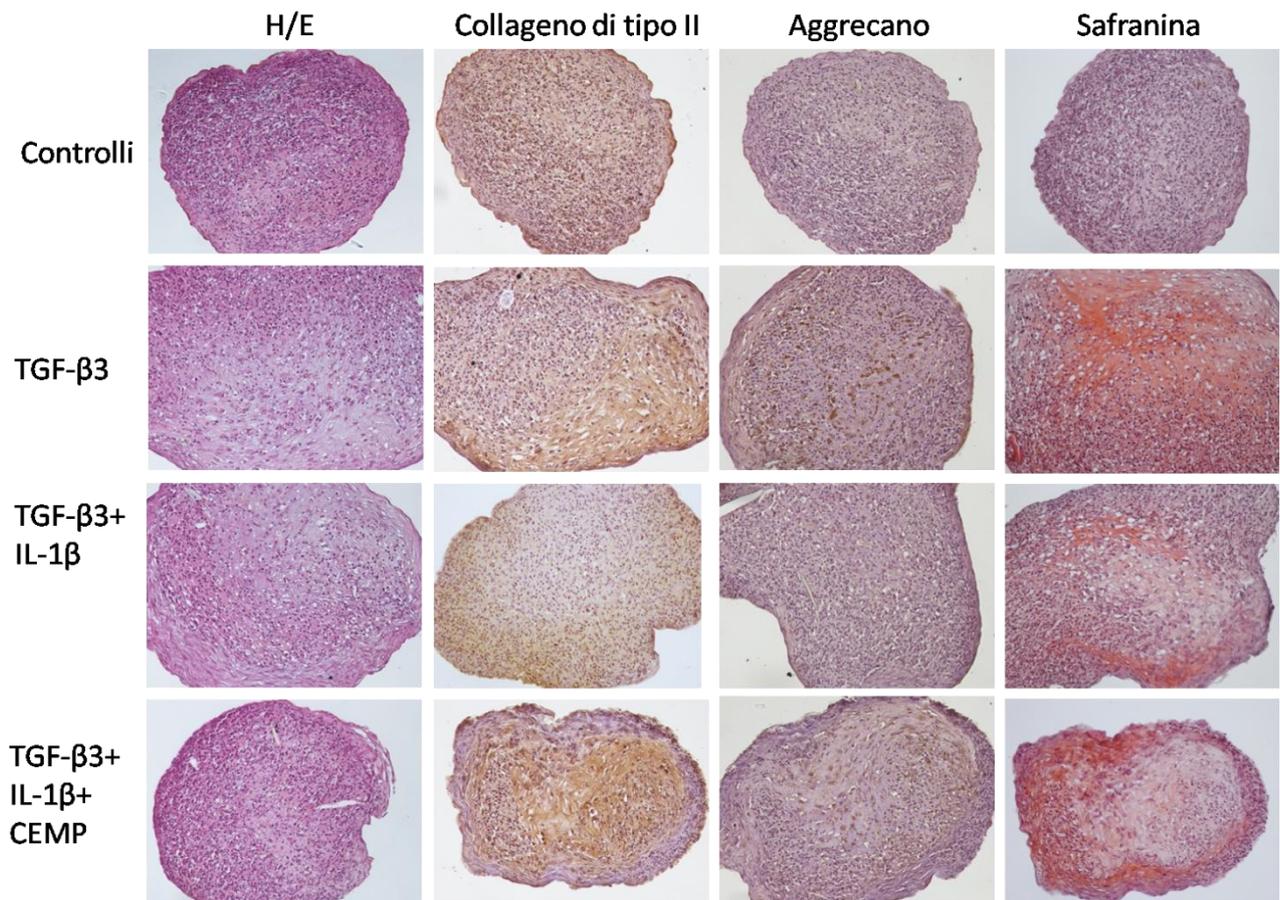


Figura 1B.

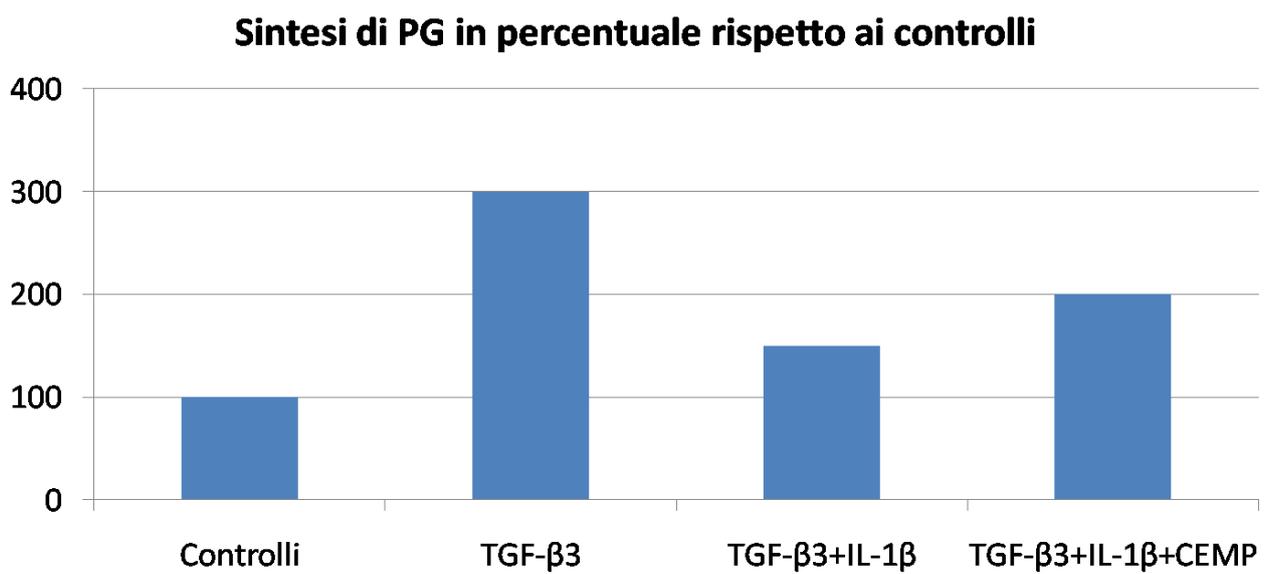


Figura 1: Effetto dei CEMP sulla differenziazione in senso condrocitario di MSC umane coltivate su piastre in presenza di IL-1 $\beta$ .

A: Risultati istologici. H/E: ematossilina/eosina; l'aggrecano e il collagene di tipo II sono stati valutati immunohistochimicamente; I PG sono stati colorati con safranina.

B: Risultati biochimici. Sintesi di PG valutata mediante l'incorporazione di solfato radioattivo nei GAGs. Controlli: colture in assenza di TGF- $\beta$ 3 e IL-1 $\beta$ . TGF- $\beta$ 3: colture in presenza di 10ng/ml di TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$ 3+IL-1 $\beta$ : colture in presenza di 10ng/ml di TGF- $\beta$ 3 e 0.1ng/ml di IL-1 $\beta$ . TGF- $\beta$ 3+IL-1 $\beta$ +CEMP: colture in presenza di 10ng/ml di TGF- $\beta$ 3, 0.1ng/ml di IL-1 $\beta$  ed esposizione a CEMP durante l'ultima settimana del periodo di differenziazione. Le differenze sono statisticamente significative.

Figura 2.

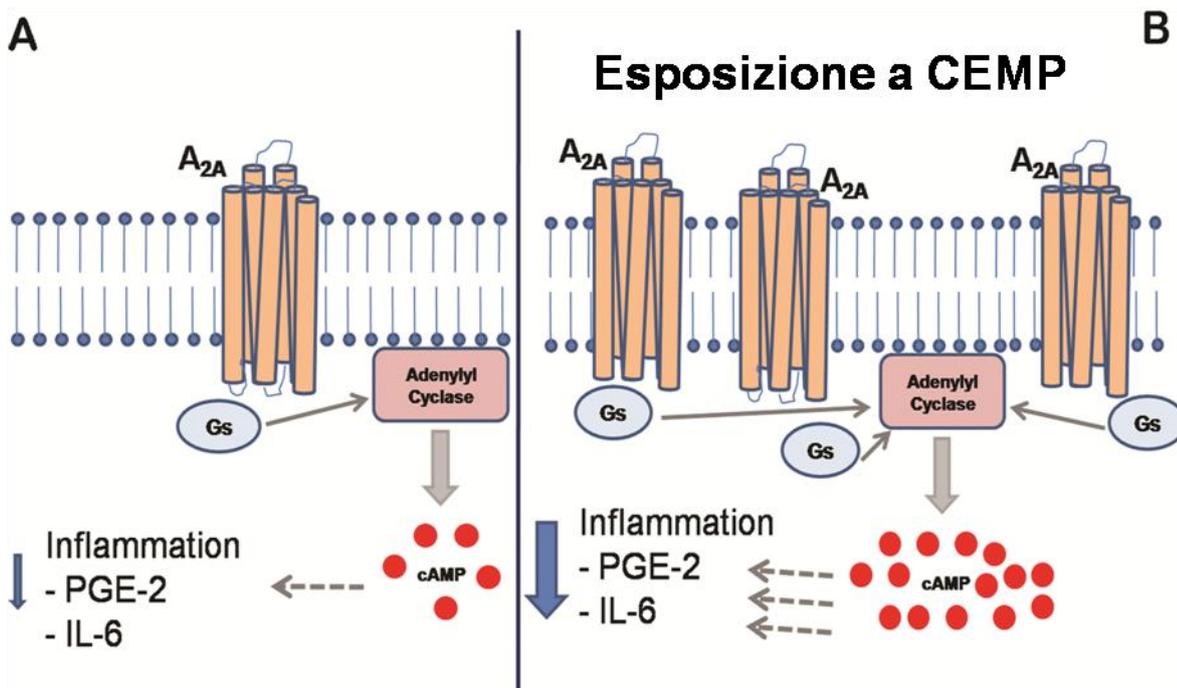


Figura 2: Effetto dell'esposizione a CEMP sui recettori adenosinici A<sub>2A</sub>.

A: Recettori adenosinici A<sub>2A</sub> sulla membrana cellulare.

B: Up-regolazione dei recettori adenosinici A<sub>2A</sub> dopo stimolazione con CEMP e conseguente accumulo di AMP ciclico intracellulare.

Figura 3.

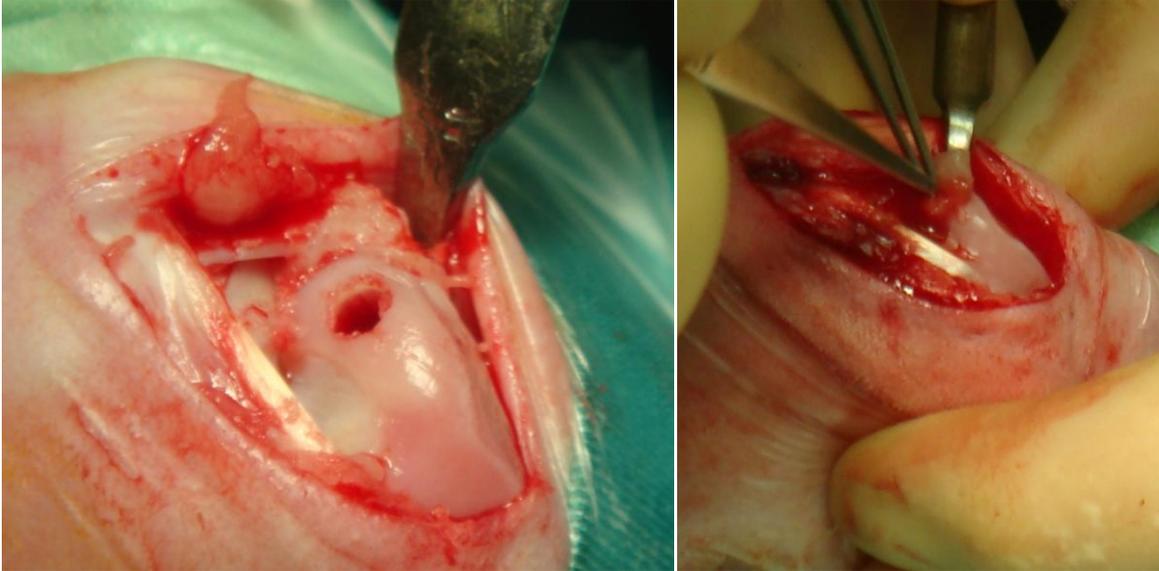


Figura 3: A sinistra lesione osteocondrale critica nel condilo femorale mediale di un coniglio. A destra trattamento mediante TCMM su scaffold.

Figura 4.



Figura 4: Animali in terapia con CEMP in gabbie adibite alla stimolazione biofisica. Si notino i solenoidi in verde all'esterno delle gabbie.

Figura 5.

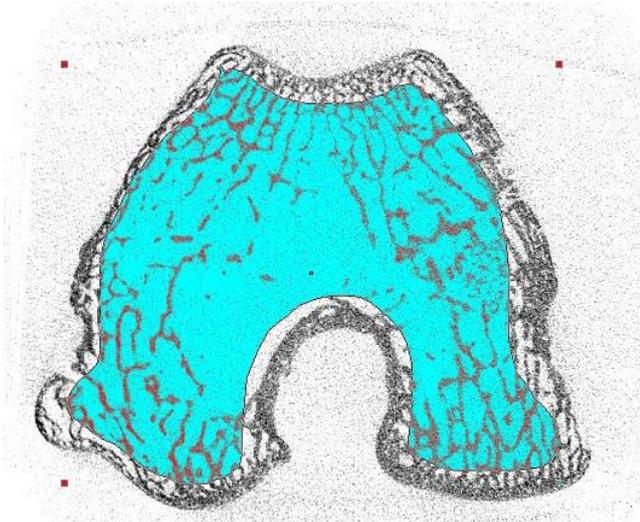


Figura 5: Sezione microtomografica assiale di un campione. In azzurro è evidenziata la zona in cui sono stati calcolati alcuni dei parametri e che costituisce, lungo tutte le sezioni, il volume d'interesse considerato.

Figura 6.

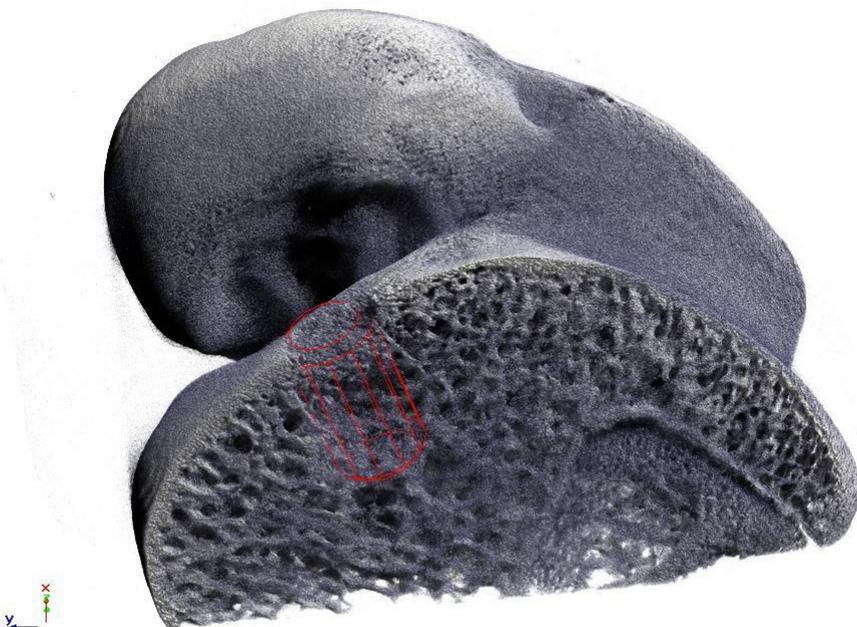


Figura 6: Ricostruzione 3D di un campione. In rosso il volume di interesse della lesione osteocondrale utilizzato per calcolare DBV/TV.

Figura 7.



Figura 7: Artrofibrosi massiva a seguito di lussazione della rotula.

Figura 8.



Figura 8: Animale esposto a stimolazione biofisica. A sinistra tessuto di riparazione nel CFM in una lesione lasciata a guarigione spontanea. A destra miglior guarigione della lesione mediante TCMM su scaffold.

Figura 9.

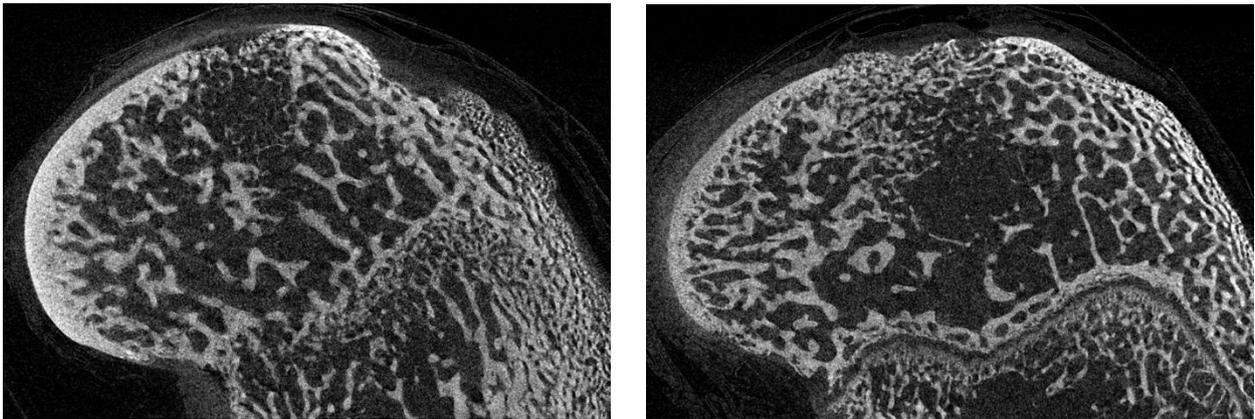


Figura 9: Immagini microtomografiche di una sezione del CFM. A sinistra si apprezza uno scarso riempimento del difetto osseo in un animale non stimolato. A destra si nota un maggior riempimento della lesione con tessuto osseo neoformato in un animale stimolato con CEMP.

Figura 10.

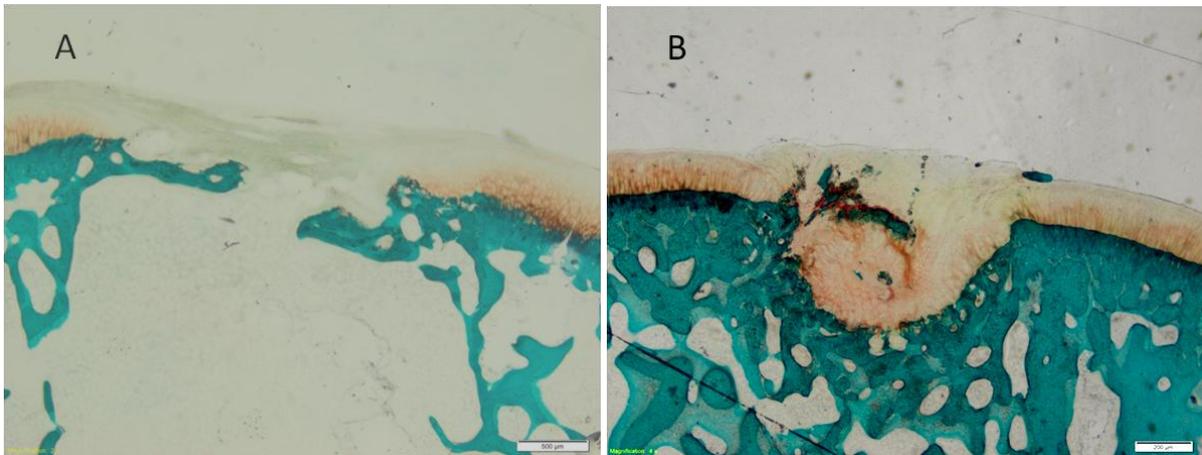


Figura 10: immagini istologiche del tessuto di riparazione (colorazione Safranina-O e Fast Green, ingrandimento 2x).

A: Lesione lasciata a guarigione spontanea in un animale non stimolato. Riempimento del difetto quasi assente. Formazione di tessuto fibrocartilagineo a livello articolare.

B: Lesione lasciata a guarigione spontanea in associazione a stimolazione biofisica. Riempimento incompleto del difetto osteocartilagineo. Il tessuto cartilagineo appare disorganizzato.

Figura 11.

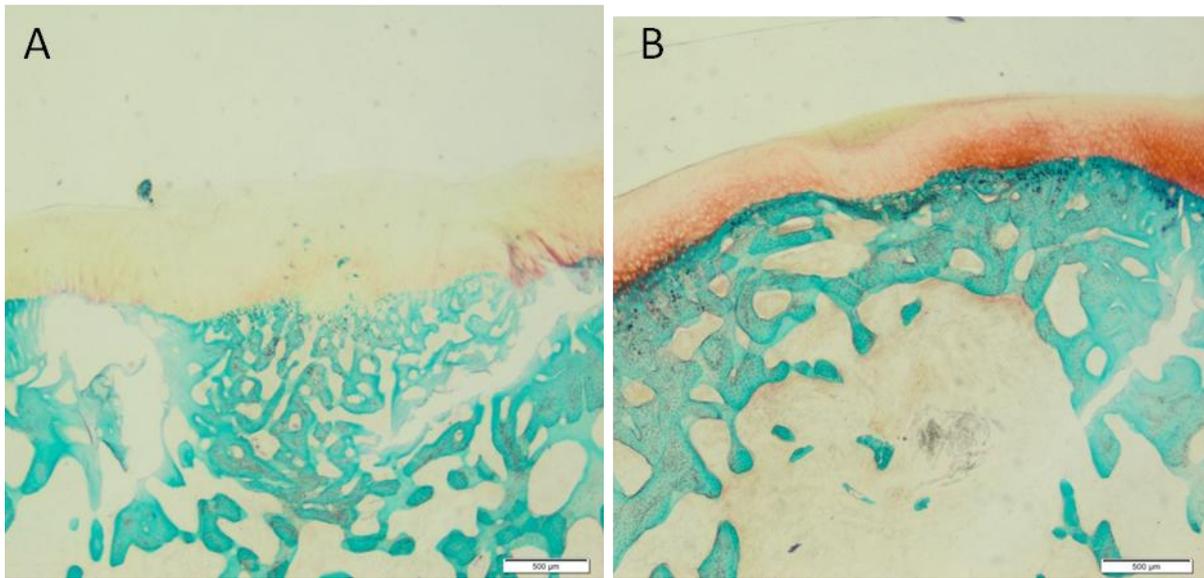


Figura 11: immagini istologiche del tessuto di riparazione (colorazione Safranina-O e Fast Green, ingrandimento 2x).

A: Lesione trattata mediante TCMM su scaffold collagenico in un animale non stimolato. Buon riempimento del difetto con scarsa colorazione della ECM.

B: Lesione trattata mediante TCMM su scaffold collagenico in associazione a stimolazione biofisica. Miglior colorazione della ECM, buon allineamento e integrazione della neocartilagine. Il tessuto osseo neoformato appare inoltre più maturo.

Figura 12.

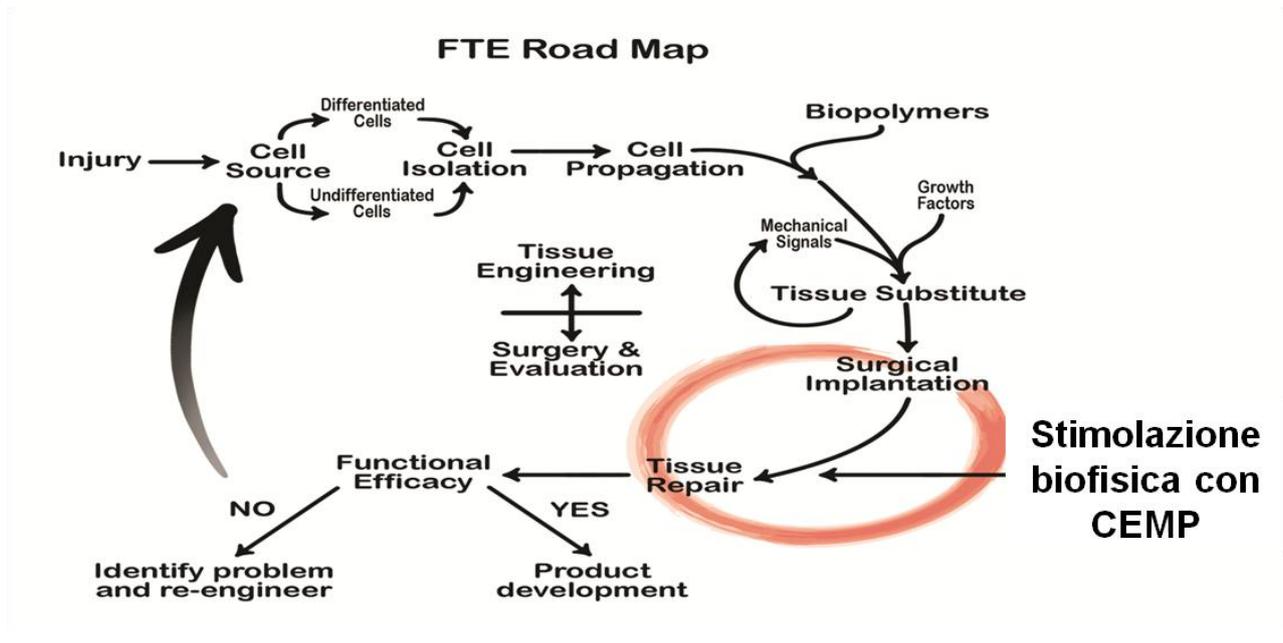


Figura 12: Posizionamento della stimolazione biofisica con CEMP nella road map dell'ingegneria tissutale. Adattamento dalla voce bibliografica 13.