

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze dello sviluppo e del movimento umano

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06-F4

Settore Scientifico disciplinare: MED/34

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI INIEZIONI PERITENDINEE DI
ACIDO IALURONICO NEL TENDINE ROTULEO DI RATTO
DISALLENATO**

Presentata da: Dott. Antonio Frizziero

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Salvatore Squatrito

Prof. Pasqualino Maietta

Esame finale anno 2013

INTRODUZIONE

Numerose condizioni quali, l'allenamento, l'invecchiamento, la carenza estrogenica e l'uso di alcuni farmaci possono influenzare le caratteristiche biologiche ed anatomo-fisiologiche del tendine e della sua entesi (Torricelli P, AGE, *in press*). Recentemente, Frizziero et al. hanno evidenziato che un'attività fisica moderata (~ 60%VO₂max) seguita da un periodo d'improvvisa interruzione (*detraining*) porta ad evidenti alterazioni a livello delle strutture collageniche e nel contenuto di proteoglicani del tendine patellare di ratto (Frizziero et al. 2011). Nonostante questi risultati, pochi studi preclinici hanno esaminato in dettaglio l'impatto che l'interruzione dell'attività fisica può avere sul tendine e sulla sua entesi. Da un punto di vista clinico esistono evidenze che suggeriscono come le lesioni del tendine e dell'entesi siano più frequenti in atleti che cambiano tipo, intensità e durata dell'allenamento.

Obiettivi della presente ricerca sono stati la valutazione dell'attività cellulare, delle caratteristiche istologiche, istomorfometriche e microstrutturali del tendine patellare e della sua entesi in condizioni di non allenamento (sedentarietà), allenamento, allenamento ed improvviso arresto dell'attività fisica. In particolare, in questo studio è stato ipotizzato che un'iniezione peri-tendinea di acido ialuronico (Hyalgan®, Fidia Farmaceutici, Abano Terme, Padova) nelle settimane successive all'improvviso arresto dell'attività fisica potesse mantenere l'integrità strutturale e biologica del tendine patellare.

MATERIALI E METODI

Studio in vivo

Lo studio è stato condotto in accordo con le leggi Europee ed Italiane sulla sperimentazione animale. Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli in data 14/01/2011 (lett.prot. 30024 del 18/11/2010) e dalle autorità pubbliche responsabili come previsto dal D.Lvo 116/92.

Per lo studio sono stati utilizzati 24 ratti Sprague Dawley maschi (Charles River Italia SpA, Lecco) di circa 8 settimane di età e di 280 ± 40 g di peso corporeo. I ratti sono stati suddivisi in tre gruppi ed allenati secondo un protocollo che ha raggiunto gradualmente nel corso di 10 settimane, approssimativamente il 60-80% VO₂max (considerando contemporaneamente le necessità sperimentali e la "compliance" dell'animale da esperimento). Più in dettaglio, i 24 ratti sono stati suddivisi in due gruppi di 6 ratti ciascuno, non allenati ed allenati, ed in un ulteriore gruppo di 12 ratti, *detrained*:

- a) gruppo Non Allenati;
- b) gruppo sottoposto ad allenamento per tre volte a settimana per 10 settimane (gruppo *Trained*);
- c) gruppo sottoposto ad allenamento per tre volte a settimana per 10 settimane con successiva stabulazione di 4 settimane senza esercizio (gruppo *Detrained*).

I ratti dei Gruppi Non Allenati ed allenati (gruppo *Trained*) sono stati sottoposti ad eutanasia al termine delle 10 settimane di stabulazione od allenamento. I ratti *Detrained* sono stati prima allenati e poi ulteriormente stabulati per

4 settimane (gruppo *Detrained*). A 6 dei 12 ratti del gruppo *Detrained*, al termine della I, II, III e IV settimana senza esercizio è stata praticata un'infiltrazione peri-tendinea a livello del tendine patellare destro, con siringa Hamilton da 500 µl e con relativo ago da 28G (Hamilton Syringe, Labocest, Bologna, Italia), di 300 µl di acido ialuronico (Hyalgan®, Fidia Farmaceutici, Abano Terme, Padova) alla concentrazione di 20mg/ 2ml (gruppo *Detrained-HA*). Nei rimanenti 6 ratti, come Gruppo di Controllo *Sham Treated*, al termine della I, II, III e IV settimana senza esercizio, a livello del tendine patellare destro, è stata praticata un'infiltrazione peri-tendinea di 300 µl di soluzione fisiologica (Fresenius Kabi, lotto A030775023) (Gruppo *Detrained-NaCl*).

La stabulazione degli animali è avvenuta presso i locali di permanenza del Laboratorio Studi Preclinici e Chirurgici, alle seguenti condizioni ambientali: temperatura 20.5 ± 0.5 °C ed umidità relativa $55 \pm 10\%$. Gli animali sono stati alimentati con 250 g/sett. di mangime di mantenimento a lungo termine (Laboratorio Dottori Piccioni SRL, Gessate, Milano) e 250 ml/sett. di acqua. Ogni settimana gli animali sono stati pesati e la quantità di cibo ed acqua rimanenti sono state misurate per poter calcolare sia l'incremento ponderale settimanale medio degli animali che il consumo medio settimanale di cibo ed acqua al termine dei periodi di training e di detraining. Gli incrementi ponderali e le variazioni di consumo di cibo ed acqua settimanali (G) sono stati calcolati applicando la media geometrica ai singoli dati di incremento e variazione settimanale (X_n) del periodo considerato:

$$G = \sqrt[n]{\frac{X_2}{X_1} + \frac{X_3}{X_2} + \dots + \frac{X_n}{X_{n-1}}}$$

Al raggiungimento del tempo sperimentale prestabilito tutti gli animali sono stati sottoposti ad anestesia generale indotta con ketamina 87 mg/kg, (Imalgene 1000, Merial Italia S.p.A, Italia) e xilazina 3 mg/kg (Rompun, Bayer S.p.A., Italia) ed a successiva eutanasia farmacologica con un'iniezione *i.v.* di Tanax (Hoechst Roussel Vet GmbH, Wiesbaden, Germany). In seguito, da entrambe le zampe posteriori, sono stati prelevati il tendine rotuleo con la rotula ed una porzione dell'entesi tibiale, i muscoli gastrocnemi e tibiali anteriori. Un segmento di tendine rotuleo contenente l'entesi tibiale è stato immediatamente fissato in formalina tamponata al 10%. La rimanente porzione di tendine rotuleo ed i muscoli gastrocnemio e tibiale anteriore sono stati immediatamente congelati in azoto liquido. In condizioni di sterilità chirurgica da due tendini destri per gruppo sperimentale, selezionati random, un frammento di tessuto tendineo è stato prelevato per la successiva coltura di tenociti in cui sono state valutate proliferazione ed attività cellulare (TEN 4 e TEN 6 per il gruppo Non Allenati; TEN8, TEN 10 per il gruppo *Trained*; TEN15, TEN17 per il gruppo *Detrained-HA*; TEN21, TEN23 per il gruppo *Detrained-NaCl*).

Le valutazioni post espianto hanno previsto l'analisi dei tendini destri dei Gruppi *Detrained* (trattati con NaCl e HA). Pertanto, pur avendo espantato e processato istologicamente anche i tendini sinistri, per omogeneità fra i Gruppi, anche per i Gruppi Non Allenati e *Trained* verranno di seguito riportati i risultati relativi ai soli tendini destri sia per quanto riguarda le analisi di biologia cellulare che di istomorfometria.

Studio in vitro

Coltura cellulare: Immediatamente dopo il prelievo, in condizioni di sterilità chirurgica, i tendini destri dei campioni TEN 4, TEN 6, TEN 8, TEN 10, TEN 15, TEN 17, TEN 21 e TEN 23 sono stati sminuzzati e lavati per 3 volte in soluzione fisiologica. I frammenti tendinei di ogni campione sono stati posti in 3 fiasche T25 con terreno HAM's F12: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (50:50) (SAFC Biosciences, Lenexa, KS, USA, lotto n 1123285), addizionato con 10% di siero bovino fetale (Lonza, Verviers, Belgium, lotto n 1SB001), 1% di penicillina-streptomina (Gibco, INVITROGEN Corporation, Carlsbad, CA, lotto n 031M0787), e 25 microgr/ml di acido ascorbico (Sigma, lotto n 121K0133). Le fiasche sono state poste in incubatore in condizioni standard (37°C, 95% di umidità e 5% CO₂) ed il terreno è stato cambiato 3 volte a settimana. Dopo circa 5 giorni di coltivazione si sono osservati i primi tenociti al microscopio ottico (Olympus IX71, Olympus Italia Srl, Italy).

Valutazioni Biologia molecolare: Le cellule di una fiasca T25, raggiunta la densità di circa $0.5 \cdot 10^6$ sono state lavate in phosphate-buffered saline (PBS) ed in seguito lisate in Trizol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, lotto n 9604801) per circa 15 minuti. Il lisato cellulare è stato prelevato e posto in una provetta sterile da 1,5 ml, conservato a -80°C e consegnato alla Prof. Marini per le valutazioni di espressione genica. (TEN 4 e 6 consegnati il 12/03/12; TEN 8, 10, 15, 17, 21, 23 consegnati il 27/09/12).

Valutazioni morfologiche e microstrutturali: A raggiungimento della confluenza (15 ± 5 giorni) (Figura 1) circa 2×10^6 cellule di una fiasca T25 sono state lavate in PBS ed immediatamente fissate in glutaraldeide 2.5% per circa 15 min. Le cellule sono state poi delicatamente staccate con uno *scraper*, raccolte in una provetta sterile da 15 ml e centrifugate a 260 g per 5 min. In seguito il fissativo è stato eliminato ed il *pellet* fissato nuovamente in glutaraldeide 2.5% per circa 60-80 min. Infine, il *pellet* è stato lavato, posto in PBS e conservato a +4°C e consegnato alla Prof. Falcieri per analisi morfologiche e microstrutturali.

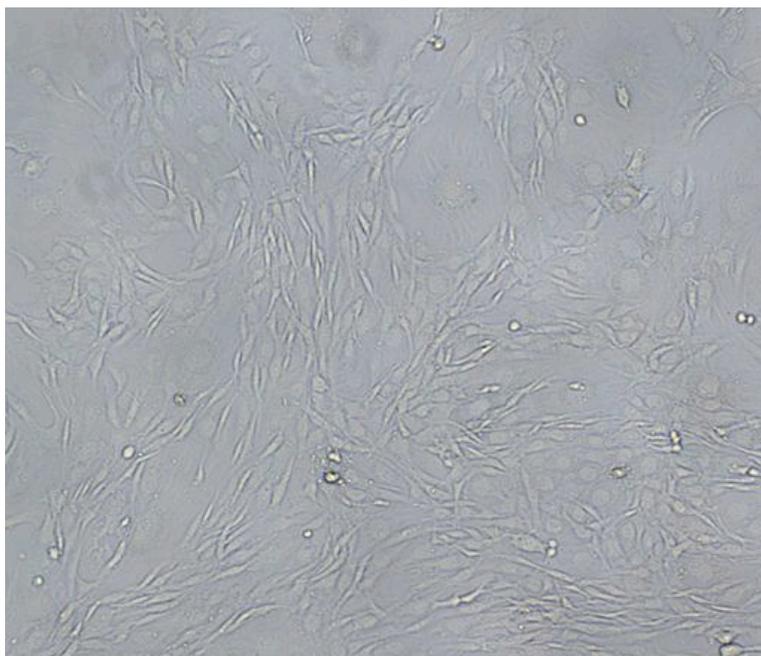


Figura 1

Proliferaazione, conta ed attività cellulare: La coltura dedicata alle prove di biologia cellulare è stata tripsinizzata e le cellule sono state contamte; 10.000 cellule per campione sono state seminate in triplicato in una piastra da 24 pozzetti per valutare vitalità e il numero di cellule a 24 e 72 ore e a 7 e 10 giorni (Figura 2).

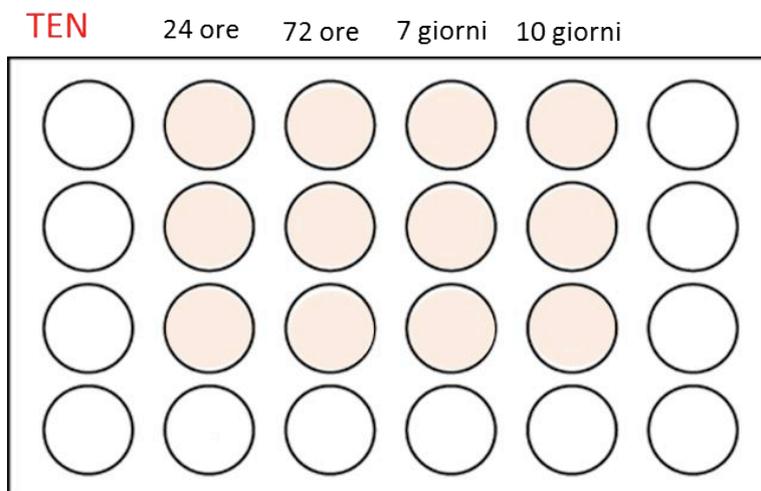


Figura 2

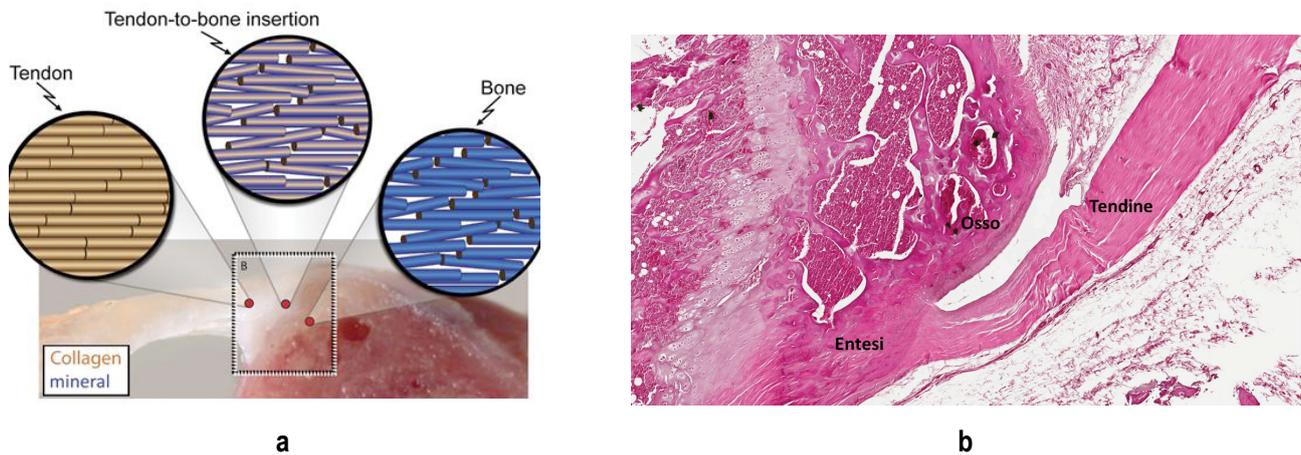
La vitalità cellulare è stata analizzata tramite test Alamar Blue secondo le istruzioni fornite dal produttore (Serotec, Oxford, United Kingdom lotto n BUF012B). L'Alamar blue è un indicatore redox colorimetrico che viene internalizzato dalle cellule, la cui riduzione è indice dell'attività metabolica e si correla con il numero di cellule vitali. I risultati del saggio, rilevati con un lettore per micropiastre (BioRad, CA, USA) utilizzando le lunghezze d'onda (λ) di 570 nm e di 590 nm, sono stati espressi come media delle assorbanze ottiche rilevate in 3 pozzetti. Inoltre, ai vari tempi sperimentali presi in esame (24 e 72 ore e a 7 e 10 giorni) il mezzo di coltura dei tenociti è stato rimosso dai pozzetti e conservato a -20°C per le valutazioni di attività cellulare: Collagene I (lotto n L120928761), Collagene III (lotto n L120928762), Fibronectina (FN) (lotto n L120928763), Aggrecani (AG), Interleuchina 1 beta (IL-1 β) (lotto n L1158305300920), Tumor Necrosis Factor alfa (TNF-α) (lotto n L120928766), Tumor Necrosis Factor β (TNF-β) (lotto n L120928767), Metalloproteinasi 1 (MMP-1) (lotto n L120928765), MMP-3 (lotto n L120928764) secondo le istruzioni fornite dal produttore (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit Uscon, Life Science Inc., Wuhan, China). Infine, la proliferazione cellulare ai vari tempi sperimentali esaminati è stata valutata attraverso conta cellulare con camera citometrica di Neubauer al microscopio ottico (Olympus IX71, Olympus Italia Srl, Italia).

Valutazione istologica ed istomorfometrica

Al termine dei tempi sperimentali prestabiliti i tendini destri e sinistri con le relative entesi sono stati prelevati, fissati in formalina tamponata al 10% per 24 ore e sciacquati in acqua distillata per eliminare l'eccesso di fissativo. In seguito, i campioni sono stati posti in soluzione decalcificante di acido formico/nitrico per circa 3-4 giorni, a seconda delle dimensioni dei campioni. Una volta verificata la completa decalcificazione del tessuto osseo tibiale, i campioni sono stati disidratati in soluzioni crescenti di alcool etilico (J.T. Baker, Capitol Scientific, Inc. Austin, TX,

lotto n BCBH2527V) dal 50% fino all'assoluto, e successivamente chiarificati attraverso 3 passaggi in xilolo (Carlo Erba Reagenti, Italia, lotto n V24476122G). Infine, i tendini sono stati inclusi in paraffina e tagliati longitudinalmente con microtomo Micron HM 340E (Micron HM 340E, Microm International GmbH, Heidelberg, Germania) ad uno spessore di $5\pm 1 \mu\text{m}$ (Figura 4).

Figura 4.



Per ogni animale sono state ottenute 20 sezioni (10 dx e 10 sx) per un totale di 400 sezioni. Tre sezioni per ogni tendine (dx e sx) sono state colorate con Ematossilina/Eosina e Picro-Sirius Red per le valutazioni istologiche (totale n. 240 sezioni). Per tutti i preparati, le valutazioni sono state condotte ad ingrandimenti di 2x, 4x, 10x, 20x e 40x, utilizzando il sistema di analisi Aperio (Aperio Scanscope CS System, Aperio Technologies, Vista, CA - USA). Tre sezioni istologiche di tendine rotuleo destro (3 per animale: 12 sezioni per i ratti Non Allenati, 12 sezioni per i ratti Trained, 12 sezioni per i ratti Detrained-NaCL e 12 sezioni per i ratti Detrained-HA), colorate con Ematossilina-Eosina, acquisite utilizzando il sistema di analisi Aperio (Aperio Scanscope CS System, Aperio Technologies, Vista, CA - USA) ad una risoluzione di $0.499 \mu\text{m} \times \text{pixel}$ e ad un ingrandimento 10x, sono state utilizzate per la valutazione della cellularità lungo la lunghezza del tendine rotuleo. La cellularità è stata quantificata tenendo conto del numero totale delle cellule all'interno dell'area totale del tendine (Silva et al. 2011).

Le stesse sezioni istologiche di tendine rotuleo destro colorate con Ematossilina-Eosina e Picrosirius Red, acquisite con videocamera digitale Olympus (Olympus XC50, Olympus Optical Co. Europa GmbH, Germania) collegata a microscopio ottico semi-automatico (Olympus BX51, Olympus Optical Co. Europa GmbH, Germania) ad ingrandimenti di 20x, sono state analizzate rispettivamente per la quantificazione dei microtears e per la percentuale di fibre collagene. Tali valutazioni sono state effettuate mediante sistema di analisi d'immagine Leica QWin standard (Leica Microsystems Ltd, Stereo and Macroscopic Systems, Switzerland).

Per quanto riguarda la quantificazione dei microtears presenti nei tendini valutati in termini di percentuale di area di microtears per area del tendine (Area Microtears/Area Tendine, %), densità di microtears (Microtears/ mm^2), dimensione media dei microtears (Microtear Size, μm^2) e distribuzione delle dimensioni dei microtears (\log Microtears/ mm^2), si è proceduto alla binarizzazione delle immagini acquisite, selezionando aree di microtears

comprese tra 3 e 300 μm^2 , in quanto quelle esterne a tale intervallo sono state considerate come artefatti da taglio (Nakama et al. 2005, Silva et al. 2011). In particolare, la distribuzione delle dimensioni dei microtears è stata effettuata raggruppando i microtears da 3 a 10 μm^2 con intervalli di 1 μm^2 , da 3 a 100 μm^2 con intervalli di 10 μm^2 , e da 3 a 300 μm^2 con intervalli di 100 μm^2 .

Per calcolare la percentuale di fibre di collagene all'interno della matrice extracellulare è stato utilizzato il colorante Picrosirius Red, un composto anionico che permette di distinguere lo spessore e la densità delle fibre di collagene attraverso la colorazione emessa sotto luce polarizzata. Mentre le fibre collagene di tipo III, appaiono di colore verde, le fibre del collagene di tipo I e II, emettono colori con lunghezza d'onda maggiore, fra il rosso ed il giallo (Junqueira et al. 1979). Immagini istologiche di tendine rotuleo destro colorate con Picrosirius Red, ad un ingrandimento di 10x, sono state analizzate utilizzando un filtro a luce polarizzata. La quantificazione delle fibre collagene è stata effettuata mediante binarizzazione dell'immagine utilizzando la scala cromatica Red-Green-Blue (RGB): il colore verde, corrispondente al collagene di tipo III, è stato definito come [R:0-115, V:55-140 e B:10-50] così come il colore rosso/giallo, corrispondente al collagene di tipo I e II [R:120-255, V:30-190 e B:0-125]. Infine, per quantificare le aree così ottenute è stata applicata la seguente formula:

Sulle stesse sezioni istologiche di tendine rotuleo destro colorate con Ematossilina-Eosina, acquisite utilizzando il sistema di analisi Aperio (Aperio Scanscope CS System, Aperio Technologies, Vista, CA - USA) ed utilizzate per valutare la cellularità, è stato applicato uno score istologico semiquantitativo al fine di determinare l'integrità della struttura e della morfologia dell'entesi rotulea. Non essendo descritti in letteratura, per quanto di conoscenza, score standardizzati riguardanti la valutazione dell'entesi, ed essendo l'entesi rotulea di origine fibrocartilaginea, nella presente ricerca sono stati adottati criteri di valutazione della cartilagine utilizzati in cinque tra i più importanti sistemi di score istologici inerenti la valutazione sperimentale della riparazione della cartilagine articolare (Orth et al. 2012). Lo score utilizzato in questo studio per la valutazione dell'entesi rotulea è riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Score istologico semiquantitativo per la valutazione della struttura e morfologia dell'entesi patellare.

| PARAMETRO | PUNTI | DESCRIZIONE |
|---|-------|--|
| Struttura entesi patellare | 0 | Normale, liscia, ininterrotta |
| | 1 | Con leggere irregolarità < del 25% |
| | 2 | Con numerose irregolarità comprese tra il 25%-50% |
| | 3 | Con completa perdita di morfologia tra il 50%-100% |
| Morfologia cellulare cartilagine calcificata | 0 | Normale cellularità (ipocellularità) |
| | 1 | Leggera ipercellularità |
| | 2 | Moderata ipercellularità |
| | 3 | Severa ipercellularità |
| Cluster di condrociti nella cartilagine calcificata | 0 | No cluster |
| | 1 | <25% di cellule |
| | 2 | 25-50% di cellule |
| | 3 | 50-100% di cellule |

| | | |
|--|---|--|
| Morfologia cellulare cartilagine non calcificata | 0 | Normale (colonne longitudinali tra fasci di collagene) |
| | 1 | Leggera ipercellularità |
| | 2 | Moderata ipercellularità |
| | 3 | Severa ipercellularità |
| Cluster di condrociti nella cartilagine non calcificata | 0 | No cluster |
| | 1 | <25% di cellule |
| | 2 | 25-50% di cellule |
| | 3 | 50-100% di cellule |
| Integrità del tidemark tra cartilagine calcificata e non | 0 | Completa |
| | 1 | 75-99% |
| | 2 | 50-75% |
| | 3 | 25-50% |
| | 4 | <25% |
| Colorazione matrice extracellulare | 0 | Normale |
| | 1 | Leggermente ridotta |
| | 2 | Significativamente ridotta |
| | 3 | Pallida |
| | 4 | Assente |
| Vascolarizzazione | 0 | Assenza di vasi |
| | 1 | Presenza di vasi |

Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati è stata condotta utilizzando il software SPSS v.12.1 (SPSS Inc, USA). I dati sono riportati come media \pm deviazione standard (DS) ed il livello massimo di significatività considerato è stato $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata condotta con test ANOVA a due vie (trattamento, tempo sperimentale). Nel caso in cui si siano osservate interazioni significative tra i due fattori sui risultati analizzati si è proceduto alla comparazione di questi utilizzando il test di Scheffé. Nel caso in cui l'analisi statistica non abbia evidenziato interazioni significative, ma soltanto l'effetto significativo dei singoli fattori sui risultati, si è proceduto ad un'analisi univariata comparando i risultati ottenuti tra i trattamenti indipendentemente dal tempo sperimentale o viceversa tra i tempi sperimentali indipendentemente dal trattamento.

RISULTATI

Studio in vitro

I risultati del test di vitalità Alamar blue e della conta cellulare sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 2 e 3 e nella Figura 5. L'analisi statistica dei risultati del test Alamar blue tra i trattamenti allo stesso tempo sperimentale (Tabella 2) ha evidenziato che a tutti i tempi, i tenociti dei gruppi *Trained* e *Detrained*-HA presentavano una

percentuale di riduzione dell'Alamar blue significativamente superiore a quella dei Non Allenati e dei *Detrained*-NaCl. In particolare, i valori più alti di riduzione si sono osservati nei tenociti del gruppo *Detrained*-HA che sono risultati significativamente superiori a quelli del gruppo *Trained* a 72 ore, 7 e 10 giorni (72 ore: $p < 0.005$, 7 e 10 giorni: $p < 0.0005$). L'analisi statistica ha evidenziato, inoltre, differenze significative tra i tempi sperimentali all'interno di uno stesso gruppo di trattamento come riportato nella Tabella 2. Infine, dalla normalizzazione dei dati della riduzione dell'Alamar Blue di ciascun gruppo di allenamento per quelli del gruppo Non Allenati, si è osservato che la vitalità cellulare dei tenociti derivati dal tendine rotuleo del gruppo *Detrained*-HA è risultata significativamente superiore a quella dei *Trained* e dei *Detrained*-NaCl ai diversi tempi sperimentali (Figura 5).

Tabella 2. Risultati del test di riduzione dell'Alamar Blue (Assorbanza) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo Non Allenati | Gruppo Trained | Gruppo Detrained NaCl | Gruppo Detrained HA |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 24 ore | 27.2 \pm 2.4 | 38.3 \pm 0.8 ^a | 18.9 \pm 6.0 ^b | 39.6 \pm 6.2 ^c |
| 72 ore | 27.8 \pm 1.5 | 48.0 \pm 2.4 ^{a,°} | 30.3 \pm 2.4 ^{d,^} | 57.1 \pm 7.2 ^{e,‡} |
| 7 gg | 24.2 \pm 1.9 | 53.5 \pm 1.0 ^a | 37.5 \pm 2.3 ^{f,†} | 66.3 \pm 1.7 ^{g,‡} |
| 10 gg | 15.4 \pm 1.1* | 59.3 \pm 4.1 ^{a,§} | 42.2 \pm 6.3 ^{f,†} | 69.5 \pm 2.1 ^{g,‡} |

ANOVA a due vie (Trattamento e Tempo sperimentale): $F=20.85$, $p < 0.0005$.

Scheffé test tra i trattamenti allo stesso tempo sperimentale:

24 ore: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.0005$); ^b, *Detrained*-NaCl versus *Trained* ($p < 0.0005$); ^c, *Detrained*-HA versus *Detrained*-NaCl e Non Allenati ($p < 0.0005$).

72 ore: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.0005$); ^d, *Detrained*-NaCl versus *Trained* ($p < 0.0005$); ^e, *Detrained*-HA versus *Detrained*-NaCl e Non Allenati ($p < 0.0005$), ^e *Trained* ($p < 0.005$).

7 giorni: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.0005$); ^f, *Detrained*-NaCl versus *Trained* e Non Allenati ($p < 0.0005$); ^g, *Detrained*-HA versus *Detrained*-NaCl, *Trained* e Non Allenati ($p < 0.0005$).

10 giorni: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.0005$); ^f, *Detrained*-NaCl versus *Trained* e Non Allenati ($p < 0.0005$); ^g, *Detrained*-HA versus *Detrained*-NaCl, *Trained* e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Scheffé test tra i tempi sperimentali nello stesso trattamento:

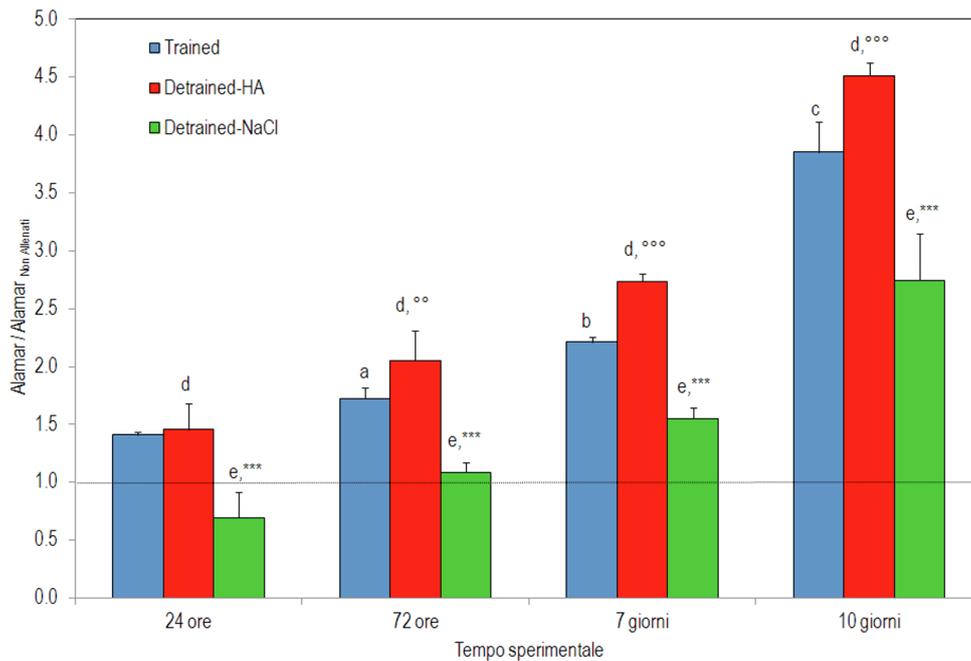
Non Allenati: ^{*}, 10 giorni versus altri tempi sperimentali ($p < 0.0005$);

Trained: [°], 7 giorni versus 24 ore ($p < 0.0005$); [§], 10 giorni versus 24 e 72 ore ($p < 0.0005$);

Detrained-NaCl: [^]72 versus 24 ore ($p < 0.0005$); [†], 7 e 10 giorni versus 24 e 72 ore ($p < 0.0005$);

Detrained-HA: [‡], tutti versus 24 ore ($p < 0.0005$).

Figura 5



I risultati della conta cellulare tra i trattamenti allo stesso tempo (Tabella 3) hanno evidenziato come la proliferazione dei tenociti fosse significativamente superiore nei gruppi Trained e Detrained-HA a 24 e 72 ore dalla semina rispetto agli altri gruppi. Ai tempi successivi il gruppo Detrained-HA presentava i valori significativamente superiori rispetto a tutti gli altri Gruppi. L'analisi statistica tra i tempi sperimentali all'interno dello stesso Gruppo (Tabella 3) ha evidenziato differenze significative tra i tempi simili a quelle osservate con il test dell'Alamar Blue. L'analisi dei risultati di sintesi proteica dei tenociti a diversi tempi sperimentali ha dimostrato come la significatività, ove presente, fosse determinata dal solo fattore trattamento su ciascun parametro considerato. Per quanto riguarda il Collagene I (Tabella 4), la maggior sintesi è stata osservata nelle colture di tenociti dei gruppi Detrained-HA e *Trained*, significativamente superiori a quelle dei Gruppi *Detrained*-NaCl e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Tabella 3. Risultati della proliferazione cellulare ($\times 10^3$ cellule) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo Non Allenati | Gruppo <i>Trained</i> | Gruppo <i>Detrained</i> - NaCl | Gruppo <i>Detrained</i> HA |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 24 ore | 8.72 \pm 0.13 | 8.96 \pm 0.59 | 6.20 \pm 1.13 ^a | 11.50 \pm 3.67 ^b |
| 72 ore | 8.53 \pm 0.42 | 12.95 \pm 1.03 ^c | 9.26 \pm 0.73 ^d | 31.33 \pm 9.99 ^{e,†} |
| 7 gg | 7.82 \pm 0.21 | 16.92 \pm 1.87 ^{f,°} | 11.49 \pm 1.78 ^{g,†} | 57.20 \pm 7.03 ^{h,†} |
| 10 gg | 6.56 \pm 0.41 [*] | 22.88 \pm 5.13 ^{i,§} | 13.20 \pm 0.57 ^{j,†} | 51.50 \pm 0.71 ^{k,‡} |

ANOVA a due vie (Trattamento e Tempo sperimentale): $F=30.14$, $p < 0.0005$.

Scheffé test tra i trattamenti allo stesso tempo sperimentale:

- 24 ore: a, Detrained-NaCl versus Trained ($p < 0.005$) e Non Allenati ($p < 0.005$); b, Detrained-HA versus Detrained- NaCl e Non Allenati ($p < 0.005$).
- 72 ore: c, Trained versus Non Allenati ($p < 0.05$); d, Detrained-NaCl versus Trained ($p < 0.05$); e, Detrained-HA versus Detrained- NaCl, Trained e Non Allenati ($p < 0.0005$);
- 7 giorni: f, Trained versus Non Allenati ($p < 0.005$); g, Detrained-NaCl versus Trained e Non Allenati ($p < 0.005$); h, Detrained-HA versus Detrained-NaCl, Trained e Non Allenati ($p < 0.0005$).
- 10 giorni: i, Trained versus Non Allenati ($p < 0.0005$); j, Detrained-NaCl versus Trained e Non Allenati ($p < 0.005$); k, Detrained-HA versus Detrained-NaCl, Trained e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Scheffé test tra i tempi sperimentali nello stesso trattamento:

Non Allenati: *, 10 giorni versus 24 e 72 ore ($p < 0.05$);

Trained: °, 7 giorni versus 24 ore ($p < 0.05$); §, 10 giorni versus 24 e 72 ore ($p < 0.005$);

Detrained-NaCl: †, 7 e 10 giorni versus 24 e 72 ore ($p < 0.005$);

Detrained-HA: ‡, tutti versus 24 ore ($p < 0.0005$).

Tabella 4. Risultati del dosaggio nel sovrnatante delle colture cellulari del Collagene I (pg/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo Non Allenati | Gruppo <i>Trained</i> ^a | Gruppo <i>Detrained- NaCl</i> ^b | Gruppo <i>Detrained- HA</i> ^c |
|--------------------|------------------------|---------------------------------------|---|---|
| 24 ore | 59.2 \pm 2.6 | 69.9 \pm 7.4 | 51.1 \pm 4.0 | 70.2 \pm 2.2 |
| 72 ore | 62.9 \pm 5.0 | 73.6 \pm 3.9 | 47.8 \pm 5.3 | 72.0 \pm 4.2 |
| 7 gg | 62.8 \pm 1.3 | 74.9 \pm 3.1 | 42.7 \pm 5.9 | 74.9 \pm 5.5 |
| 10 gg | 61.4 \pm 6.2 | 77.1 \pm 2.7 | 45.2 \pm 4.8 | 79.2 \pm 3.9 |

ANOVA univariata (Trattamento, $F=190.48$, $p < 0.0005$) tra i gruppi sperimentali: a, Trained versus Non Allenati ($p < 0.0005$); b, Detrained-NaCl versus Trained ($p < 0.0005$) e Non Allenati ($p < 0.0005$); c, Detrained-HA versus Detrained -NaCl e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Al contrario, la sintesi di Collagene III è risultata significativamente inferiore nei gruppi *Detrained-HA* e *Trained* rispetto agli altri Gruppi (Tabella 5). La sintesi di Fibronectina (Tabella 6) ha rilevato valori significativamente inferiori nel gruppo *Detrained-NaCl* rispetto al *Trained* ($p < 0.0005$) ed al *Detrained-HA* ($p < 0.005$).

Tabella 5. Risultati del dosaggio nel sovrnatante delle colture cellulari del Collagene III (pg/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo Non Allenati | Gruppo <i>Trained</i> ^a | Gruppo <i>Detrained- NaCl</i> ^b | Gruppo <i>Detrained- HA</i> ^c |
|--------------------|------------------------|---------------------------------------|---|---|
| 24 ore | 86.8 \pm 11.8 | 66.3 \pm 5.3 | 63.8 \pm 7.0 | 59.2 \pm 6.3 |
| 72 ore | 74.1 \pm 5.0 | 61.9 \pm 5.4 | 67.0 \pm 2.9 | 58.7 \pm 6.5 |
| 7 gg | 67.7 \pm 3.8 | 61.7 \pm 2.1 | 69.9 \pm 3.5 | 62.8 \pm 4.5 |
| 10 gg | 70.6 \pm 5.0 | 59.6 \pm 5.1 | 63.4 \pm 3.2 | 61.6 \pm 7.9 |

ANOVA univariata (Trattamento, $F=19.52$, $p < 0.0005$) tra i gruppi sperimentali: a, Trained versus Non Allenati ($p < 0.0005$); b, Detrained-NaCl versus Non Allenati ($p < 0.0005$); c, Detrained-HA versus Detrained- NaCl ($p < 0.05$) e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Tabella 6. Risultati del dosaggio nel sovranatante delle colture cellulari del FN (pg/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo Non Allenati | Gruppo <i>Trained</i> | Gruppo <i>Detrained- NaCl</i> ^a | Gruppo <i>Detrained- HA</i> ^b |
|--------------------|------------------------|--------------------------|---|---|
| 24 ore | 30.3 \pm 5.5 | 36.3 \pm 13.6 | 25.0 \pm 2.3 | 35.3 \pm 5.1 |
| 72 ore | 25.3 \pm 1.5 | 34.7 \pm 13.0 | 24.2 \pm 2.3 | 34.3 \pm 13.0 |
| 7 gg | 32.0 \pm 6.0 | 42.2 \pm 21.6 | 23.7 \pm 1.4 | 34.3 \pm 8.4 |
| 10 gg | 28.0 \pm 4.0 | 35.7 \pm 5.7 | 34.0 \pm 1.3 | 23.0 \pm 8.7 |

ANOVA univariata (Trattamento, F=9.08, $p < 0.0005$) tra i gruppi sperimentali: ^a, *Detrained-NaCl* versus *Trained* ($p < 0.0005$); ^b, *Detrained-HA* versus *Detrained- NaCl* ($p < 0.005$).

Infine, la sintesi di Aggrecani (Tabella 7) si è resa evidente solo al tempo sperimentale finale di 10 giorni.

Tabella 7. Risultati del dosaggio nel sovranatante delle colture cellulari di aggrecani (ng/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo Non Allenati | Gruppo <i>Trained</i> | Gruppo <i>Detrained- NaCl</i> | Gruppo <i>Detrained- HA</i> ^c |
|--------------------|------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---|
| 24 ore | - | - | - | - |
| 72 ore | - | - | - | - |
| 7 gg | - | - | - | - |
| 10 gg | 0.560 \pm 0.030 | 0.725 \pm 0.036 ^a | 0.509 \pm 0.066 ^b | 0.679 \pm 0.005 ^c |

Scheffé test: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.005$); ^b, *Detrained-NaCl* versus *Trained* ($p < 0.0005$) e Non Allenati ($p < 0.05$); ^c, *Detrained-HA* versus *Detrained- NaCl* ($p < 0.005$) e Non Allenati ($p < 0.05$).

Si è osservato che i Gruppi *Trained* e *Detrained-HA* presentavano valori significativamente superiori agli altri Gruppi in assenza di differenze significative fra i Gruppi *Trained* e *Detrained-HA*. Il rilascio delle MMP-1 e MMP-3 (Tabelle 8 e 9) nel sovrinatante delle colture di tenociti ha messo in evidenza differenze significative per la MMP-1 con valori superiori nei gruppi Non Allenati e *Detrained-NaCl* rispetto ai *Trained* e *Detrained-HA*.

Tabella 8. Risultati del dosaggio nel sovrinatante delle colture cellulari del MMP-1 (ng/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo Non Allenati | Gruppo <i>Trained</i> ^a | Gruppo <i>Detrained-NaCl</i> ^b | Gruppo <i>Detrained- HA</i> ^c |
|--------------------|------------------------|---------------------------------------|--|---|
| 24 ore | 0.724 \pm 0.004 | 0.665 \pm 0.013 | 0.762 \pm 0.014 | 0.683 \pm 0.013 |
| 72 ore | 0.721 \pm 0.007 | 0.672 \pm 0.021 | 0.766 \pm 0.008 | 0.687 \pm 0.012 |
| 7 gg | 0.723 \pm 0.008 | 0.646 \pm 0.280 | 0.767 \pm 0.010 | 0.673 \pm 0.008 |
| 10 gg | 0.741 \pm 0.022 | 0.657 \pm 0.023 | 0.752 \pm 0.005 | 0.661 \pm 0.039 |

ANOVA univariata (Trattamento, F=154.18, $p < 0.0005$) tra i gruppi sperimentali: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.0005$); ^b, *Detrained-NaCl* versus *Trained* e Non Allenati ($p < 0.0005$); ^c, *Detrained-HA* versus *Detrained- NaCl* ($p < 0.0005$), *Trained* ($p < 0.05$) e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Tabella 9. Risultati del dosaggio nel sovranatante delle colture cellulari del MMP-3 (ng/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media±DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo | Gruppo | Gruppo | Gruppo |
|--------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | Non Allenati | <i>Trained</i> ^a | <i>Detrained- NaCl</i> ^b | <i>Detrained- HA</i> ^c |
| 24 ore | 0.264±0.044 | 0.473±0.083 | 0.000 | 0.427±0.077 |
| 72 ore | 0.353±0.038 | 0.477±0.027 | 0.000 | 0.433±0.104 |
| 7 gg | 0.330±0.042 | 0.477±0.092 | 0.122±0.106 | 0.788±0.096 |
| 10 gg | 0.322±0.053 | 0.537±0.120 | 0.074±0.060 | 0.695±0.152 |

ANOVA univariata (Trattamento, F=79.63, $p < 0.0005$) tra i gruppi sperimentali: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.0005$); ^b, *Detrained-NaCl* versus *Trained* e Non Allenati ($p < 0.0005$); ^c, *Detrained-HA* versus *Detrained NaCl* ($p < 0.0005$), *Trained* ($p < 0.005$) e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Per quanto concerne la produzione di IL-1 β (Tabella 10) differenze significative sono state rilevate tra il Gruppo *Trained* rispetto al Gruppo Non Allenati ($p < 0.0005$), tra il Gruppo *Detrained-NaCl* rispetto ai Gruppi *Trained* e Non Allenati ($p < 0.0005$) ed infine tra il Gruppo *Detrained-HA* rispetto ai Gruppi *Detrained NaCl* e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Tabella 10. Risultati del dosaggio nel sovrinatante delle colture cellulari del IL-1 β (pg/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media ± DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo | Gruppo | Gruppo | Gruppo |
|--------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| | Non Allenati | <i>Trained</i> ^a | <i>Detrained- NaCl</i> ^b | <i>Detrained-HA</i> ^c |
| 24 ore | 34.0 ± 0.9 | 32.8 ± 0.3 | 34.0 ± 0.9 | 32.6 ± 0.3 |
| 72 ore | 34.7 ± 0.6 | 32.7 ± 0.2 | 35.0 ± 1.5 | 32.6 ± 0.3 |
| 7 gg | 34.4 ± 0.6 | 32.9 ± 0.3 | 33.6 ± 0.9 | 33.2 ± 1.2 |
| 10 gg | 34.8 ± 1.4 | 33.3 ± 0.5 | 34.2 ± 1.1 | 32.5 ± 0.2 |

ANOVA univariata (Trattamento, F=23.59, $p < 0.0005$) tra i gruppi sperimentali: ^a, *Trained* versus Non Allenati ($p < 0.0005$); ^b, *Detrained-NaCl* versus *Trained* ($p < 0.0005$); ^c, *Detrained-HA* versus *Detrained -NaCl* e Non Allenati ($p < 0.0005$).

Non sono state rilevate differenze significative tra i trattamenti per quanto riguarda la produzione di TNF- α (Tabella 11). Infine, la sintesi del TNF- α non si è resa evidente a nessuno dei tempi sperimentali esaminati.

Tabella 11. Risultati del dosaggio nel sovranatante delle colture cellulari del TNF- α (pg/ml) per ciascun tipo di trattamento nel tempo. Media \pm DS, n=3 replicati.

| Tempo sperimentale | Gruppo | | Gruppo | |
|--------------------|------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| | Non Allenati | <i>Trained</i> | <i>Detrained- NaCl</i> | <i>Detrained -HA</i> |
| 24 ore | 98.4 \pm 0.3 | 81.5 \pm 18.4 | 148.4 \pm 92.0 | 285.4 \pm 133.7 |
| 72 ore | 96.3 \pm 16.1 | 249.4 \pm 256.1 | 443.0 \pm 260.4 | 667.2 \pm 70.3 |
| 7 gg | 638.2 \pm 69.9 | 536.1 \pm 380.0 | 568.2 \pm 229.8 | 776.0 \pm 85.2 |
| 10 gg | 27.5 \pm 0.5 | 589.8 \pm 92.9 | 511.7 \pm 143.0 | 630.3 \pm 388.6 |

Studio in vivo

Tutti gli animali hanno ben tollerato l'iniezione peri-tendinea di acido ialuronico o soluzione fisiologica, senza alcuna complicanza.

L'analisi statistica dell'aumento di peso corporeo nell'arco delle 10 settimane di allenamento non ha rilevato nessuna differenza significativa tra i diversi gruppi sperimentali. Al termine delle 10 settimane di allenamento i pesi medi dei ratti nei vari gruppi erano: Non Allenati: 439 \pm 28 g; Trained: 440 \pm 14 g; Detrained-NaCl: 413 \pm 16 g e Detrained-HA: 420 \pm 28 g. Inoltre, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative a 15 settimane tra il gruppo Detrained-HA e il gruppo Detrained-NaCl per quanto riguarda l'incremento di peso dopo il periodo di detraining. Per i gruppi sperimentali Detrained i pesi medi in seguito alle 4 settimane di detraining erano: Detrained-NaCl: 460 \pm 21 g e Detrained-HA: 481 \pm 30 g.

L'analisi statistica effettuata sui dati ponderali al termine delle 10 settimane di allenamento, ha permesso inoltre di evidenziare incrementi ponderali e variazioni di consumo di cibo ed acqua settimanali in tutti i Gruppi sperimentali (Tabella 12).

Tabella 12. Risultati degli incrementi settimanali ponderali, del consumo di cibo ed e di acqua, dopo 10 settimane. Media \pm DS, n=6.

| | | Gruppo | Gruppo | Gruppo | Gruppo |
|---------------------|------------|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Non Allenati | <i>Trained</i> | <i>Detrained-NaCl</i> | <i>Detrained-HA</i> |
| incremento | ponderale | 1.03 \pm 0.01 | 1.03 \pm 0.00 | 1.05 \pm 0.01 ^a | 1.06 \pm 0.00 ^a |
| settimanale | | | | | |
| incremento | consumo | 0.99 \pm 0.01 | 1.03 \pm 0.04 | 0.97 \pm 0.01 ^b | 0.99 \pm 0.02 ^c |
| d'acqua settimanale | | | | | |
| incremento | consumo di | 1.00 \pm 0.00 | 1.00 \pm 0.03 | 1.00 \pm 0.01 | 1.02 \pm 0.01 |
| cibo settimanale | | | | | |

Scheffé test:

Incremento ponderale settimanale: ^a, *Detrained-HA e Detrained-NaCl versus Trained e Non Allenati* ($p < 0.0005$);

Incremento consumo d'acqua settimanale: ^b, *Detrained-NaCl versus Trained* ($p < 0.0005$); ^c, *Detrained-HA versus Trained* ($p < 0.005$).

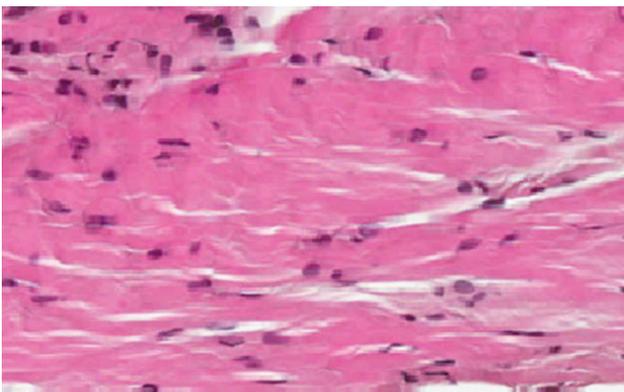
Tale analisi ha permesso di rilevare un significativo incremento ponderale nei gruppi Detrained-NaCl e Detrained-HA rispetto ai Non Allenati ed ai Trained ($p < 0.0005$). Per quanto riguarda l'incremento nel consumo di acqua, il gruppo Trained ha evidenziato valori significativamente maggiori rispetto al Gruppo Detrained-NaCl ($p < 0.0005$) e Detrained-HA ($p < 0.005$). Non sono state rilevate differenze significative per quanto riguarda l'incremento nel consumo di cibo nei diversi gruppi sperimentali.

L'analisi statistica condotta a 15 settimane nei due gruppi Detrained ha evidenziato un incremento ponderale significativo ($p < 0.05$) nel gruppo Detrained-HA (1.023 ± 0.004) rispetto al Gruppo Detrained-NaCl (1.018 ± 0.002). Infine, tra i due tempi sperimentali, 10 e 15 settimane, si è osservato un incremento ponderale significativo in entrambi i Gruppi Detrained (Detrained HA, $p < 0.001$ e Detrained-NaCl, $p < 0.0005$).

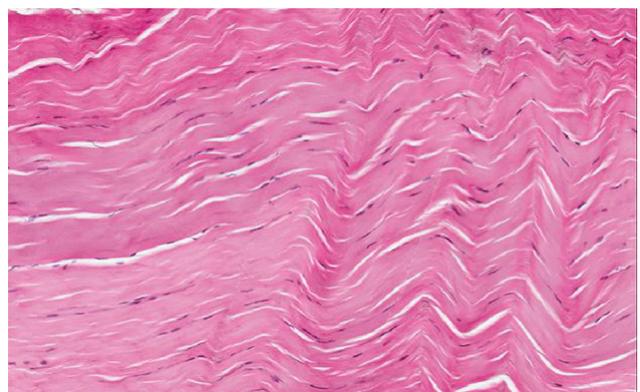
Analisi istologica tendine rotuleo

La Figura 6a mostra i tendini rotulei destri dei ratti Non Allenati caratterizzati da fibre collagene in parte disorganizzate e fortemente eosinofile con nuclei rotondeggianti basofili dispersi tra le fibre. I tendini rotulei destri dei ratti allenati (Trained) (Figura 6b) sono caratterizzati da fibre collagene parallele leggermente eosinofile fra cui sono istologicamente visibili rari nuclei allungati (Figura 6c). Nel gruppo di tendini rotulei destri Detrained-NaCl (Figura 6d-e) le fibre collagene si presentano disorganizzate in diversi punti. La Figura 6f mostra i tendini rotulei destri del gruppo Detrained-HA evidenziando una struttura e morfologia simile a quella presente nel gruppo Trained ma con minore evidenza di microtearing. I tendini rotulei destri Detrained-HA presentano fibre collagene disposte longitudinalmente e con la presenza di rari nuclei visibili lungo il tendine rotuleo (Figura 6g).

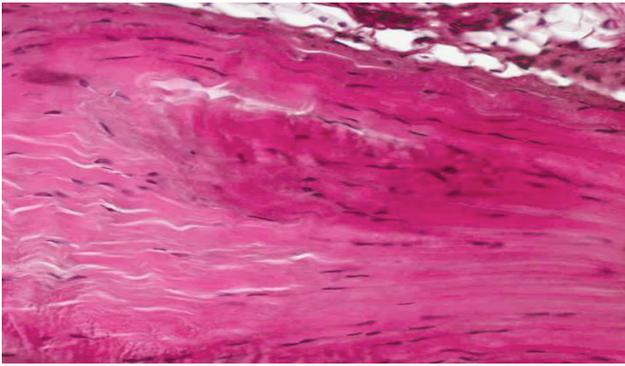
Figure 6a



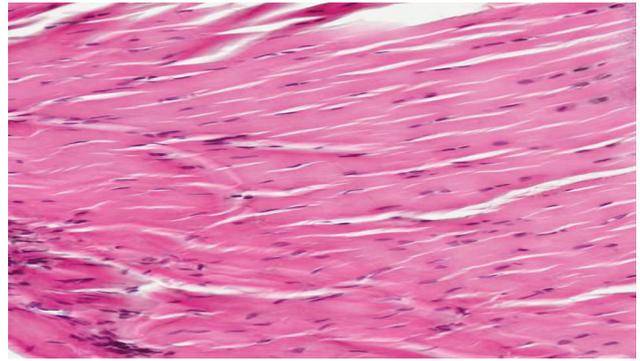
TEN 1 DX_20x



TEN 3 DX_20x

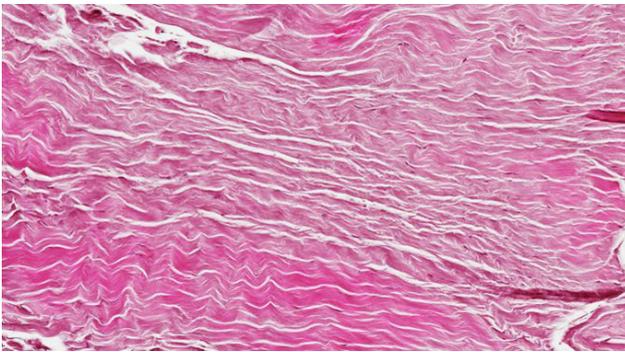


TEN 2 DX_20x

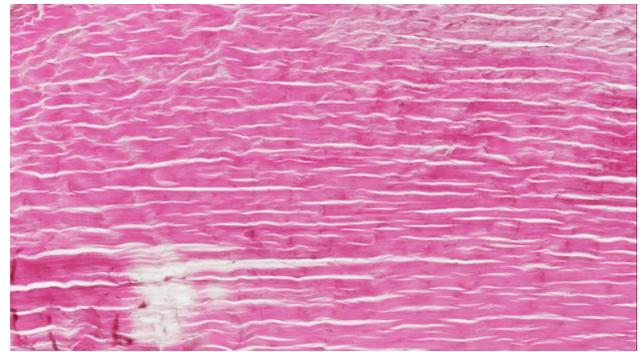


TEN 5 DX_20x

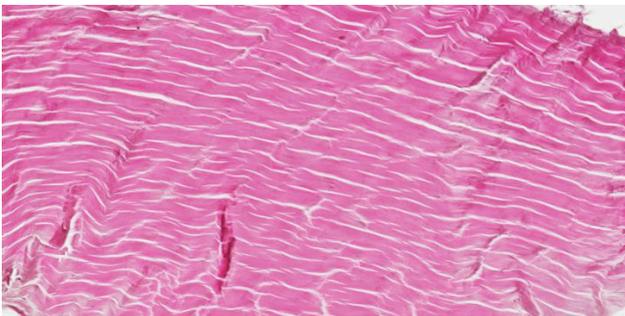
Figura 6b



TEN 7 DX 20x



TEN 11 DX 20x



TEN 9 DX 20x



TEN 12 DX 20x

Figura 6c

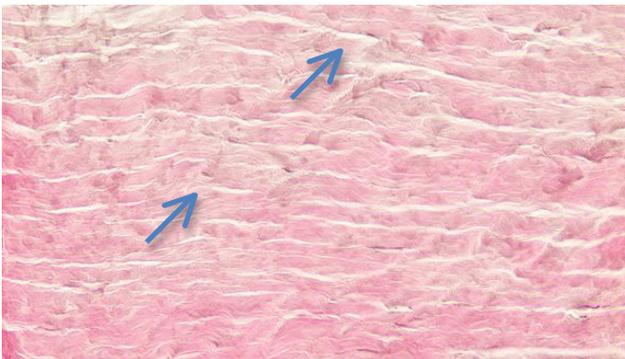
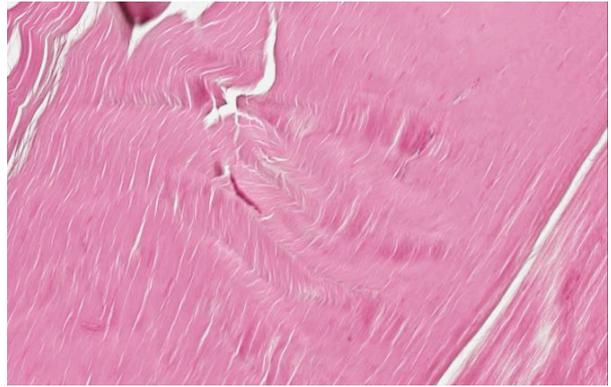


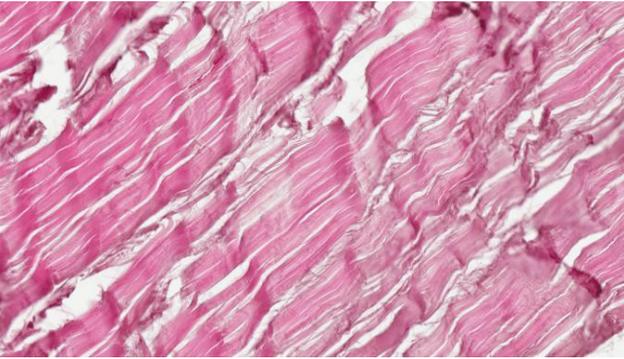
Figura 6d



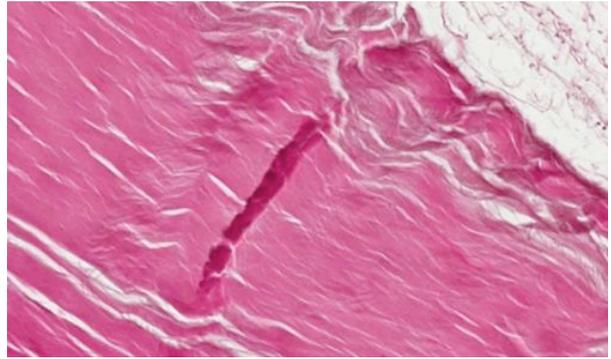
TEN 22 DX 20x



TEN 20 DX 20x



TEN 19 DX 20x

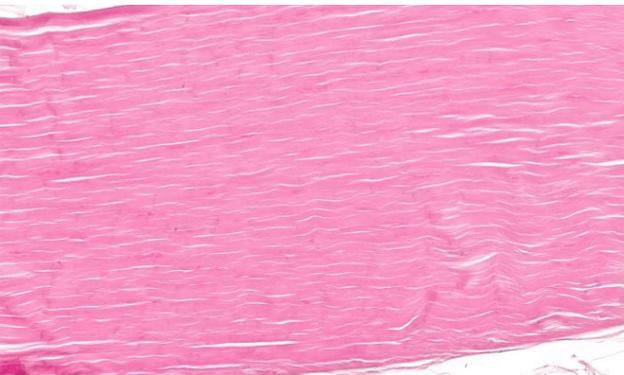
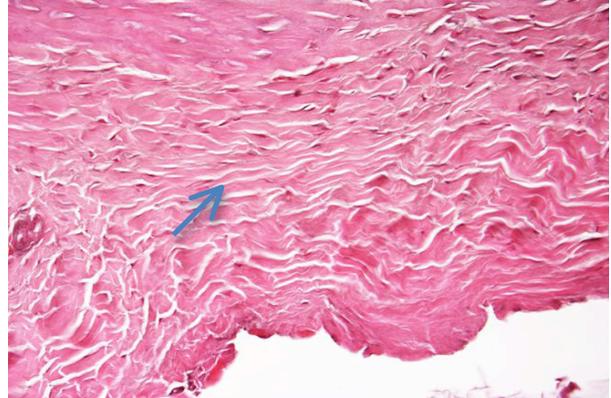


TEN 21 DX 20x

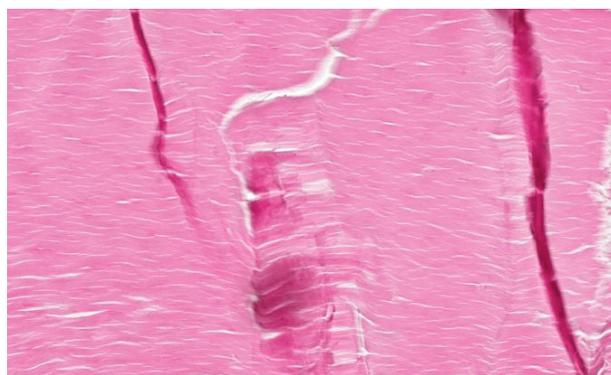
Figura 6e



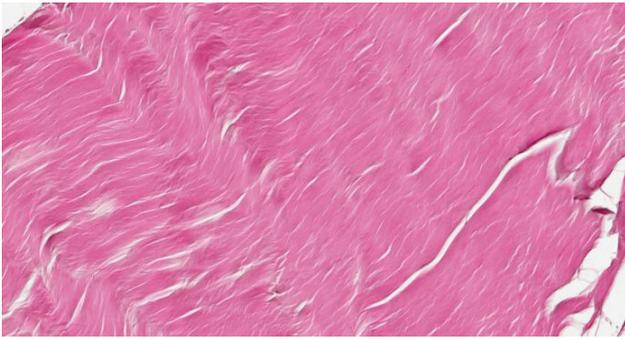
Figura 6f



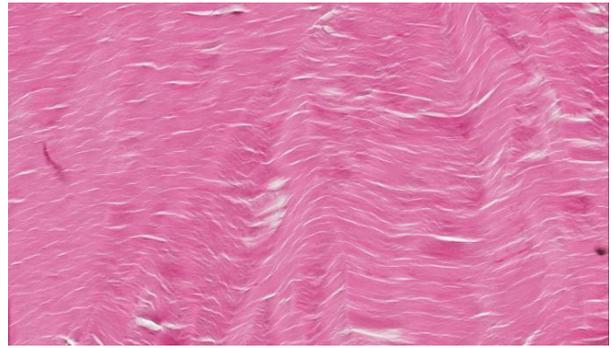
TEN 13 DX 20x



TEN 16 DX 20x

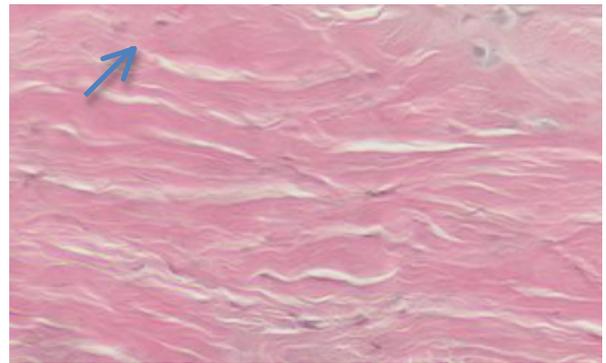
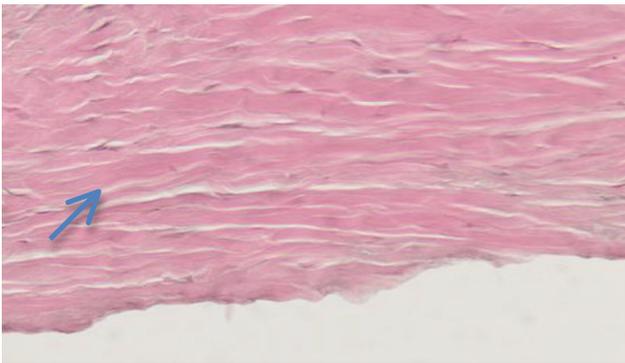


TEN 14 DX 20x



TEN 18 DX 20x

Figura 6g

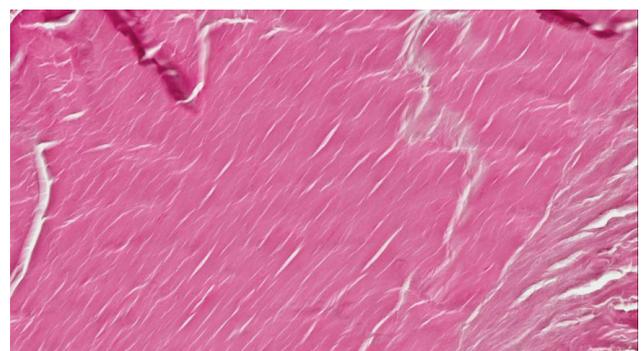


Come precedentemente segnalato, i tendini sinistri degli animali sono stati prelevati e processati. In particolare, si riportano nella Figura 7 alcune immagini istologiche dei tendini sinistri dei ratti Detrained (senza alcun trattamento) che possono rappresentare un ulteriore controllo degli effetti del detraining sul tendine patellare. L'analisi istologica ha rilevato fibre collagene talora disorganizzate con microtearings, e tessuto connettivo e adiposo aderente alle superfici del tendine rotuleo (Figura 7 a-b).

Figura 7



a

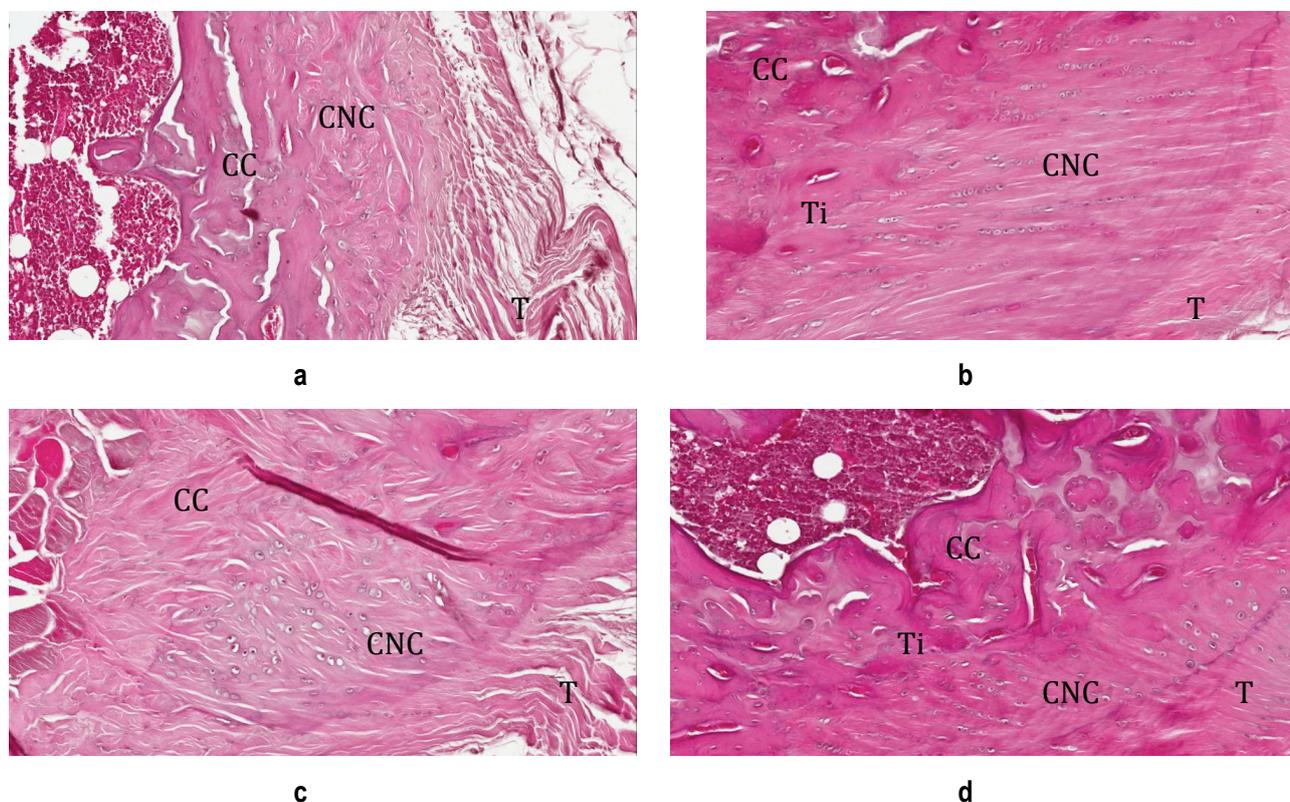


b

Analisi istologica entesi rotulea

La figura 8a mostra una sezione istologica dell'entesi rotulea destra per il Gruppo di animali *Non Allenati*. Le cellule cartilaginee si trovano disperse in un tessuto con componente fibrosa. Inoltre, il tidemark, la linea basofila che separa la cartilagine non calcificata da quella calcificata, è difficilmente riconoscibile. Nei ratti *Allenati (Trained)* (Figura 8b) le cellule cartilaginee, a livello della cartilagine non calcificata, mostrano la caratteristica struttura colonnare tra le fibre collagene disposte longitudinalmente. La cartilagine calcificata si presenta inoltre meno "cellularizzata" rispetto a quella non calcificata, questo perché probabilmente la deposizione di sali di calcio nella matrice extracellulare porta alla morte cellulare (Benjamin *et al.* 2006). Il tidemark, intensamente basofilo, separa chiaramente la zona di cartilagine non calcificata da quella calcificata. Nel Gruppo *Detrained-NaCl* (Figura 8c) la struttura dell'entesi destra si presenta disorganizzata con perdita della struttura e della morfologia della cartilagine calcificata e non. Inoltre, in tutte le sezioni istologiche esaminate, il tidemark non era riconoscibile. Infine, nel Gruppo *Detrained-HA* (Figura 8d) le cellule a livello della cartilagine non calcificata presentavano la tipica struttura colonnare con fibre collagene disposte longitudinalmente e tidemark fortemente basofilo. Così come per il Gruppo *Trained*, anche nel gruppo *Detrained-HA* la cartilagine calcificata si presenta meno cellularizzata rispetto a quella non calcificata.

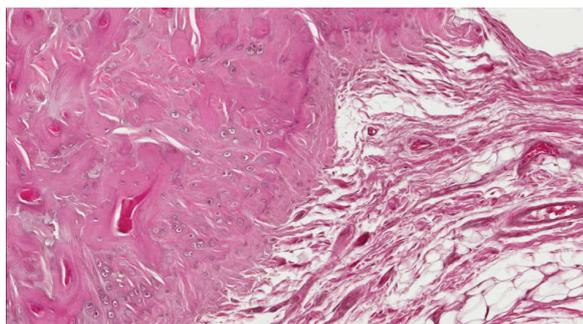
Figura 8



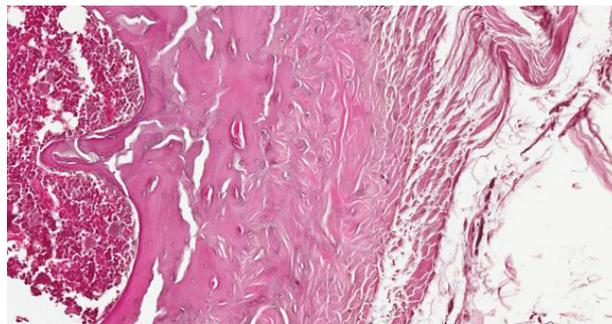
Come precedentemente segnalato, le entesi sinistre degli animali sono state prelevate e processate. In particolare, si riportano nella Figura 9 alcune immagini istologiche dell'entesi patellare sinistra dei ratti *Detrained* che possono

rappresentare un ulteriore controllo degli effetti del *detraining* sul tendine patellare (senza alcun trattamento). Similmente a quanto osservato nel Gruppo *Detrained-NaCl*, la struttura caratteristica dell'entesi fibrocartilaginea è sovvertita con cellule cartilaginee disperse in un tessuto fibroso disorganizzato. Inoltre, non si rileva la presenza del tidemark a causa di un sovvertimento anche a livello della cartilagine calcificata (Figura 9 a-b).

Figura 9



a



b

Analisi istomorfometrica

I risultati istomorfometrici relativi al numero di cellule visibili nelle sezioni istologiche (cellularità), microtears, collagene I, II e III per tutti i tendini destri dei diversi Gruppi sperimentali esaminati sono riportati in Tabella 13, in Figura 10 e nella Figura 11.

Figura 10a

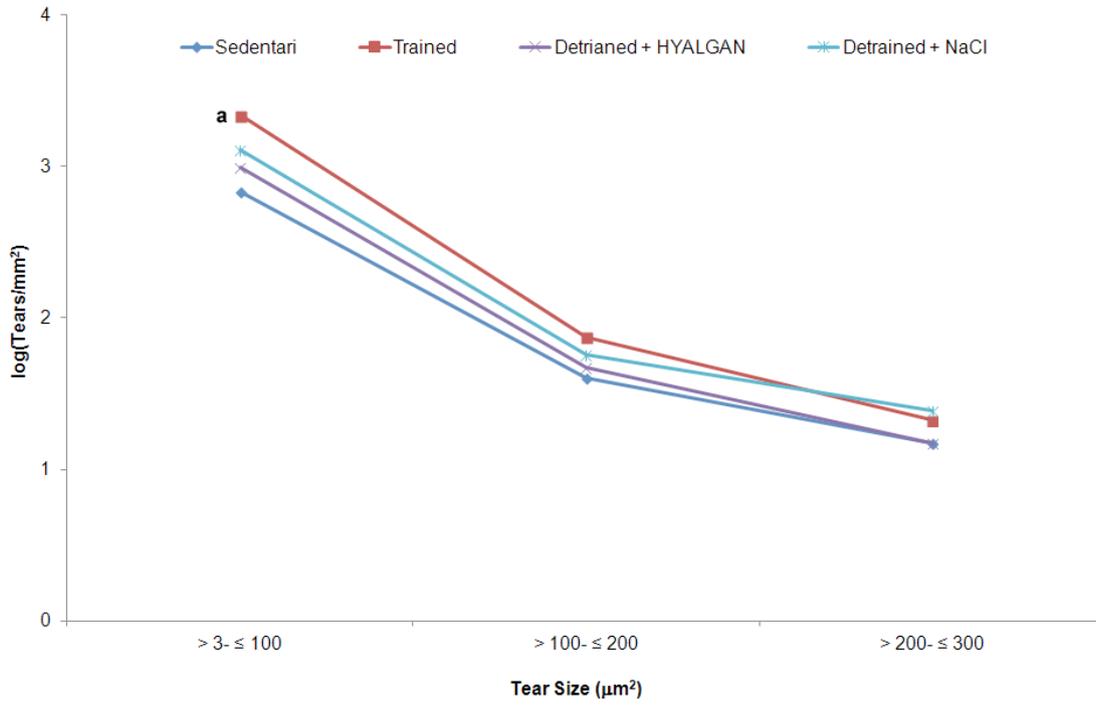


Figura 10b

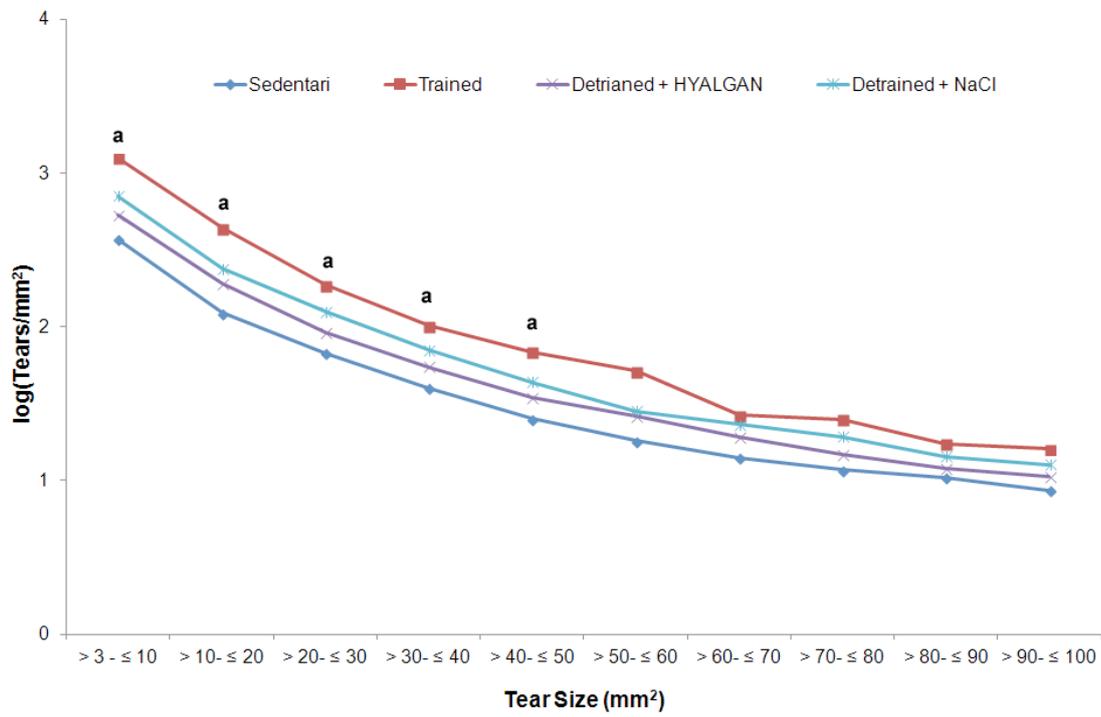


Figura 10c

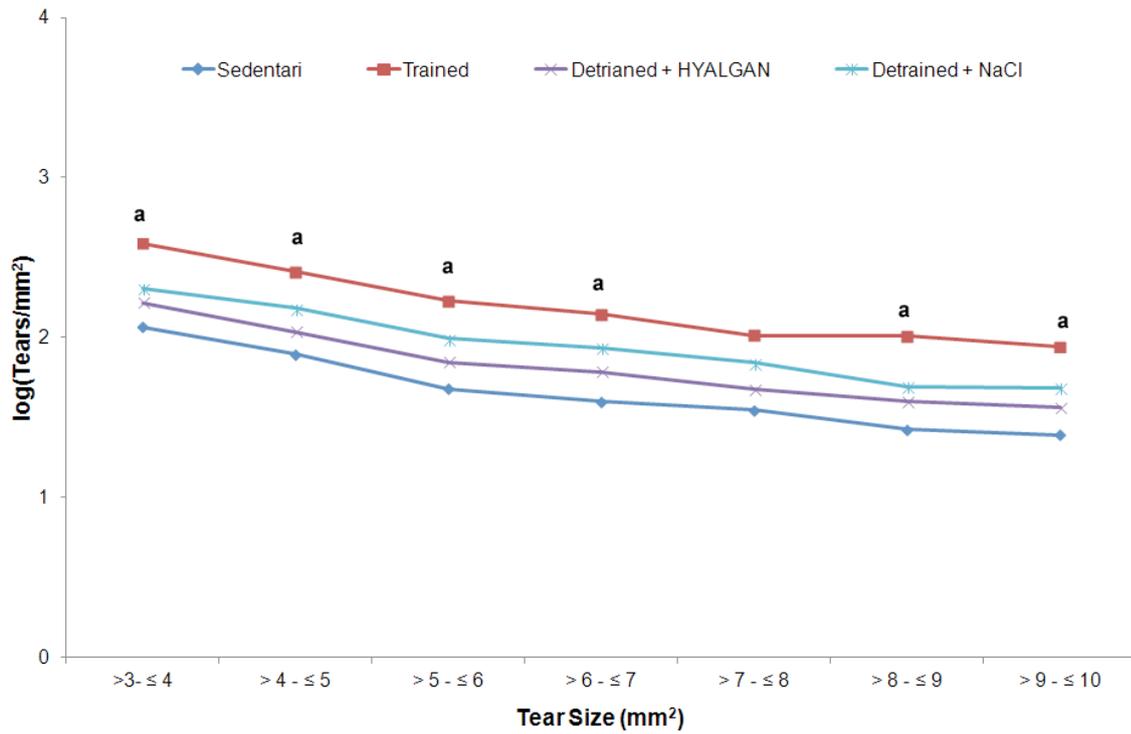
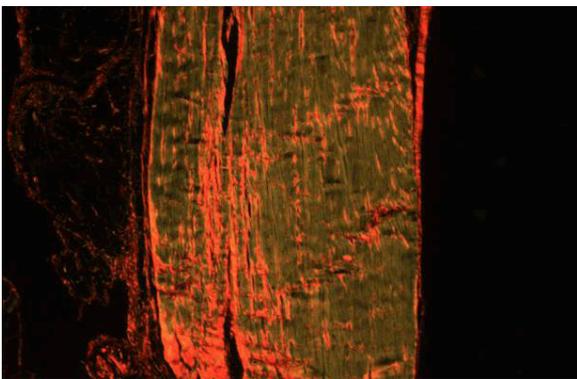


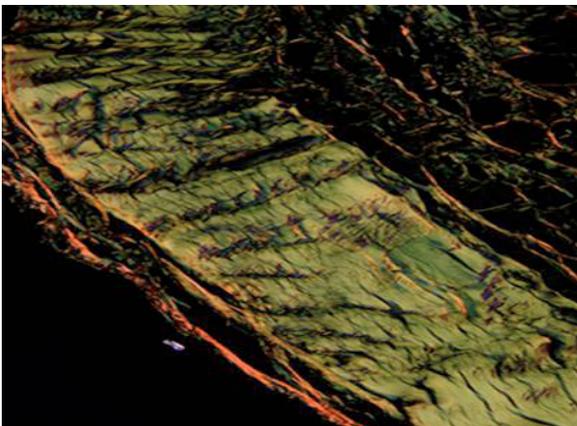
Figura 11



a



b



c



d

L'analisi della cellularità ha evidenziato un aumento significativo del numero di cellule visibili istologicamente nei

Gruppi Non Allenati e Detrained-NaCl rispetto ai Trained e al Detrained-HA (Tabella 13).

Tabella 13. Risultati istomorfometrici del tendine rotuleo per ciascun gruppo sperimentale. Media \pm DS, n=4.

| | Gruppo Non Allenati | Gruppo <i>Trained</i> | Gruppo Detrained-NaCl | Gruppo <i>Detrained-HA</i> |
|----------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Cellularità (%) | 0.021 \pm 0.005 | 0.007 \pm 0.001 ^a | 0.022 \pm 0.011 ^b | 0.006 \pm 0.003 ^c |
| Microtears Area/ Tendon Area (%) | 47 \pm 17 | 55 \pm 3 | 49 \pm 15 | 56 \pm 6 |
| Microtears/mm ² | 1087 \pm 887 | 2278 \pm 300 ^d | 1363 \pm 4404 | 1045 \pm 533 ^e |
| Collagene III (%) | 36.7 \pm 12.0 | 15.2 \pm 2.4 ^f | 31.8 \pm 4.1 ^g | 13.3 \pm 6.3 ^h |
| Collagene I e II (%) | 16.3 \pm 6.9 | 29.5 \pm 4.2 ⁱ | 12.3 \pm 4.4 ^j | 38.1 \pm 10.2 ^k |

Scheffé test:

Cellularità: ^a, *Trained versus Non Allenati* ($p < 0.05$); ^b, *Detrained-NaCl versus Trained* ($p < 0.005$); ^c, *Detrained-HA versus Non Allenati* ($p < 0.005$).

Microtear/mm²: ^d, *Trained versus Non Allenati* ($p < 0.05$); ^e, *Detrained-HA versus Trained* ($p < 0.05$).

Collagene III: ^f, *Trained versus Non Allenati* ($p < 0.005$); ^g, *Detrained-NaCl versus Trained* ($p < 0.05$); ^h, *Detrained-HA versus Detrained-NaCl* ($p < 0.005$) e *Non Allenati* ($p < 0.0005$).

Collagene I e II: ⁱ, *Trained versus Non Allenati* ($p < 0.05$); ^j, *Detrained-NaCl versus Trained* ($p < 0.005$); ^k, *Detrained-HA versus Detrained-NaCl* ($p < 0.005$) e *Non Allenati* ($p < 0.0005$).

La valutazione della percentuale di collagene III ha rilevato un aumento significativo nella produzione di questo nei Gruppi Non Allenati e Detrained-NaCl rispetto ai Gruppi Trained e Detrained-HA (Figura 11, Tabella 13). La percentuale di collagene I e II ha mostrato invece valori significativamente maggiori nei Gruppi Trained e Detrained-HA rispetto ai Gruppi Non Allenati e Detrained-NaCl (Figura 11, Tabella 13).

Per quanto riguarda la quantificazione della percentuale di area di microtears sull'area totale del tendine (Area Microtears / Area Tendine, %) e del numero di microtears per unità di superficie (Microtears/mm²), l'analisi statistica ha evidenziato come solo i risultati di Microtears/mm² del Gruppo Trained siano significativamente superiori rispetto ai gruppi Non Allenati e Detrained-HA (Tabella 13).

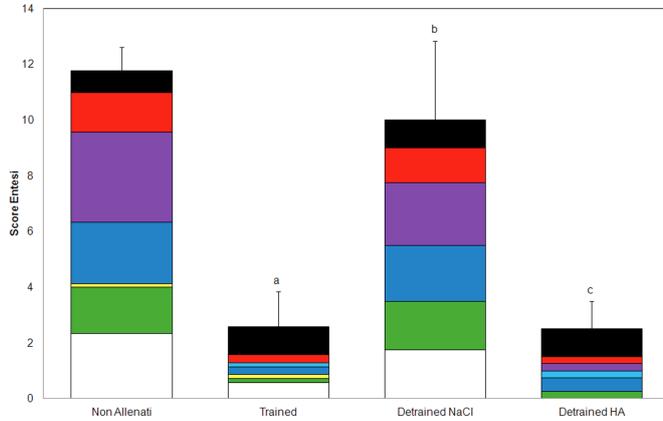
La Figura 10 riporta la distribuzione logaritmica dei microtears per dimensione (log(Microtears/mm²)) per ciascun Gruppo sperimentale. In tutti gli intervalli dimensionali di microtears considerati, i valori più alti di densità sono stati osservati nel Gruppo Trained, risultando significativamente differenti dai valori ottenuti nel Gruppo Non Allenati in alcuni degli intervalli considerati inferiori ai 100 μ m².

L'analisi dello score istologico semiquantitativo della struttura e morfologia dell'entesi rotulea, riportato in Tabella 1, ha rilevato risultati significativamente superiori nei Gruppi Detrained-NaCl e Non Allenati rispetto ai Gruppi Trained e Detrained-HA (Figura 12).

Per quanto riguarda la valutazione statistica dei singoli parametri dello score istologico sono state evidenziate differenze significative per i parametri relativi alla colorazione della matrice extracellulare, integrità del tidemark,

morfologia cellulare della cartilagine calcificata, morfologia cellulare della cartilagine non calcificata e struttura dell'entesi patellare (Figura 12).

Figura 12



| | Non Allenati | Trained | Detrained NaCl | Detrained HA |
|--|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| ■ Vascolarizzazione | 0.78 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| ■ Colorazione matrice extracellulare (F=5.45, p < 0.05) | 1.44 | 0.29 ^d | 1.25 | 0.25 |
| ■ Integrità del tidemark (F=30.49, p < 0.0005) | 3.22 | 0.00 ^e | 2.25 ^f | 0.25 ^g |
| ■ Cluster di condroiti nella cartilagine non calcificata | 0.00 | 0.14 | 0.00 | 0.25 |
| ■ Morfologia cellulare cartilagine non calcificata (F=21.56, p < 0.0005) | 2.22 | 0.29 ^h | 2.00 ⁱ | 0.50 ^j |
| ■ Cluster di condroiti nella cartilagine calcificata | 0.11 | 0.14 | 0.00 | 0.00 |
| ■ Morfologia cellulare cartilagine calcificata (F=7.36, p < 0.005) | 1.67 | 0.14 ^k | 1.75 ^l | 0.25 |
| ■ Struttura entesi patellare (F=16.44, p < 0.0005) | 2.33 | 0.57 ^m | 1.75 | 0.00 ⁿ |

La colorazione della matrice extracellulare ha mostrato differenze significative nel Gruppo Trained rispetto al Gruppo Non Allenati ($p < 0.05$), mentre i restanti parametri hanno evidenziato differenze significative nei Gruppi Trained e Detrained-HA rispetto ai Gruppi Non Allenati e Detrained NaCl.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Scopo della presente ricerca è stato valutare attività, metabolismo cellulare e caratteristiche istologiche ed istomorfometriche del tendine patellare e della sua entesi in condizioni di non allenamento, allenamento ed improvviso arresto dell'attività fisica. In particolare, è stato ipotizzando che un'iniezione peri-tendinea di acido ialuronico (Hyalgan®, Fidia Farmaceutici, Abano Terme, Padova) nelle settimane successive all'improvviso arresto dell'attività fisica potesse mantenere la fisiologica struttura del tendine e della sua entesi.

I risultati *in vitro* hanno evidenziato valori di vitalità e conta cellulare simili fra i Gruppi *Trained* e *Detrained-HA* con un incremento significativo di numerosi parametri legati al metabolismo cellulare rispetto agli altri Gruppi. In riferimento ai componenti fondamentali della matrice extracellulare del tendine, si è osservato che Collagene I, Fibronectina ed Aggrecani sono prodotti in maniera significativamente maggiore dalle cellule isolate dai tendini patellari dei Gruppi *Trained* e *Detrained-HA* rispetto agli altri Gruppi sperimentali. Un aumento della biosintesi di Collagene I dopo l'esercizio in assenza di infiammazione tissutale, così come si evince dai dati *in vitro*, è un indice di efficienza tissutale come adattamento alle nuove esigenze meccaniche funzionali (Magnusson *et al.* 2003, Kjaer *et al.* 2004, Bernard-Beaubois *et al.* 1998, Rufai *et al.* 1995, Maffulli *et al.* 2000), mentre l'aumento nella biosintesi di Collagene III (o la riduzione nella produzione di Collagene I) rappresenta una caratteristica indicativa di un'iniziale degenerazione tendinea (Maffulli *et al.* 2000). Allo stesso modo, l'aumento della produzione di Fibronectina, una glicoproteina che media l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare attraverso i recettori integrinici, può essere considerato un indice di un miglioramento della proliferazione, della crescita, della sopravvivenza, della migrazione e del differenziamento cellulare (Pankov *et al.* 2002, Kadler *et al.* 2008). L'aumento nei valori inerenti alla produzione di aggrecani, valutabili solo a 10 giorni, può essere messo in relazione al ruolo dei proteoglicani nel comportamento funzionale biomeccanico del tendine (Rees *et al.* 2007).

L'equilibrio fra le MMP ed i relativi inibitori è importante per il mantenimento della salute dei tendini. Nel presente studio minori livelli di MMP-1 sono stati rilevati nei Gruppi *Trained* e *Detrained-HA* con valori significativamente più bassi nel Gruppo *Detrained-HA* a confronto con il Gruppo *Detrained-NaCl*. La MMP1 è stata associata a fenomeni catabolici di tendini, legamenti ed altri tessuti, tendinopatie ed è anche considerata la collagenasi predominante associata a lesioni di tendine di Achille e cuffia dei rotatori (Magra e Maffulli 2005; Jones GC *et al.* 2006).

Per quanto riguarda la MMP3, i valori più bassi sono stati osservati nei Gruppi *Non Allenati* e *Detrained-NaCl* con valori significativamente più alti nel Gruppo *Detrained-HA* a confronto con il Gruppo *Detrained-NaCl*. La MMP3 sembra avere un ruolo nel controllo della degradazione e del rimodellamento della matrice extracellulare del tendine (Magra M, Maffulli N, 2005). Un aumento della MMP3 sembra essere necessario per l'appropriato rimodellamento tissutale e per la prevenzione delle tendinopatie mentre tale MMP è *downregolata* nelle tendinopatie ed in presenza di rotture tendinee. Secondo alcuni Autori, una diminuzione della espressione di MMP3 può pertanto portare ad alterazioni tendinopatiche (Magra M, Maffulli N. 2005).

Infine, la produzione di IL-1 α , citochina con un ruolo chiave nella risposta infiammatoria ed immunitaria (Bankers-Fulbright *et al.* 1996, Archambault *et al.* 2002, Tsuzaki *et al.* 2003), ha mostrato valori significativamente maggiori nei Gruppi *Non Allenati* e *Detrained-NaCl* rispetto agli altri Gruppi.

Differenze istologiche, sia a livello del tendine rotuleo destro che della sua entesi, sono state rilevate nei diversi Gruppi sperimentali presi in esame. Il tendine rotuleo dei ratti Non Allenati, ha evidenziato la presenza di fibre collagene talora disorganizzate, mentre il tendine rotuleo dei ratti allenati ha mostrato fibre collagene maggiormente organizzate con rari nuclei allungati visibili tra le fibre ed un aumentato numero di microtears di piccole dimensioni. Per quanto riguarda i tendini del Gruppo Detrained-NaCl, le fibre collagene presentano una struttura talora disorganizzata con alterazioni a livello della struttura e della morfologia. I tendini rotulei del Gruppo Detrained-HA hanno mostrato struttura e morfologia simile a quella presente nel gruppo Trained con fibre collagene disposte longitudinalmente e con presenza di rari nuclei distribuiti lungo la lunghezza del tendine ma con minore presenza di microtears.

I risultati istomorfometrici sulla valutazione di cellularità, microtearing e percentuale di collagene I, II e III, sono in accordo con i risultati istologici ottenuti. La cellularità ha mostrato valori maggiori nei Gruppi Non Allenati e Detrained-NaCl ove si è osservata una biosintesi del collagene III significativamente superiore rispetto ai Gruppi Trained e Detrained-HA. Contrariamente la produzione di collagene I e II presentava valori significativamente maggiori nei Gruppi Trained e Detrained-HA suggerendo quindi una superiore efficienza tessutale e metabolica di questi ultimi.

Mentre i tears di dimensioni circa 1 cm² sono clinicamente misurati con analisi ultrasonografiche e risonanza magnetica in presenza di tendinopatie, per quanto di conoscenza, non esistono valutazioni quantitative né precliniche né cliniche di microtears per la valutazione del tendine patellare nelle fasi di allenamento o detraining. E' bene, inoltre, sottolineare come gli unici dati di riferimento esistenti in letteratura per le valutazioni morfometriche dei microtears siano relativi al tendine di Achille di ratto (Nakama et al. 2005, Silva et al. 2011). Nella presente ricerca, la quantificazione del numero di microtears per unità di superficie del tendine rotuleo ha evidenziato come nel Gruppo Trained questi fossero superiori rispetto ai Gruppi Non Allenati e Detrained-HA. La distribuzione logaritmica dei microtears per dimensione per ciascun Gruppo sperimentale ha inoltre rilevato valori di densità più alti nel Gruppo Trained rispetto al Gruppo Non Allenati. In particolare, i microtears osservati per unità di superficie del tendine rotuleo del Gruppo Detrained-HA presentavano i valori più bassi.

Ulteriori analisi sono state eseguite per valutare la struttura, la morfologia e le caratteristiche istologiche dell'entesi rotulea destra. Il risultato dello score istologico semi-quantitativo ha messo in evidenza che i Gruppi *Non Allenati* e *Detrained-NaCl* presentano valori maggiori rispetto ai Gruppi *Trained* e *Detrained-HA* con particolare riguardo ai parametri inerenti a colorazione della matrice extracellulare, integrità del tidemark, morfologia della cartilagine e struttura dell'entesi patellare. Tali risultati indicano che la struttura dell'entesi rotulea risente delle condizioni di sospensione dell'attività fisica e che il trattamento con acido ialuronico influenza il mantenimento della stessa durante il periodo di *detraining*, così come osservato per il tendine patellare.

Per quanto riguarda i campioni analizzati, l'oggetto della presente relazione riguarda l'analisi cellulare, istologica/istomorfometrica dei tendini e dell'entesi nei Gruppi trattati con NaCl e HA dopo *detraining* e dei corrispondenti tessuti nei Gruppi Non Allenati e *Trained*. Tuttavia, si è proceduto all'inclusione istologica dei tendini sinistri (non trattati) di cui sono state riportate due immagini esemplificative (Figure 7 e 9).

In conclusione, nel *setting* sperimentale adottato, i risultati osservati nella presente ricerca su struttura e morfologia del tendine patellare e della sua entesi confermano che l'allenamento e l'arresto improvviso dell'attività fisica hanno effetti su cellule e struttura del tendine patellare di ratto e che l'iniezione peritendinea di acido ialuronico durante il periodo di inattività ha effetti significativi su metabolismo cellulare e struttura del tessuto del tendine patellare stesso rispetto al trattamento con soluzione fisiologica.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Archambault JM, Elfervig-Wall MK, Tsuzaki M, Herzog W, Banes AJ. Rabbit tendon cells produce MMP-3 in response to fluid flow without significant calcium transients. *J Biomech.* 2002;35(3):303-9.
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci.* 1996;59(2):61-83.
- Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat.* 2006;208(4):471-90
- Bernard-Beaubois K, Hecquet C, Hayem G, Rat P, Adolphe M. In vitro study of cytotoxicity of quinolones on rabbit tenocytes. *Cell Biol Toxicol.* 1998 Aug;14(4):283-92.
- Frizziero A, Fini M, Salamanna F, Veicsteinas A, Maffulli N, Marini M. Effect of training and sudden detraining on the patellar tendon and its enthesis in rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011 19;12:20.
- Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM, Hazleman BL, Riley GP. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. *Arthritis & Rheumatism* 2006; (54)3: 832–842
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11(4):447-55.
- Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(5):495-501.
- Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004;84(2):649-98.
- Maffulli N, Barrass V, Ewen SW. Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. *Am J Sports Med.* 2000;28(6):857-63.
- Magra M, Maffulli N. Matrix metalloproteases: a role in overuse tendinopathies. *Br Sports Med* 2005;39:789-791
- Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports.* 2003;13(4):211-23.
- Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM. Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1199-205.
- Orth P, Zurakowski D, Wincheringer D, Madry H. Reliability, reproducibility, and validation of five major histological scoring systems for experimental articular cartilage repair in the rabbit model. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(5):329-39.

- Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 20):3861-3.
- Rees SG, Waggett AD, Dent CM, Caterson B. Inhibition of aggrecan turnover in short-term explant cultures of bovine tendon. *Matrix Biol.* 2007;26(4):280-90.
- Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. *J Orthop Res.* 1995;13(4):585-93.
- Silva RD, Glazebrook MA, Campos VC, Vasconcelos AC. Achilles tendinosis: a morphometrical study in a rat model. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(7):683-91.
- Torricelli P, Veronesi F, Pagani S, Maffulli N, Masiero S, Frizziero A, Fini M. In vitro tenocyte metabolism in aging and oestrogen deficiency. *AGE* 2012; *In press*
- Tszaki M, Guyton G, Garrett W, Archambault JM, Herzog W, Almekinders L, Bynum D, Yang X, Banes AJ. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. *J Orthop Res.* 2003;21(2):256-64.