INDICE

1. INTRODUZIONE 3

2. ARTROSI 5

2.1 Epidemiologia 6

2.2 Eziologia 7

2.3 Patogenesi 10

2.4 Clinica 16
2.4.1 Osteoartrosi di ginocchio 16
2.4.2 Osteoartrosi di anca 17

2.5 Imaging 19
2.5.1 Radiografia (RX) 20
2.5.2 Risonanza Magnetica (RMN) 21

2.6 Classificazioni 22
2.6.1 Classificazione radiologica 22
2.6.2 Classificazione artroscopica 24

2.7 Trattamento dell'osteoartrosi di anca e ginocchio 26
2.7.1 Trattamento conservativo non farmacologico 26
2.7.2 Trattamento conservativo farmacologico 28
2.7.3 Trattamento chirurgico dell'artrosi di ginocchio 34
2.7.4 Trattamento chirurgico dell'artrosi di anca 38

3. RUOLO DEI MASTOCITI NELLE ARTRITI INFIAMMATORIE 40

3.1 Biologia base del mastocita 41

3.2 Attivazioni del mastocita 41
3.2.1 Attivazione IgE mediata 42
3.2.2 Attivazione non IgE mediata 43

3.3 I mastociti nella membrana sinoviale normale e infiammata. 46

3.4 Modello murino K/BxN per lo studio dell'artrite 48

3.5 Ruolo del mastocita sinoviale nell'iniziazione dell'artrite 49

3.6 Ruolo dei mastociti sinoviali nell'artrite cronica 51

4. SODIO CROMOGLICATO 52

4.1 Farmacocinetica e farmacodinamica 52

4.2 Indicazioni terapeutiche 53

4.3 Effetti collaterali e tossicità 55

5. STUDIO SPERIMENTALE: TRATTAMENTO INFILTRATIVO PER L'OSTEOARTROSI DI GINOCCHIO MEDIANTE SODIO CROMOGLICATO E ACIDO IALURONICO 55

5.1 INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO 55

5.2 MATERIALI E METODI 57

5.2.1 Pazienti artrosici 57
5.2.2 Dati clinici e radiologici 60
5.2.3 Gruppi di controllo 60
5.2.4 Istochimica e immunoistochimica dei campioni 60
5.2.5 Analisi statistica 62
5.2.6 Co-coltura mastociti 62
5.2.7 Test di tossicità 64
5.2.8 Analisi statistica 65

5.3 RISULTATI 65

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI 81

7. BIBLIOGRAFIA 85

1. INTRODUZIONE

L'Osteoartrosi (OA) è una patologia che coinvolge le articolazioni sinoviali, caratterizzata da degradazione della matrice extracellulare e degenerazione cellulare causati da un micro e macro danno cartilagineo. Tale danno è responsabile dell'attivazione di risposte mal adattative che comprendono l'attivazione dell'immunità innata e pathways infiammatori. Gli elementi caratteristici dell'artrosi sono rappresentati da: degenerazione cartilaginea, formazione di osteofiti a margine dell'articolazione coinvolta, sclerosi dell'osso subcondrale, degenerazione cartilaginea, infiammazione della membrana sinoviale e alterazione della capsula articolare (1). Sebbene la presenza di sinovite in questa patologia sia nota, l'Artrosi è classificata come un disordine non infiammatorio, in quanto la conta leucocitaria nel liquido sinoviale artrosico è tipicamente al di sotto di 2000 cellule per mm^3, cut-off che definisce un disturbo infiammatorio (2). Il coinvolgimento della membrana sinoviale si verifica sia nelle fasi iniziali, che nelle fasi tardive dell'artrosi. Studi effettuati utilizzando Ecografia e Risonanza Magnetica hanno dimostrato che lo stato infiammatorio è presente nelle articolazioni artrosiche anche quando esse sono caratterizzate da un danno cartilagineo limitato o in cui la sinovite non è clinicamente evidente (3) (4). Forti indicatori di sinovite sono i sintomi clinici come versamento articolare, dolore notturno e rigidità mattutina della durata di almeno 30 minuti. In aggiunta, la presenza di infiammazione sinoviale adiacente alle lesioni cartilaginee (5) e l'associazione, descritta in letteratura, tra il grado di sinovite e la progressione radiologica della patologia (6), indicano che l'infiammazione della membrana sinoviale è un fattore cruciale nella patogenesi e progressione dell'artrosi. Molte sono le cellule responsabili della sinovite: linfociti T, macrofagi e mastociti

(MCs) sono le più rappresentative (7). Diverse ricerche riportano che il grado di infiltrazione delle cellule infiammatorie e l'espressione di citochine pro-infiammatorie sono maggiori nell'Artrite Reumatoide (AR) rispetto all'artrosi, ma allo stesso tempo è stato evidenziato che i mastociti sono maggiori nell'artrosi rispetto all'AR. Ciò indica che l'infiammazione della membrana sinoviale nell'OA è minore rispetto a AR, ma l'infiltrato infiammatorio può avere caratteristiche qualitativamente diverse (8). Nonostante queste evidenze, pochi sono stati gli studi condotti nei confronti dei mastociti sinoviali e pertanto il ruolo delle MCs nella sinovite e nella fisiopatologia dell'artrosi è ancora lontano dall'essere compreso. Le MCs contengono nei loro granuli una grande varietà di sostanze pro-infiammatorie ed enzimi in grado di richiamare cellule infiammatorie, portare all'attivazione della membrana sinoviale, alla distruzione dell'osso e stimolare l'angiogenesi (9). Con questi presupposti e sulla base delle conoscenze sui cromoni, nello specifico sul sodio cromoglicato, per cui questi farmaci inibiscono l'attività dei mastociti e altre cellule infiammatorie coinvolte direttamente nella sinovite caratteristica dell'osteoartrosi, abbiamo dato vita ad uno studio sperimentale. Lo scopo del nostro lavoro è quello di quantificare il ruolo specifico del sodio cromoglicato come inibitore dell'attività dei mastociti, sia senza che in combinazione con acido ialuronico, per uso nella complessa fisiopatologia e clinica dell'OA. Per questo motivo abbiamo analizzato la risposta della membrana sinoviale di soggetti artrosici sottoposti ad artroprotesi di anca e ginocchio. Appurata la completa tollerabilità del cromoglicato di sodio a livello intra-articolare e avendo confermato, da uno studio precedentemente condotto, il ruolo del mastocita sinoviale nella genesi artrosica, in primo luogo siamo andati a valutare la capacità del cromone di inibire l'attività dei mastociti. Per farlo abbiamo confrontato il valore di citochine tipiche del microambiente artrosico espresse nella co-cultura di mastociti e condrociti attivati con collagene II con aggiunta di sodio cromoglicato rispetto ai valori delle stesse nella co-cultura senza aggiunta. In secondo luogo,

dal momento che l'infiltrazione di acido ialuronico rappresenta ormai una pratica standardizzata e diffusa nel trattamento della sintomatologia dell'artrosi di ginocchio, abbiamo creato una formulazione di una soluzione composta da quest'ultimo in associazione con sodio cromoglicato. La combinazione dei due composti, superati i test di tossicità, potrebbe rappresentare un trattamento innovativo.

2. ARTROSI

L'artrosi è una patologia degenerativa della cartilagine articolare dovuta ad uno squilibrio tra le sollecitazioni funzionali e la resistenza della cartilagine. In prima battuta il danno è limitato al tessuto cartilagineo, ma progressivamente interessa tutti i tessuti intra-articolari divenendo una patologia che coinvolge in toto l'articolazione. Propriamente viene classificata in Primaria e Secondaria in relazione alla presenza o meno di patologie sottostanti (10). La forma Primaria si suddivide in:

- Alterazione primaria della cartilagine articolare
- Degenerazione senile
- Condromalacia idiopatica

La Forma Secondaria invece può essere conseguenza di diverse condizioni:

- Displasia congenita

- Traumi
- Osteocondrosi
- Infezioni
- Malattie del connettivo
- Artriti reumatiche
- Obesità-sovraccarico
- Malattie metaboliche ed endocrine
- Malattie vascolari e neurologiche

2.1 Epidemiologia

La patologia artrosica oggigiorno ha un importante impatto sul benessere e sulla capacità lavorativa individuale (40) in quanto, a causa del dolore, possono venir compromessi. È una delle affezioni croniche più comuni nella popolazione generale e allo stesso tempo la causa più comune di disabilità nell'anziano (11) (12). Molteplici studi affermano che il ginocchio e l'anca rappresentano le sedi più spesso interessate. Studi epidemiologici calcolano 43 milioni di persone affette da osteoartrosi nei soli Stati Uniti, 4 milioni in Italia e un totale di circa il 15% della popolazione mondiale (13) (14). In Italia l'incidenza è intorno ai 100.000 nuovi casi all'anno (15) e per quanto riguarda i costi, si stima una spesa annua intorno ai 7.5 milioni di euro (16). La spesa globale annua è valutata intorno ai 455 euro pro-capite, dipartiti in 293 euro per la terapia, 122 per la diagnostica e 44 euro per la prevenzione della gastropatia da farmaci (17). Sulla base soprattutto dell'aumento dell'aspettativa di vita globale e di conseguenza

dell'età media della popolazione, il dato significativo è come le stime siano concordi nel prevedere un ulteriore aumento dell'incidenza della patologia. Le proiezioni suggeriscono che nel 2030 saranno più di 67 milioni i pazienti affetti da osteoartrosi nei soli Stati Uniti (18).

2.2 Eziologia

L'eziologia dell'Osteoartrosi è multifattoriale ed i diversi studi succedutisi hanno identificato una serie di fattori di rischio che possono essere classificati in marcatori di rischio non modificabili, i quali comprendono:

- Età;
- Sesso;
- Eredità;
- Etnia (la patologia è più comune nelle popolazioni europee);
- Modificazioni post menopausali nelle donne.

Molto importanti allo stesso tempo sono i fattori di rischio che invece sono modificabili con una corretta educazione sanitaria e possono essere presenti o meno nei vari soggetti:

- Traumi;
- Sovraccarico funzionale;
- Sovrappeso, obesità, sindrome metabolica;
- Precedente chirurgia;
- Stile di vita (sedentarietà, alcol e fumo).

Il fattore di rischio più strettamente correlato alla patologia è l'età. È stato visto, infatti, che la probabilità di sviluppare osteoartrosi aumenta in maniera significativa ogni dieci anni a partire dai 45 anni di età (14). Le stime parlano di oltre il 50% della popolazione al di sopra dei 60 affetta da osteoartrosi (19). Uno studio americano del 2013 con l'intento di analizzare le ragioni di tale legame è giunto alla conclusione che i fattori chiave nello sviluppo dell'osteoartrosi correlata all'età sono rappresentati dall'invecchiamento della matrice cartilaginea e dalla senescenza dei condrociti (20). La visione classica in cui la relazione con l'età fosse imputabile esclusivamente al sovraccarico articolare e allo stress meccanico che si accumulano negli anni è stata pertanto cambiata. È stato infatti dimostrato che con l'avanzare dell'età si altera il bilancio biochimico necessario alla salute cartilaginea (21) (22). Chiaro è il legame con l'obesità, anch'essa considerata un fattore determinante (23). Per quanto riguarda la gonartrosi, l'obesità aumenta il rischio di sviluppare artrosi da 2 a 10 volte (24). Ciò è da attribuire soprattutto a fattori biomeccanici locali correlati al BMI, ma anche l'alterato allineamento dei capi articolari e la forza muscolare dei quadricipiti, i quali sono coinvolti sia nello sviluppo che nella progressione dell'osteoartrosi di ginocchio, hanno un ruolo determinante (25). Tuttavia, lo stretto legame esistente tra artrosi e obesità non sembra essere sufficientemente giustificato da tali elementi, anche perché è stato constato che l'obesità aumenta il rischio di malattia non solo nelle articolazioni sottoposte a carico come l'anca e il ginocchio, ma anche nelle articolazioni non sottoposte al peso corporeo come quelle delle mani o del polso (26). Leptina e adiponectina, molecole derivanti dal tessuto adiposo, sono strettamente associate con l'obesità; è stato visto come i livelli plasmatici di leptina sono correlati positivamente con il Body Mass Index (BMI) (27). Diversi studi riportano la capacità della leptina di stimolare la secrezione di citochine pro-infiammatorie come IL-1β, IL-6, IL-8, ossido nitrico e metallo proteinasi (MMPs) da parte dei condrociti articolari (28). Facendo riferimento in particolare

all'articolazione del ginocchio, per molto tempo si è ipotizzato che il tessuto adiposo intra-articolare (corpo di Höffa) potesse avere un ruolo importante nella gonartrosi (29). È stato recentemente evidenziato che il corpo di Höffa è una fonte di importanti mediatori flogistici implicati nella degradazione cartilaginea e nell'infiammazione della membrana sinoviale come TNFα, IL-6, leptina, fattore di crescita endoteliale (VEGF), e fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF) (30). All'interno del corpo di Höffa, le possibili fonti di questi mediatori sono due: gli adipociti e l'infiltrato infiammatorio presente all'interno del tessuto adiposo. Nello studio di Chuckpaiwong B e colleghi (31), non è stata obiettivata correlazione tra il tessuto adiposo intra-articolare e il BMI, ma Jedrzeczyk riporta che un più alto valore di BMI è correlato con un aumento del numero di adipociti e di infiltrato cellulare immunitario all'interno del corpo di Höffa (32). Nonostante Gross JB (33) ha recentemente affermato che leptina e adiponectina potrebbero non avere effetti infiammatori e degradativi nelle cellule articolari, non si esclude che potrebbero essere coinvolti altri mediatori liberati dal tessuto adiposo intra ed extra articolare, però non ancora individuati. Un altro fattore di rischio coinvolto è il sesso, infatti al di sotto dei 50 anni è evidente una prevalenza nel sesso maschile (62), mentre dopo i 65 anni, ipoteticamente per via della menopausa, le donne sono interessate in quantità doppia rispetto agli uomini (63). Anche grazie agli studi di Spector et al., la predisposizione genetica ha recentemente assunto un ruolo di rilievo: i casi attribuibili esclusivamente alla mutazione di un gene sono rari, mentre più probabile sembra una predisposizione sulla quale agiscono i noti fattori di rischio (patogenesi multifattoriale) (34). Ormai assodato è il ruolo dei traumi, in particolare l'esistente legame tra la lesione del menisco e lo sviluppo di artrosi. Tramite uno studio anatomo-patologico post-mortem, è stato evidenziato, nelle articolazioni di soggetti che avevano subito lesioni meniscali, le stesse alterazioni individuabili nelle ginocchia dei pazienti affetti da artrosi età correlata: ridotta densità cellulare, degenerazione mucoide e perdita della

organizzazione delle fibre collagene (35). Riguardo l'etnia, il British Medical Journal ha pubblicato uno studio secondo cui la popolazione cinese e di pelle nera presentano tassi di incidenza maggiori (36). Infine, relativamente al ruolo dei microtraumi ripetuti e del sovraccarico biomeccanico, è stato evidenziato che il carico meccanico occupazionale può causare o aggravare lo sviluppo di osteoartrosi (37). In particolare, ciò è evidente in coloro i quali proseguano un lavoro di carico per un lungo periodo di tempo e fino ad età avanzata (38).

2.3 Patogenesi

Oggigiorno è stato ben definito come l'artrosi non sia una patologia con esclusivo coinvolgimento della cartilagine e allo stesso modo come il binomio artrosi e artrite non indichi due entità completamente distinte. Ci sono numerose evidenze che definiscono come l'artrosi sia una patologia dell'intera articolazione e come l'infiammazione della membrana sinoviale stia prendendo sempre più ruolo nella patogenesi della malattia (39). Sebbene per molto tempo l'artrosi sia stata definita come una patologia non infiammatoria, studi istologici di frammenti di membrana sinoviale hanno descritto un infiltrato infiammatorio che in alcuni casi era indistinguibile da quello osservato nell'artrite reumatoide (40) (41). Per tali ragioni, si è abbandonata la teoria del "wear and tear" abbracciando la nuova teoria infiammatoria, considerando i numerosi mediatori chimici secreti da sinovia, cartilagine e osso. I primi studi evidenziavano la presenza di infiammazione della membrana sinoviale nei frammenti ottenuti durante gli interventi di chirurgia protesica, motivo per cui era in discussione se l'infiammazione fosse una conseguenza del processo artrosico oppure potesse ricoprire un ruolo patogenetico. A tale proposito nel 2002, Ohler e colleghi esaminarono frammenti di membrana sinoviale prelevati da soggetti con artrosi agli gli stadi iniziali fino a stadi più avanzati (42),

arrivando all'identificazione di quattro possibili pattern di infiammazione sinoviale: iperplastica, fibrotica, infiammatoria e metaplastica. Il pattern fibrotico, caratterizzato da una marcata deposizione di collagene, e quello metaplastico, caratterizzato dalla presenza di foci ossei e cartilaginei, sono stati osservati prevalentemente negli stadi più avanzati di artrosi. Il pattern iperplastico, isolato o associato in combinazione con altri pattern, caratterizzato da iperplasia dello strato intimale e dalla presenza di villi, è stato osservato prevalentemente negli stadi iniziale di malattia. Il pattern infiammatorio invece, caratterizzato dalla presenza di infiltrato cellulare rappresentato da linfociti e plasmacellule che può essere diffuso o organizzato in pattern perivascolari, è stato osservato sia nelle fasi iniziali che nelle fasi terminali di malattia. Molto utile è il cosiddetto "synovitis score": un metodo istologico semi-quantitativo che, tenendo in considerazione tre caratteristiche distinte, definisce l'infiammazione della membrana sinoviale. Si valuta: 1. lo spessore dello strato intimale, 2. l'infiltrato infiammatorio e 3. la cellularità dello stroma. Per ogni parametro si assegna un punteggio da 0 a 3 e poi si somma. Usando tale score, Kreen e colleghi hanno osservato che il synovitis score è minore nei frammenti prelevati da artrosi rispetto a quelli dell'artrite reumatoide, ma pur sempre superiori rispetto ai controlli normali (43). Questi pattern istopatologici non hanno ancora mostrato forti correlazioni con la clinica o con meccanismi patogenetici della malattia, ma allo stesso tempo si è visto come nell'artrosi di ginocchio la presenza di un maggior synovitis score sia associata ad un peggioramento della sintomatologia tipica (44). Sebbene sia fuori discussione che il gold standard per valutare l'infiammazione della membrana sinoviale sia rappresentato dallo studio istologico dei frammenti, effettuare un prelievo bioptico di membrana sinoviale in ogni articolazione affetta da artrosi non è ragionevole, a causa dell'invasività della procedura. Allo stesso tempo, è ben noto che i classici segni di flogosi come versamento articolare, calore, dolore e rigidità mattutina che

rappresentano tutti i segni di una sottostante sinovite, non sempre sono evidenziabili. Per queste ragioni è risultato imperativo ricercare altre metodiche, non invasive, che potessero definire la presenza di sinovite anche in condizioni clinicamente silenti. Al giorno d'oggi le metodiche più diffuse e utilizzate sono la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) e l'ecografia articolare (US). Per quanto riguarda la RMN, molti sono gli score presenti in letteratura che valutano in maniera semi-quantitativa la presenza di sinovite (45) (46). Le più comuni metodiche effettuate senza mezzo di contrasto endovenoso tengono in considerazione il volume totale della membrana sinoviale e il grado di versamento presente all'interno dell'articolazione. L'utilizzo del mezzo di contrasto ha il vantaggio di definire in maniera molto più netta il versamento, dallo spessore della membrana sinoviale (47). Tramite la RMN con mezzo di contrasto, è stato visto che la sinovite è presente nel 95% dei casi in cui è presente il versamento, mentre nelle articolazioni prive di versamento è stato possibile osservare un ispessimento del panno sinoviale nel 70% dei casi (48). Queste scoperte testimoniano come l'infiammazione sinoviale sia indipendente dal versamento e, probabilmente, come l'ispessimento del panno sinoviale possa rappresentare un indicatore più sensibile di infiammazione sinoviale rispetto al versamento articolare. Rispetto alla RMN, una metodica altrettanto non invasiva, ma sicuramente a più basso costo e più disponibile anche nel territorio è rappresentata da US. L'ecografia permette di valutare la presenza di sinovite nelle articolazioni artrosiche e uno studio recentemente pubblicato ha mostrato che la sensibilità dell'US con mezzo di contrasto è sovrapponibile a quella della RMN con contrasto (49). In letteratura, molti sono gli studi che cercano di stabilire se la sinovite individuata mediante metodiche non-invasive corrisponda ad un'infiammazione osservabile sul piano istologico. Nel 1995 Fernandez et al. dimostrarono come le aree di sinovite osservate mediante RMN in pazienti con gonartrosi coincidevano istologicamente con aree a basso grado di infiammazione (50). Allo stesso modo altri due studi osservarono una corrispondenza tra

imaging e istologia (51) (52). Questi studi dimostrarono come RMN e US possono essere utilizzabili per valutare il grado di sinovite in un'articolazione e forniscono ulteriori evidenze sul ruolo chiave della sinovite nella patogenesi dell'artrosi. Sia le tecniche di imaging che gli studi istologici hanno evidenziato un'importante variabilità anatomica nella localizzazione della sinovite, almeno per quanto riguarda la gonartrosi: l'infiammazione è più localizzata rispetto all'artrite reumatoide e soprattutto si trova prevalentemente adiacente alle lesioni cartilaginee (40). Oltre alla clinica, alla localizzazione e all'imaging, un altro aspetto molto importante che riguarda l'infiammazione della membrana sinoviale è la sua possibile correlazione con lo stadio radiologico di malattia (5). Nonostante infatti, il metodo per individuare l'infiammazione possa variare, ci sono pareri concordi nel ritenere che la prevalenza e la severità della sinovite siano in relazione all'estensione del danno cartilagineo e stadio radiologico (44). Tramite US, Conaghan e colleghi dimostrarono che l'infiammazione della membrana sinoviale rappresenta un valore prognostico nel caso di una sostituzione protesica nei successivi 3 anni (53). Ancora oggi non è ben chiaro quali siano i pathways e mediatori che intervengono nello sviluppo e persistenza della sinovite. Sebbene la stragrande maggioranza degli studi siano stati effettuati per lo studio dell'artrite reumatoide, ruolo chiave nell'artrosi sembra essere l'attivazione dell'immunità innata (44). Recenti studi infatti, sembrano dimostrare come frammenti di matrice cartilaginea e mediatori rilasciati dai condrociti a seguito di condizioni di stress possano attivare le cellule dell'immunità innata tramite i cosiddetti Toll-Like Receptor (TLR) posti sulla loro superficie. Tale attivazione porta all'aumento della sintesi del fattore di trascrizione NFkB che svolge un ruolo centrale nella risposta infiammatoria in quanto porta alla produzione di molteplici mediatori, citochine pro-infiammatorie e metallo-proteinasi possibili responsabili del danno cartilagineo (54). Ruolo importante nell'infiammazione della membrana sinoviale sembra essere ricoperto anche

dall'attivazione dei macrofagi sinoviali (sinoviocita A) (55) e dalla cascata del complemento. L'attivazione della risposta innata inizia con l'attivazione dei TLR che, posti sulla superficie delle cellule dell'immunità innata, hanno la capacità di determinare l'avvio di un signaling intracellulare che porta all'attivazione della risposta infiammatoria. I TLR normalmente hanno la capacità di legare i profili molecolari associati al patogeno (PAMPs) presenti sulla parete del microrganismo (56) permettendone l'eliminazione. Nell'ambito della patogenesi dell'artrosi, i TLR sembrano avere la capacità di legare i cosiddetti profili molecolari associati al danno (DAMPs) derivanti dalla degradazione della matrice cartilaginea (57) piuttosto che da ligandi provenienti da microrganismi. Sono stati individuati ben dieci forme di TLRs che hanno una funzione nell'uomo. Questi recettori sono espressi da una grande varietà di cellule che include macrofagi e mastociti (56). I TLR 1-7 e 9 sono stati individuati nella membrana sinoviale artrosica e reumatoide. In aggiunta, studi in vitro hanno mostrato come il sinoviocita B risponde a molti TLR agonisti (58) (59). L'attivazione dei TLRs nella membrana sinoviale porta alla sintesi del fattore di trascrizione NFkB e alla sintesi conseguente di chemochine (IL-8, CCL5) e citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6, TNF che hanno la capacità di determinare il reclutamento di altre cellule immunitarie come macrofagi, granulociti e linfociti (60). Alcuni dei DAMPs capaci di attivare l'immunità innata e derivanti dalla degradazione della matrice cartilaginea sono stati individuati e sono rappresentati da: tenascina C (61), fibronectina (62), acido ialuronico basso peso (63) e biglicano (64). È importante sottolineare però come nonostante sia ben chiaro oramai che i TLRs partecipano in maniera attiva alla patogenesi dell'artrosi, la loro funzione non è ancora completamente chiarita. È stato visto infatti, in modello murino di artrite autoimmune, che il deficit di TLR-4 risulta in una minor severità di artrite testimoniata da un minor danno osseo e cartilagineo. Allo stesso tempo, il deficit di TLR-2 è accompagnato da una maggior severità di malattia (65) suggerendo un ruolo protettivo per

la patologia. Studi hanno evidenziato che sia il TLR-2 che il 4 sono up regolati nei condrociti artrosici (66) e in studi in vitro con estratti cartilaginei murini si è evidenziato che tali TLRs sono associati ad un aumento della sintesi di MMP-3 e MMP-13 (67). Un recente studio genetico cinese ha dimostrato un particolare polimorfismo genetico riguardante il TLR-9 associato ad un maggior rischio di sviluppare artrosi di ginocchio, cosa invece non osservata con polimorfismi genetici relativi a TLR-2 e 4 (68). Negli ultimi anni, sempre più evidenze sembrano dare anche al complemento un ruolo importante nella eziopatogenesi dell'artrosi, anche se ancora gli studi sono limitati e i risultati contrastanti. Agli inizi degli anni '90, Cantatore FP e colleghi osservarono frammenti del complemento nella membrana sinoviale di pazienti che avevano lesioni meniscali e danno cartilagineo (69), mentre un aumento di tale deposito furono osservati durante una riacutizzazione della patologia artrosica (70). L'attivazione del complemento e dei TLRs tramite i DAMPs porta, tramite il signaling intracellulare di condrociti, mastociti e sinoviociti alla sintesi di un gran numero di mediatori e citochine pro infiammatorie come l'IL-1 e TNF-α. L'IL-1 ha molteplici effetti nell'omeostasi articolare. Innanzitutto tale citochina ha la capacità di avere un importante effetto catabolico in vitro sulla cartilagine (71), ha la capacità di inibire la sintesi di aggrecano (72) e collagene (73), mentre nei condrociti up regola la sintesi di enzimi proteolitici come ADAMTS-4 (74) e MMP-13 (75). Tuttavia, è stato anche visto che il suo livello nel liquido sinoviale non è costantemente elevato (76) e la sintesi del suo recettore (antagonista naturale della citochina) è molto maggiore nell'artrosi rispetto all'artrite reumatoide (77).

2.4 Clinica

2.4.1 Osteoartrosi di ginocchio

La diagnosi dell'osteoartrosi di ginocchio si fonda in primis sulla clinica, con l'identificazione dei caratteristici sintomi. Tale patologia presenta una sintomatologia estremamente variabile poiché dipende dalle caratteristiche soggettive della persona e dalla richiesta funzionale a carico dell'articolazione. I sintomi più significativi sono rappresentati da: dolore e rigidità articolare, gonfiore, riduzione della funzionalità, rumore di cigolio o crepitio durante il movimento articolare (78). L'andamento della sintomatologia solitamente è caratterizzato da un inizio graduale, che conduce poi ad una storia di prolungato disagio con momenti di acuzie del dolore con variazioni nella sintomatologia stessa a lenta comparsa (79). La sintomatologia algica, tipicamente, esordisce con un dolore all'inizio del movimento non particolarmente acuto. Tende a diventare continuo progressivamente, evolvendo dalla presenza solo durante le attività di lavoro di carico fino alla presenza anche a riposo, durante il sonno. In alcuni casi, ad esempio nei pazienti che dopo una vita lavorativa sedentaria intraprendono attività quali camminare, il dolore migliora nel corso degli anni in assenza di terapia. Di grande utilità sono le raccomandazioni dell'EULAR (European League Against Rheumatism): il principale sintomo dell'osteoartrosi è il dolore classicamente definito meccanico perché peggiora a fine giornata e si attenua col riposo ed è inoltre associato ad una sensazione di cedimento, impotenza funzionale e lieve rigidità mattutina (80). La stessa EULAR sottolinea che, nei casi più avanzati, il dolore diviene persistente e può comparire di notte. La rigidità mattutina non dura mai più di 30 minuti e può comparire anche dopo periodi di prolungata inattività. Se la patologia diviene di lunga data nel paziente si possono riscontrare segni obiettivi come restrizione dei movimenti, allargamento osseo e crepitio col movimento. Il paziente, inoltre, descrive il proprio disagio come un dolore profondo che abbraccia l'intera articolazione. Perciò fondamentale per

evidenziare la sintomatologia è l'esame obiettivo, che deve essere svolto in maniera sistemica a partire dall'andatura del paziente all'ingresso nell'ambulatorio. Facendo posizionare il paziente in clinostatismo si procede all'ispezione e palpazione dell'articolazione dolente al fine di individuare arrossamenti, aumenti di temperatura locali e tumefazioni, confrontando sempre con il ginocchio controlaterale. Molto importante sono anche gli stress test che devono essere effettuati indipendentemente dalla richiesta funzionale del soggetto o dall'età, in modo da valutare tutte le strutture fibrocartilaginee e legamentose all'interno del ginocchio.

I principali test sono rappresentati da:

- Valutazione della stabilità dei legamenti: stress in valgo e in varo per i legamenti collaterali e Drawer test per il crociato anteriore e posteriore;
- Esame manuale del menisco;
- Zohlen test: con il paziente ad arto esteso si esercita una lieve pressione sulla patella verso la fossa trocleare, invitando il paziente a mantenere in tensione il quadricipite femorale. Il test è considerato positivo se evoca dolore.

2.4.2 Osteoartrosi di anca

In analogia con l'artrosi di ginocchio, per quanto concerne la coxartrosi la clinica è estremamente variabile da soggetto a soggetto, almeno nelle fasi iniziali di malattia. I sintomi più caratteristici sono rappresentati da: dolore e rigidità articolare, riduzione della funzionalità gonfiore, rumore di cigolio o crepitio durante il movimento, ma tutto ciò dipende oltre che dall'età del soggetto anche dalla sua richiesta funzionale. Nonostante tale variabilità è possibile identificare diverse fasi della malattia. Nello stadio iniziale di artrosi d'anca i pazienti soffrono

di dolori periodici a livello dell'articolazione in relazione ad un'attività fisica di moderata/elevata intensità. La coxartrosi al primo stadio è una condizione alquanto subdola, poiché con il riposo il dolore tende a scomparire molto rapidamente e quasi completamente. Ciò induce i soggetti affetti da tale problematica a trascurare la sintomatologia dal carattere periodico e a non rivolgersi ad un medico. Successivamente il dolore assume nuovi aspetti: innanzitutto è di intensità maggiore rispetto al primo stadio; in secondo luogo riguarda una zona anatomica più ampia, interessando anche l'area inguinale e la parte anteriore della coscia; in terzo luogo, può determinare un senso di bruciore o pressione. Per quanto riguarda la relazione tra il dolore e livello di attività funzionale, in questa fase la sintomatologia algica può manifestarsi non solo in occasione di un movimento o un'attività fisica di una certa intensità, ma anche a riposo. L'intensità del dolore è tale che i pazienti hanno difficoltà a compiere determinati movimenti con l'arto sofferente: la sensazione dolorosa in atto pregiudica la normale mobilità articolare. Nell'ultima fase il dolore diventa una sensazione particolarmente intensa, costante (dolore cronico) e diffusa. I movimenti dell'anca risultano fortemente compromessi, al punto che i pazienti lamentano difficoltà anche durante le semplici attività quotidiane come camminare o salire una rampa di scale. Come nel caso della gonartrosi, l'esame obiettivo è fondamentale per evidenziare la patologia. L'obiettività è una parte molto importante e deve essere curata in ogni sua parte dall'osservazione dell'andatura del paziente fino all'esecuzione di test specifici. Oltre all'andatura è necessario valutare la cute, eventuali segni di pregressi traumi o interventi, misurare la lunghezza degli arti inferiori (da spina iliaca antero superiore fino a malleolo mediale). In seguito è imperativo valutare il ROM (range of motion) passivo del paziente e gli eventuali crepitii e dolore riferiti dal paziente. I principali test effettuati sono:

- Manovra Di Thomas: si afferra l'arto inferiore del paziente, che si trova in posizione supina, a livello del cavo popliteo, flettendolo il più possibile sull'articolazione del ginocchio. L'altra mano dell'esaminatore giace al di sotto del tratto lombare, che deve restare esteso sul piano sottostante. In caso di positività della manovra (se il tratto lombare si solleva) si può fare ipotesi di coxartrosi, che però entra in diagnosi differenziale con una iperlordosi fissa della colonna vertebrale.
- Test di Anvil: colpendo con il pungo il calcagno a ginocchio esteso il paziente avverte dolore nella regione dell'anca, indice di coxopatia e/o lesioni ossee di bacino.
- Test calcagno-ginocchio: permette di evidenziare una riduzione della motilità dell'anca; il paziente è supino e colloca il calcagno sopra al ginocchio controlaterale esteso, abducendo e ruotando il più possibile l'anca esaminata, in modo da porre la faccia laterale del ginocchio flesso sul piano del lettino.

2.5 Imaging

Nonostante la diagnosi di Osteoartrosi, nella maggior parte dei casi, possa essere effettuata con clinica ed esame obiettivo, il ricorso all'imaging è sempre consigliato, sia per la conferma diagnostica, sia per la precisa quantificazione del coinvolgimento articolare. Il primo esame richiesto convenzionalmente è la Radiografia convenzionale, tuttavia questa presenta notevoli limitazioni rispetto all'RM che offre una descrizione più completa evidenziando la cartilagine, la membrana sinoviale e l'osso sub-condrale (81). Ciò è dovuto anche alla capacità della RM di evidenziare alterazioni strutturali in una fase più precoce della malattia, ovvero quando l'RX risulta ancora negativa (82).

2.5.1 Radiografia (RX)

A causa della bassa sensibilità dell'esame, questo non permette la diagnosi precoce di osteoartrosi. Tuttavia, la positività all'RX rende superflua l'esecuzione di altri esami. I principali pattern radiografici, diagnostici di osteoartrosi, sono: restringimento dello spazio articolare, osteofiti, sclerosi sub condrale, cisti subcondrali (83). Per quanto riguarda la radiografia del ginocchio (*figura 1*), i valori più affidabili della riduzione dello spazio articolare e delle alterazioni ossee sono ottenuti con l'RX in flessione, al contrario dell'RX in estensione sia sotto carico che senza che non offre risultati ottimali (84). La proiezione antero-posteriore è inoltre da preferirsi rispetto alla latero-laterale (85). Per quanto riguarda la coxartrosi (*figura 2*) invece, è sufficiente una radiografia nelle due proiezioni standard (anteroposteriore di bacino e assiale d'anca).



Figura 1:
a sinistra: articolazione artrosica
a destra: articolazione normale

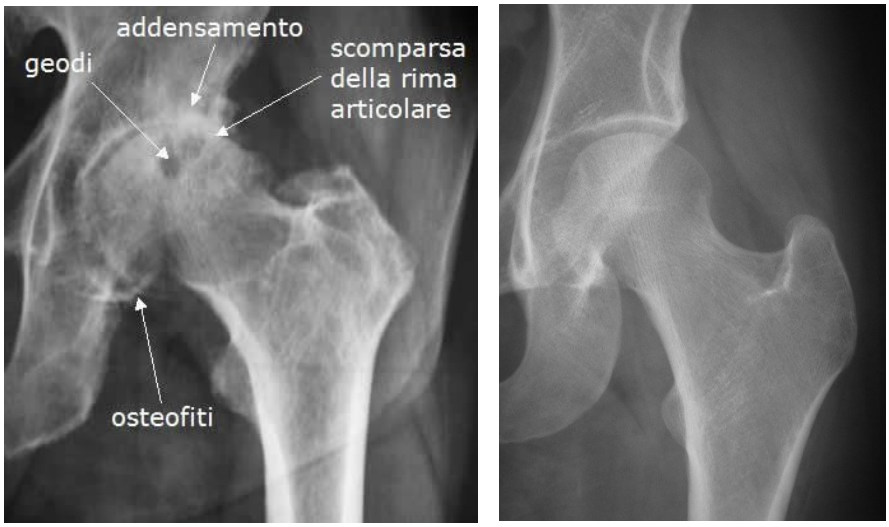


Figura 2:
a sinistra: articolazione artrosica
a destra: articolazione normale

2.5.2 Risonanza Magnetica (RMN)

Questo esame non è necessario per la maggior parte dei pazienti con una sintomatologia tipica di osteoartrosi e positività per la stessa all'RX. Come indicato precedentemente tuttavia, ha una sensibilità tale da individuare le alterazioni precoci della cartilagine, membrana sinoviale e osso sub-condrale (*figura 3*) (81).

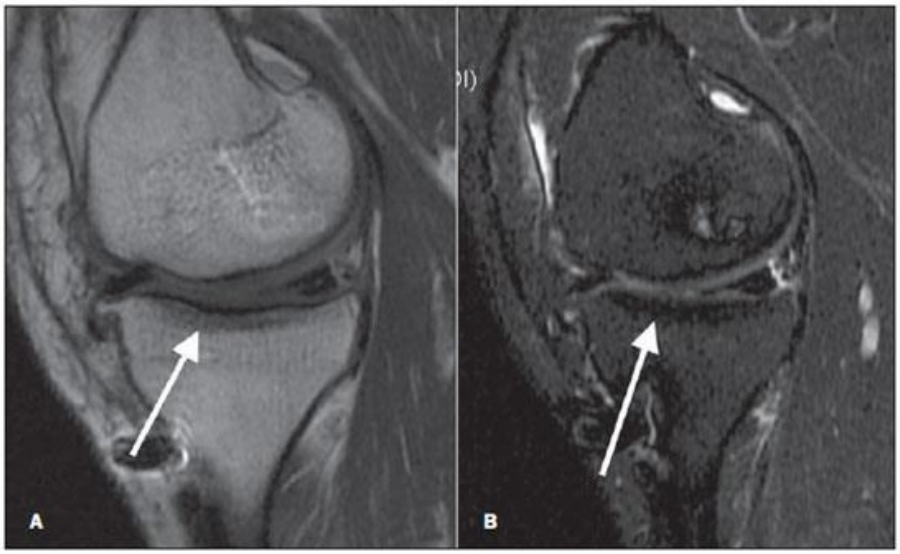


Figura 3: Immagine all'RM di Osteoartrosi di grado severo. RM del ginocchio sezione sagittale, T1- (A) e T2-pesata (B) immagine con soppressione del grasso. Segni di marcata inclinazione del piatto tibiale e moderata perdita della concavità con rettificazione del condilo femorale, associazione di segni di sclerosi sub condrale nel piatto tibiale, suggestione di logoramento osseo sul piatto tibiale mediale e sul condilo femorale. Segni di coinvolgimento della cartilagine ialina rappresentati dai cambiamenti di intensità del segnale.

2.6 Classificazioni

2.6.1 Classificazione radiologica

La classificazione radiologica dell'osteoartrosi è si basa sulla storica Classificazione di Kellgren-Lawrence (86). Questo sistema di stadiazione è stato introdotto nel 1957 e nel 1961 è stato adottato dalla WHO. Tale classificazione prende in analisi i principali pattern radiografici che caratterizzano l'osteoartrosi:

• Spazio articolare: all'Rx è visibile l'osso, ma non la cartilagine che lo ricopre; un'articolazione fisiologica si presenta, dunque, con uno spazio tra i due capi ossei. Qualunque riduzione di questo spazio rappresenta una riduzione della componente cartilaginea.

• Osteofiti: piccole proiezioni di tessuto osseo che si formano ai margini dell'articolazione. Sono considerati un tentativo del corpo di compensare la riduzione della superficie articolare per aumentare l'area di scarico del peso corporeo.

• Sclerosi: rappresenta un'area di iperdensità alla radiografia, che sottintende un ispessimento dell'osso sub condrale alla cartilagine usurata.

Analizzando questi 3 elementi, è stato possibile classificare l'artrosi in 4 gradi.

Classificazione di Kellgren-Lawrence:

- Grado 1: Principio di artrosi, comparsa di osteofiti;
- Grado 2: Osteofiti presenti, possibile riduzione della rima articolare;
- Grado 3: Osteofiti presenti, riduzione della rima articolare, sclerosi sub-condrale, possibile deformità articolare;

- Grado 4: numerosi osteofiti, capi articolari a contatto, sclerosi evidente, deformità presente.

Per anni questa classificazione ha rappresentato il principale punto di riferimento per clinici e ricercatori, tuttavia, presenta non poche criticità. Il primo limite evidenziato è dato dal fatto che è proprio la presenza di osteofiti che fa definire come primo elemento un'articolazione artrosica, ma tale criterio è considerato da molti ricercatori troppo aspecifico per la diagnosi (87). Fin dall'inizio, dunque, nonostante venga ancora utilizzata, la sua inesatta descrizione ha sollevato la necessità di una nuova e più precisa classificazione (88). Ulteriori studi hanno dimostrato che nella classificazione di Kellgren-Lawrence la correlazione clinico radiologica non è precisa. Gli studi sono concordi infatti nel riconoscere una relazione col dolore per quanto riguarda la presenza degli osteofiti, ma tale correlazione non si mantiene rispetto alla riduzione dello spazio articolare (89). Interessante è lo studio di Hart che dimostra come non ci sia differenza statisticamente significativa tra la sintomatologia dell'osteoartrosi di primo grado secondo Kellgren Lawrence e quella di secondo grado (90). In definitiva l'eccessiva enfasi sugli osteofiti nei primi stadi e la mancata valutazione della riduzione dello spazio articolare negli stessi hanno spinto molti gruppi di ricerca a mettere da parte questa classificazione (91). La classificazione radiologica che si è ormai affiancata a quella di Kellgren Lawrence è quella di Ahlbäck che si basa sulla valutazione della riduzione dello spazio articolare (92). Questa classificazione, pur datando oltre 50 anni, risulta essere la più citata in Letteratura sia per il follow-up che per studi epidemiologici (97).

Classificazione di Ahlbäck:

- Stadio I: riduzione dello Spazio Articolare (con o senza sclerosi ossea subcondrale). La Riduzione dello spazio Articolare è definita da uno spazio inferiore a 3 mm, o inferiore della metà dello spazio negli altri compartimenti;
- Stadio II: obliterazione dello spazio Articolare;
- Stadio III: perdita ossea <5 mm
- Stadio IV: perdita ossea tra 5 e 10 mm
- Stadio V: perdita ossea >10 mm, spesso con sublussazione e artrosi negli altri compartimenti.

2.6.2 Classificazione artroscopica

Da un punto di vista artroscopico è possibile classificare l'artrosi in base al danno cartilagineo osservato. Sono state proposte diverse classificazioni per valutare l'entità della lesione condrale in base all'aspetto morfologico macroscopico e alla sede. Attualmente le classificazioni più utilizzate sono tre: Outerbrigde (93), Noyes-Stabler (94) e quella di ICRS (95).

Classificazione di Outerbrigde:

- Grado 1: superficie articolare tumefatta, morbida, ricoperta di vescicole;
- Grado 2: la superficie articolare presenta solchi e fessurazioni di diametro inferiore a 1 cm;
- Grado 3: la superficie articolare presenta solchi e fessurazioni di diametro superiore a 1 cm;

- Grado 4: presenza di erosione della cartilagine a tutto spessore e coinvolgimento dell'osso sub-condrale.

Classificazione di Noves-Stabler:

- Grado I: superficie articolare integra
    - A: presenza di piccola zona di rammollimento cartilagine articolare;
    - B: estesa area di rammollimento con deformabilità della superficie cartilaginea;
- Grado II: presenza di solchi e fessurazioni della superficie articolare
    - A: lesione con uno spessore inferiore a ½ della cartilagine articolare;
    - B: lesione con uno spessore superiore a ½ della cartilagine articolare;
- Grado III: esposizione dell'osso sub-condrale
    - A: superficie ossea intatta;
    - B: superficie ossea erosa.

Classificazione dell'International Cartilage Repair Society (ICRS)

- Grado I: la superficie articolare presenta solchi e fessurazioni superficiali;
- Grado II: presenza di erosioni profonde con conservazione dello strato basale;
- Grado III: presenza di erosione profonda fino all'osso sub-condrale che appare conservato;
- Grado IV: erosione a tutto spessore della cartilagine articolare e interessamento dell'osso sub-condrale.

2.7 Trattamento dell'osteoartrosi di anca e ginocchio

Il trattamento dell'Osteoartrosi di ginocchio e anca è rappresentato da tre diversi approcci: Conservativo non farmacologico, Conservativo farmacologico e Chirurgico (96). Le linee guida del'American e British Society ritengono opportuno iniziare dai trattamenti più consolidati e meno invasivi per passare successivamente ai più costosi o sperimentali, lasciando alla chirurgia il ruolo di ultima risorsa (97).

2.7.1 Trattamento conservativo non farmacologico

Nel 2013 la "European League Against Rheumatism" (EULAR) che rappresenta oggigiorno una delle più importanti organizzazioni che si occupa della prevenzione, diagnosi, terapia e riabilitazione delle patologie reumatologiche ha pubblicato un'importante review sotto forma di 12 raccomandazioni riguardo il management conservativo non farmacologico dell'artrosi di anca e ginocchio (98). Per prima cosa si sottolinea come il miglior trattamento per il paziente sia rappresentato da quello più personalizzato possibile, ciò significa ritagliare su ogni malato l'approccio più adatto (99). Viene inoltre evidenziata l'importanza di condividere il trattamento con il paziente, facendolo partecipare in maniera attiva, dal momento che il coinvolgimento e l'educazione del paziente risultano essere alla base dei risultati migliori (98). Gli elementi cardine su cui verte l'approccio non farmacologico sono l'esercizio fisioterapico e la perdita di peso (36).

2.7.1.1 Esercizio fisioterapico

L'esercizio fisioterapico è essenziale per tutti i pazienti, indipendentemente dalla gravità della malattia, dalle comorbidità, dall'età, dal grado di dolore e dalle disabilità. Meta-analisi definiscono da lievi a moderati gli effetti dell'esercizio su funzione e dolore (100); risultati paragonabili a quelli ottenuti col trattamento tramite FANS ed analgesici (101). In una review

Cochrane ha comparato 12 sessioni di esercizio sotto supervisione di un professionista sanitario con altrettante sessioni senza supervisione ed ha dimostrato che gli effetti sul dolore e sulla funzione erano significativamente superiori nella prima casistica (102). Le tipologie di esercizio raccomandate per tutti i pazienti sono lo stretching muscolare e l'esercizio aerobico come camminare (103), mentre l'esercizio in acqua è riservato ai pazienti con grado di osteoartrosi più severa o impossibilitati all'esercizio contro gravità in palestra (104). Gli sport a minore impatto, come nuoto o ciclismo, sono quelli che andrebbero effettuati, a sfavore di quegli sport che comportano movimenti di torsione o attività con impatto a forza elevata come la corsa, sebbene l'esercizio fisico sia benefico (36). Nuove attività come yoga e tai chi, oggigiorno in incremento tra le pratiche diffuse nella popolazione, sembrano promettenti nel migliorare dolore e funzionalità nel caso di artrosi di anca e ginocchio; sono però necessari nuovi studi randomizzati e controllati per valutare la loro reale efficacia (105).

2.7.1.2 Perdita di peso

Insieme ad una corretta attività fisica è ormai dimostrato che una riduzione del peso corporeo di almeno il 5% del peso a una velocità di 0,24% a settimana per 20 settimane, in persone obese o in sovrappeso (BMI > 25), migliora sintomatologia e funzionalità soprattutto per quanto riguarda l'artrosi di ginocchio, mentre l'effetto sulla coxartrosi sembra minore (106). Una simulazione effettuata negli Stati Uniti ha anche dimostrato che una riduzione di 0.6 unità di BMI riduce la necessità di protesi di ginocchio dell'1.9%, confermando la correlazione tra sovrappeso e necessità di ricorso alla chirurgia (36). Le linee guida dell'Ottawa Panel rivelano, inoltre, come la combinazione di esercizio fisico e riduzione del peso, producano i migliori effetti sulla qualità di vita, miglioramento della funzionalità e riduzione del dolore rispetto alla gran parte degli altri approcci (107).

2.7.2 Trattamento conservativo farmacologico

Nell'ambito dei trattamenti farmacologici si distinguono trattamenti orali e terapie di tipo infiltrativo. Tutti i trattamenti farmacologici, discussi di seguito, non sono un'alternativa alla fisioterapia e alla perdita di peso dove indicata, i quali devono essere perseguiti sin dal primo momento della diagnosi della patologia.

2.7.2.1 Terapie orali

La terapia orale rappresenta ad oggi una delle metodiche più utilizzate per il controllo del dolore nei pazienti con artrosi di ginocchio e coxartrosi. Il farmaco con le caratteristiche più favorevoli risulta essere il Paracetamolo. In una review recente Cochrane dimostra, infatti, come tale farmaco presenti efficacia significativamente superiore al placebo e paragonabile ai FANS, a fronte però di costi più contenuti e assenza di effetti collaterali gastro-lesivi (108). Il dosaggio consentito di Paracetemolo è al massimo di 3-4 g al giorno e nella formulazione orale è il farmaco indicato come terapia iniziale del dolore osteoartrosico di grado lieve e moderato (101). Il limite del Paracetamolo è la sua nota epatotossicità al punto che la Food and Drug Administration, recentemente, ha limitato il suo utilizzo ad un massimo di 4 gr/die e motivo per cui è un farmaco che andrebbe evitato se il paziente presenta già una epatopatia cronica o un'anamnesi positiva per consumo di alcol. L'altro trattamento analgesico consigliato è rappresentato dai FANS. A questo proposito, una recente review confrontando i due trattamenti ha dimostrato una migliore efficacia degli antiinfiammatori non steroidei, i quali sono tendenzialmente preferiti dal paziente, nonostante gli effetti collaterali superiori (101). Dagli studi, non emerge uno specifico FANS rispetto agli altri per efficacia né per effetti collaterali, rappresentati da gastrolesività per i FANS non selettivi e da cardiotossicità per quanto riguarda gli inibitori selettivi delle cox-2. A questo proposito L'American College of Rheumatology

oltre ad invitare il medico ad informare il paziente sui possibili rischi di una terapia a base di FANS, sconsiglia fortemente l'utilizzo degli stessi per via orale in pazienti oltre i 75 anni di età o con fattori di rischio, a vantaggio di una terapia topica (109). Terapia topica che presenta delle significative criticità nel trattamento della coxartrosi dovuta alla profondità dell'articolazione. In caso di controindicazioni all'assunzione di FANS o inefficacia della terapia a base di Paracetamolo, è possibile ricorrere agli analgesici oppioidi, che vanno prescritti a basso dosaggio, visto l'elevato rischio di comparsa di dipendenza (96). Quest'ultimo trattamento dà però scarsi risultati dovuti alla possibile comparsa di stipsi, problematica che affligge numerosi anziani e che riduce significativamente la compliance (110). È altrettanto vero però che il paziente non deve sentire dolore, soprattutto in virtù di un possibile intervento chirurgico nel breve tempo. Il dolore cronico differisce da un punto di vista eziopatogenetico da un dolore acuto. Nell'ambito dell'osteoartrosi, il dolore acuto, che caratterizza per esempio una riacutizzazione della malattia, è un dolore tipicamente nocicettivo in cui agendo sulla causa si risolve il dolore: è infatti un dolore che risponde molto bene alla somministrazione di analgesici anti-infiammatori. Nel dolore cronico invece si instaurano una serie di modificazioni presinaptiche e post sinaptiche, massima espressione della plasticità sinaptica, che rendono il dolore quasi del tutto indipendente dallo stimolo nocicettivo periferico (articolazione artrosica) facendogli assumere per la maggior parte caratteristiche centrali. Questo rende il dolore di più difficile gestione, in quanto risponde molto meno alla somministrazione di FANS, bensì richiede un trattamento con analgesici oppioidi ad azione centrale. È importante centralizzare la terapia analgesica sul paziente, bisogna infatti valutare il paziente nella sua totalità e trattare eventuali comorbidità presenti. Non è raro infatti come soggetti soprattutto se anziani a causa della disabilità portata dalla patologia artrosica possano sviluppare depressione, causata da una scarsa efficacia della terapia analgesica. In questo ambito l'unico farmaco adeguatamente

studiato con studi randomizzati controllati è la Duloxetina (111). Secondo lo studio l'effetto del farmaco è significativo solamente su un terzo dei pazienti con dolore artrosico. Negli ultimi anni, grande interesse si è sviluppato circa la somministrazione di condro protettori orali: il condroitin solfato e la glucosamina sono due componenti naturalmente presenti nell'articolazione umana e la loro somministrazione in varie forme rappresenta dunque una valida alternativa terapeutica per la degenerazione cartilaginea (112). Ad oggi, la comunità scientifica, attraverso numerosi RCT, è concorde nel considerare la somministrazione orale di Condroitin solfato e Glucosamina un trattamento efficace nel modulare l'osteoartrosi e di eccellente sicurezza nel lungo termine (113).

2.7.2.2 Terapie infiltrative nell'artrosi di ginocchio

Un caposaldo del trattamento della patologia osteoartrosica è la terapia infiltrativa. Le due tipologie di sostanze maggiormente utilizzate sono i corticosteroidi e l'acido ialuronico. Il Trattamento infiltrativo a base di corticosteroidi è stato comunemente utilizzato nelle ultime 5 decadi (114). Riguardo la sua efficacia, la review Cochrane evidenzia una riduzione di 21.91 punti in una scala di dolore che va da 0 a 100, confermando la validità del trattamento corticosteroideo. Tale effetto non dura oltre le 4 settimane (115). Questo tipo di trattamento è stato tuttavia messo in discussione per una serie di controversie negli ultimi anni (116). Una questione insoluta rimane la scelta del tipo di corticosteroide. Secondo uno studio il triamcinolone è da preferirsi al betametasone soprattutto nelle donne anziane (117). Un altro studio ha dimostrato la superiorità del triamcinolone rispetto al metilprednisone nel controllo del dolore (118). Indicazione specifica al trattamento con corticosteroidi, secondo alcuni studi, dovrebbe essere, la presenza di effusione sinoviale. In presenza di versamento articolare infatti, l'outcome del trattamento steroideo risulta superiore (119). In definitiva il trattamento infiltrativo steroideo è da considerarsi un trattamento efficace, ma a breve termine, per una

patologia cronica (116). Un ulteriore studio mette in guardia dalla terapia corticosteroidea con composizioni che presentino all'interno lidocaina o bupropione cloridrato poiché tossici per i condrociti (120). Un importante studio riguardante il management dell'artrosi di ginocchio ha mostrato assenza di effetti collaterali seri dovuti al trattamento steroideo in 1973 pazienti di 28 RCT (114). Tuttavia, è nota la possibilità di effetti collaterali da attribuirsi a tale trattamento. I potenziali effetti collaterali comprendono: dolore post-infezione, formazione di cristalli nel liquido sinoviale, emartro, sepsi articolare, atrofia cartilaginea ed effetti sistemici quali ritenzione idrica, aggravamento di ipertensione e di diabete mellito. Non esistono dati certi riguardo la frequenza con cui possa essere eseguito il trattamento, ad ogni modo molti esperti raccomandano prudenza nei confronti di un utilizzo troppo frequente e in generale non sono raccomandate più di 4 infiltrazioni annue (103). Per via di questa serie di limitazioni, negli ultimi anni il trattamento steroideo sta perdendo popolarità. Il trattamento infiltrativo cui più spesso fa ricorso il paziente affetto da osteoartrosi è la viscosupplementazione con acido ialuronico e cross-linkati. L'acido ialuronico è un glicosaminoglicano ad elevato peso molecolare presente fisiologicamente nel liquido sinoviale dell'articolazione del ginocchio. Nel ginocchio osteoartrosico la sua quantità risulta ridotta e ciò determina una riduzione dell'elasto-viscosità del liquido sinoviale, della lubrificazione, degli effetti antiinfiammatori, analgesici e condroprotettori (121). In virtù di questo, alcuni studi hanno analizzato l'effetto di iniezione intra-articolare di acido ialuronico ed è stato dimostrato che sono in grado di ridurre il dolore e migliorare la funzione articolare rispetto al placebo (122). Sebbene gli effetti dell'Acido Ialuronico sembrino essere transitori, la visco-supplementazione ha dimostrato di essere in grado di ripristinare l'omeostasi reologica nelle articolazioni affette da osteoartrosi con miglioramento degli score del dolore e della funzionalità (123). Più precisamente un importante studio del 2004 ha definito nello specifico gli effetti dell'acido ialuronico sul ginocchio affetto

da artrosi. Lo studio ne identifica una duplice attività: viscosupplementazione**,** caratterizzata dal ripristino delle proprietà meccaniche ed elastiche del liquido sinoviale, e visco-induzione**,** rappresentante la stimolazione di produzione endogena di acido ialuronico da parte dei sinoviociti e condrociti (124). Le infiltrazioni di acido ialuronico rappresentano da anni una realtà nel trattamento di artrosi di ginocchio. A questo riguardo una recente review ha confrontato i risultati di numerosi gruppi di ricerca in merito all'efficacia dell'iniezione dello stesso (125). Il risultato è stato che 5 meta-analisi su 7 hanno dato risultati statisticamente significativi se confrontati al placebo. Un ulteriore review del 2008 ha preso in esame le linee guida del trattamento dell'artrosi di ginocchio di 10 differenti centri ed in 9 di questi è raccomandato l'utilizzo dell'HA nel trattamento dell'artrosi di ginocchio (103). L'indicazione all'utilizzo di acido ialuronico è il trattamento dell'artrosi avanzata prima dell'intervento chirurgico ed è inoltre consigliato in alternativa all'impiego di FANS e di iniezioni di corticosteroidi per il controllo del dolore, quando questi sono controindicati. Per quanto riguarda la sua formulazione, studi che hanno messo a confronto, composti a basso peso molecolare con quelli ad alto peso, non hanno portato a risultati definitivi riguardo la maggiore efficacia dell'alto peso molecolare, al contrario si evidenzia grande eterogeneità tra i risultati dei diversi gruppi di ricerca (126). Tuttavia, in seguito, una accurata review Cochrane ha proposto una meta-analisi di 40 studi randomizzati controllati con placebo per 5 differenti formulazioni di acido ialuronico disponibili in commercio. L'esito, è stato un miglioramento statisticamente significativo con tutti i componenti, ma confrontando i risultati tra loro, si sono osservate differenze nella riduzione del dolore tra il 28% e il 54 % e nel miglioramento della funzionalità tra il 9% e il 32% in relazione al diverso prodotto utilizzato (127). Ciò impone un ulteriore approfondimento riguardo l'efficacia delle singole composizioni. Una variante dell'acido ialuronico proposta più recentemente, è l'acido ialuronico cross-linkato. Questo

composto si ottiene con un processo finalizzato al legame di più molecole di acido ialuronico tra loro per ottenere un prodotto costituito da più filamenti con maggiore peso molecolare e maggiore emivita. Molti studi si sono proposti di confrontare l'efficacia del trattamento con acido ialuronico rispetto al trattamento infiltrativo corticosteroideo. L'analisi di 10 trials sul trattamento dell'artrosi di ginocchio, non ha mostrato differenze significative tra i due trattamenti nelle prime 4 settimane seguenti l'infiltrazione, ma a 5-13 settimane, il trattamento con acido ialuronico, si è rivelato essere superiore sia per riduzione del dolore che miglioramento della funzionalità (127). Inoltre, un recente studio ha mostrato la minore presenza di effetti collaterali sia locali che sistemici rispetto all'utilizzo di corticosteroidi (128). Ulteriori studi confermano la maggiore durata dell'efficacia del trattamento con acido ialuronico, anche se ne sottolineano il più lento inizio della comparsa di effetti benefici (129). Negli ultimi anni, le ricerche si sono aperte ad un approccio biologico quale trattamento dell'osteoartrosi. A questo riguardo, una svolta determinante si è avuta con la dimostrazione dell'efficacia dei fattori di crescita (Growth Factor, GF) nell'incrementare la condrogenesi e limitare la degenerazione articolare (130). È inoltre da tempo nota la presenza di fattori di crescita nei granuli alfa delle piastrine: TGF, PDGF, VEGF, EGF, VEGF, IGF. Ciò ha condotto molti ricercatori ad ipotizzare un ruolo delle piastrine nel trattamento delle lesioni degenerative della cartilagine (131). Questi elementi rappresentano il presupposto per l'utilizzo di sangue periferico, trattato così da aumentarne la concentrazione piastrinica per favorire la rigenerazione cartilaginea. Si è giunti così al concetto di Concentrato Piastrinico (Platelet Rich Plasma, PRP), il quale può derivare dal paziente stesso, PRP autologo (APRP) o dal sangue di donatori, PRP omologo (HPRP). Il PRP sta diventando sempre più una risorsa di primo livello nell'approccio delle patologie reumatologiche. Oltre ad essere infatti uno strumento innovativo contro l'artrosi, è stato anche utilizzato in caso di artriti/artralgie verificatesi in soggetti affetti da sindrome di

Sjrogen con ottimi risultati nel breve termine (132). Recenti studi clinici hanno dimostrato che le multiple infiltrazioni intra-articolari di APRP sono un trattamento sicuro per l'osteoartrosi di ginocchio, in grado di ridurre dolore e sintomi e di far recuperare la funzionalità articolare (133) (9). Inoltre, il trattamento con APRP ha una efficacia maggiore e più duratura rispetto all'acido ialuronico in pazienti attivi con un basso grado di degenerazione cartilaginea ed è inoltre presente una correlazione inversa statisticamente significativa tra età del paziente e potenzialità del PRP autologo (134).

2.7.2.3 Terapia infiltrative nell'artrosi d'anca

Per quanto riguarda il trattamento dell'artrosi di anca non ci sono studi che prendono in esame l'efficacia del trattamento intra-articolare con acido ialuronico. In riferimento alla terapia intra-articolare con steroidi sono utilizzate nella pratica clinica e presentano efficacia, anche se non sono stati condotti a lungo termine a riguardo (135).

2.7.3 Trattamento chirurgico dell'artrosi di ginocchio

Quando i sintomi non sono controllati da un'adeguata terapia farmacologica e non farmacologica, deve essere presa in considerazione la terapia chirurgica. Prima di dover ricorrere alla sostituzione protesica, esistono trattamenti chirurgici meno invasivi.

2.7.3.1 Debridement artroscopico

Debridement artroscopico è un termine indefinito che può comprendere una serie di operazioni chirurgiche associate in vario modo: lavaggio articolare, rimozione di corpi mobili, detriti, frammenti della cartilagine articolare, riparazione di menischi lacerati e intaccamento degli osteofiti (136). L'efficacia di tale trattamento è piuttosto controversa (137). Secondo un recente studio,

infatti, nonostante gran parte dei pazienti (50-75%) mostri benefici dopo il trattamento, circa il 15% dovrà comunque ricorrere all'intervento di sostituzione protesica entro l'anno successivo, e solo il 44 % mostra una riduzione del dolore statisticamente significativa (138). Lo sviluppo della ricerca, però, ha portato al riconoscimento di un insieme di fattori prognostici in grado di predire un outcome positivo del trattamento artroscopico. Tra questi il più rilevante è la presenza di sintomi meccanici quali blocco articolare del ginocchio correlati con lesioni meniscali instabili o flap condrali mobili. All'interno dello stesso studio, sono stati identificati anche fattori prognostici negativi, tra cui, storia di Osteoartrosi di durata superiore a 24 mesi, osteofiti nel compartimento mediale tibiale, spazio articolare inferiore a 5 mm, obesità e fumo. Il successo o meno del trattamento non può dunque prescindere da una accurata selezione dei pazienti, che devono preventivamente essere informati sui limitati obiettivi funzionali ottenibili con l'intervento.

2.7.3.2 Trapianto di Condrociti autologhi

Di pari passo ai convenzionali interventi chirurgici, negli ultimi anni si sono affermate nuove tipologie di interventi. Uno dei più innovativi, che ha ottenuto maggior consenso, è stato il trapianto di condrociti autologhi, descritto per la prima volta da Brittberg nel 1984 (139). La tecnica prevede che le cellule cartilaginee siano prelevate dall'articolazione, isolate enzimaticamente, messe in coltura in vivo, quindi che siano poste di nuovo nell'articolazione, nelle zone di difetto cartilagineo dopo opportuna preparazione delle stesse (140). I limiti presentati dall'applicazione clinica di questo intervento, ovvero la difficoltà di esecuzione e la necessità di un ampio accesso, sono stati in parte superati dall'introduzione dell'ingegneria tissutale utilizzando condrociti seminati su colture biologiche come membrane di collagene (141). Rimane però una tecnica utilizzabile in caso di difetti cartilaginee isolati e comunque limitati all'interno dell'articolazione. Studi a riguardo hanno dimostrato che la tecnica, basandosi su materiale biologico ingegnerizzato, è in grado di portare alla riformazione di un tessuto cartilagineo paragonabile a quello sano (142). A conferma di questo risultato diversi studi prospettici hanno rivelato benefici oggettivi e soggettivi nella

funzione articolare a 12 mesi dall'intervento (143). In virtù dei risultati tale tecnica può essere considerata di prima scelta nei pazienti giovani senza gravi degenerazioni cartilaginee, pur necessitando di ulteriori conferme ad un più lungo follow-up (142). Dopo l'entusiasmo iniziale, oggi questo approccio ha subito una riduzione di applicazione a causa delle limitazioni legislative riguardo la coltivazione di condrociti in laboratorio.

2.7.3.3 Mosaicoplastica

Questo intervento, noto anche con il nome di trapianto osteocondrale autologo, consiste nell'inserimento di cilindri di osso e cartilagine, prelevati da un'articolazione sana, a livello del difetto cartilagineo (144). In linea di principio, se il difetto non è troppo esteso, questo intervento può essere eseguito in artroscopia. Un dato significativo, tuttavia, è la dimostrazione di tessuto fibrocartilagineo nell'interfaccia tra il cilindro osteocartilagineo e il tessuto locale, a dimostrazione dell'assenza di un'integrazione solida (145). Secondo un recente studio, questa procedura determina outcome positivi nel 92% dei casi (146).

2.7.3.4 Osteotomia

L'osteotomia è presente in 10 linee guida su 10 come opzione terapeutica dell'osteoartrosi (147). Il trattamento consiste in un'osteotomia alta valgizzante, tale da determinare una ridistribuzione del peso dal compartimento mediale a quello laterale. Studi di metanalisi rivelano che questo intervento può ritardare di oltre 10 anni il ricorso alla sostituzione protesica (148). Risultati positivi sulla riduzione del dolore sono stati ottenuti nel 75 % dei pazienti a 60 mesi e nel 60 % a 100 mesi di distanza dal trattamento. Perciò i soggetti che ottengono maggior beneficio da questo intervento, in generale, sono pazienti giovani adulti con osteoartrosi monocompartimentale fortemente sintomatica nei quali si può ritardare la sostituzione protesica di oltre 10 anni.

2.7.3.5 Protesi monocompartimentale

In un terzo dei pazienti affetti da osteoartrosi del ginocchio, la patologia può essere definita monocompartimentale, in cui, per lo più, è interessato un singolo compartimento. In circa il 69% di questi è colpita l'articolazione femoro-rotulea, nel 30% di questi il compartimento mediale e nel 3% il laterale (149). Una recente review di 9 studi ha confrontato questa tecnica con la sostituzione completa, dimostrando l'ottima efficacia del trattamento con protesi monocomportamentale in questi pazienti (150). I risultati hanno evidenziato che il dolore e la funzionalità dopo sostituzione protesica totale e monocompartimentale sono comparabili a 5 anni, ma il range di movimento è superiore dopo intervento monocompartimentale.

2.7.3.6 Artroprotesi totale di ginocchio

È considerata una procedura appropriata e affidabile per ripristinare la funzionalità e la qualità della vita nei pazienti che non hanno tratto beneficio da precedenti trattamenti conservativi, farmacologici e non. Ragioni di tipo etico e metodologico, hanno impedito la valutazione rigorosa dell'intervento con RCT, di conseguenza, le evidenze riguardo la sua efficacia sono basate esclusivamente su studi osservazionali e su un limitato numero di studi di coorte che lo confrontano con le terapie mediche standard. Questi studi sono raccolti in una review del 2004 che analizza l'outcome in relazione alla qualità della vita dopo intervento di sostituzione protesica (151). Gli studi sono stati concordi nel rilevare miglioramenti sostanziali nel dolore e funzionalità, più variabili invece, si sono rivelati gli effetti sulla qualità della vita sociale. I miglioramenti del dolore, inoltre, si sono rivelati più rapidi e sostanziali rispetto a quelli sulla funzionalità, con momenti di massimo beneficio a 3 e 6 mesi. La ricerca ha inoltre permesso di identificare una serie di fattori prognostici negativi rispetto l'esito della chirurgia. I più significativi sono: elevato grado di dolore pre-operatorio, bassi punteggi al mini mental test, e la presenza di comorbidità (152). In definitiva, i dati giustificano la ragione per cui l'intervento di artroprotesi rimanga molto

utilizzato e presenti continui sviluppi sia dal punto di vista della tecnica chirurgica che della bioingegneria. La relazione sullo stato sanitario del paese del Ministero della Salute riportata che in Italia nel solo 2009 sono stati effettuati 159.000 interventi di sostituzione protesica di cui il 39% proprio a livello del ginocchio (153). È importante sottolineare come l'intervento di artroprotesi totale di ginocchio rappresenti un trattamento invasivo e rischioso, tanto che va sempre considerato il rischio-beneficio per il paziente. A questo proposito, la Knee Society, si è proposta di standardizzarle in una lista comprendente tutte le principali complicanze (154): sanguinamento post-operatorio, complicazioni della ferita, malattia tromboembolica, deficit neuronali, lesioni vascolari, lesioni legamentose, instabilità, mal-allineamento, affaticabilità, infezione articolare, frattura peri-protesica, osteolisi, perdita dell'impianto, re-intervento, revisione, morte. Con la definizione di questa lista, l'intento della Knee Society è stato sia quello di ridurre la percentuale di complicanze grazie alla loro preventiva valutazione, sia di evidenziare la necessità di ampliare le ricerche per un ottimale trattamento farmacologico, così da limitare il ricorso ad un intervento che se pur consolidato è tutt'altro che privo di criticità.

2.7.4 Trattamento chirurgico dell'artrosi di anca

2.7.4.1 Osteotomia

L'osteotomia è una tecnica chirurgica che consiste in una sezione di un segmento osseo al fine di modificarne lunghezza e o allineamento. Oltre ad essere un trattamento nel caso di importanti varismi o valgismi del ginocchio o nel caso della gonartrosi, rappresenta anche una possibile alternativa nel caso di coxartrosi. È stato visto infatti che nei soggetti in cui si ha un'artrosi localizzata, una buona motilità articolare e una displasia di grado moderato o severo, l'osteotomia volta a riallineare femore e pelvi rappresenta una valida alternativa alla

sostituzione protesica. Alcuni studi sembrano dimostrare inoltre che, se effettuata per altre motivazioni, può prevenire lo sviluppo di coxartrosi (155).

2.7.4.2 Protesi di "superficie" o di "rivestimento"

Questo impianto viene definito cosi perché a differenza dell'artroplastica totale, prevede il sacrificio di una minor porzione di osso del paziente (solo le superfici danneggiate, da qui il nome), che viene sostituito mediante due componenti artificiali in metallo che interagiscono tra di loro per generare il movimento dell'anca. Quindi sono protesi con "accoppiamento Metallo-Metallo" e con "teste di grande diametro". È un tipo di intervento che viene proposto alle persone giovani onde evitare un precoce intervento di sostituzione protesica totale. I vantaggi sono rappresentati da un miglior decorso post-operatorio, da un minor rischio di dislocazione da un eventuale intervento di revisione successiva di più facile esecuzione rispetto ad uno di revisione su artroplastica totale e una maggior preservazione dell'osso. Criticità sul loro utilizzo sono però emerse in letteratura tanto che dati a lungo temine sono richiesti per validare tale trattamento (156). Le complicanze più comuni sono rappresentate da: usura del metallo, fratture del collo del femore, e perdita asettica di frammenti di protesi all'interno dell'articolazione.

2.7.4.3 Artroprotesi totale di anca

La protesi totale d'anca è un intervento che deve essere considerato a causa della sua invasività, complicanze e decorso post-operatorio come ultima alternativa nel management della coxartrosi. Il momento ottimale per effettuare tale intervento non è conosciuto. Sebbene la chirurgia sia considerata come ultima alternativa, uno studio prospettico di coorte ha evidenziato che gli outcome migliori in termini di funzionalità e dolore post-operatorio si hanno in pazienti che presentano una buona funzionalità e un buon controllo del dolore anche prima della chirurgia (157). L'intervento di artroprotesi d'anca consiste in una sostituzione della testa

femorale e della componente acetabolare con delle componenti artificiali, protesiche. La testa del femore danneggiata viene rimossa e sostituita con uno stelo metallico che viene inserito nel centro cavo del femore. Lo stelo femorale può essere sia cementato che "press fit" cioè inserito e bloccato a pressione nell'osso. Una testina in metallo o in ceramica è assemblata sulla parte superiore dello stelo. Questa testina sostituisce la testa del femore danneggiata che è stata rimossa. La superficie di cartilagine danneggiata dell'acetabolo viene rimossa e sostituita con un alloggiamento metallico (componente acetabolare). Un distanziatore di plastica o ceramica viene inserito tra la nuova testa e la componente metallica acetabolare per permettere una superficie di scorrimento liscia. Il miglioramento della tecnologia è alla base per ottenere un'incisione chirurgica sempre minore, una riduzione dei tassi di complicanze, una migliore e precoce mobilità e una minore degenza ospedaliera. È stato visto come tutti questi indicatori sono migliori nei pazienti in cui chirurgo e ospedale effettuano un alto numero di interventi l'anno (158). Altrettanto importante oltre all'atto chirurgico è rappresentato dalla riabilitazione post-operatoria che permette di ottenere la massima riduzione del dolore e una ripresa ottimale della funzionalità a 12 mesi dall'intervento.

3. RUOLO DEI MASTOCITI NELLE ARTRITI INFIAMMATORIE

Oggigiorno uno dei mediatori chiave responsabile delle manifestazioni delle malattie allergiche è il mastocita. Il crosslinking delle IgE poste sulla sua superficie a seguito del contatto con l'antigene determina un immediato rilascio dei suoi granuli, con la conseguente liberazione di istamina e altri mediatori infiammatori responsabili a loro volta delle manifestazioni cliniche che possono andare da una rinite allergica, fino allo shock anafilattico. Negli ultimi anni sempre

maggior interesse è stato posto sul possibile ruolo del mastocita sinoviale nella eziopatogenesi dell'Artrite Reumatoide (159), e più in particolare, sulla infiammazione della membrana sinoviale. Il fatto che il mastocita sia uno dei leucociti maggiormente presenti nella membrana sinoviale artrosica ha incentivato ancora di più lo svolgimento di questo studio.

3.1 Biologia base del mastocita

I mastociti sono presenti nei tessuti connettivi e nelle mucose, e generalmente sono raggruppati in cluster a livello epiteliale, perivascolare e intorno a nervi (160). Originano da cellule staminali del midollo osseo, e sotto forma di cellule progenitrici committed CD34+, una volta migrati nei tessuti, si differenziano in mastociti (161). I mastociti tissutali sono molto eterogenei in quanto hanno dimensioni variabili, differiscono nel numero e contenuto di granuli e soprattutto nella produzione di citochine ed espressione di recettori. Sia studi in vitro sia in vivo sembrano dimostrare che questa eterogeneità rappresenti una risposta adattativa a stimoli che il mastocita riceve nel tessuto in cui è migrato (160). Allo stesso modo, la permanenza del mastocita all'interno del tessuto è controllata dall'ambiente locale, in particolare dalla produzione del stem cell factor (SCF) da parte di cellule stromali (162).

3.2 Attivazioni del mastocita

Affinché possa espletare le sue funzioni il mastocita deve attivarsi. L'attivazione può avvenire per via IgE mediata o per via non IgE mediata.

3.2.1 Attivazione IgE mediata

I MCs esprimono il recettore ad alta affinità per le IgE denominato FcεR1. Tale recettore è un tetramero costituito da un complesso di quattro catene polipeptidiche: la catena α che lega la porzione Fc della IgE, la catena β e due catene γ (163). Le catene γ sono presenti anche in altri recettori di membrana come il FcγR1, che rappresenta il recettore ad alta affinità che lega la porzione Fc delle IgG e il FcγR3a che invece rappresenta il recettore a bassa affinità per immunocomplessi. Nel momento in cui l'allergene lega le IgE (è richiesto il legame con due IgE per determinare il cross-link) si ha la fosforilazione e quindi l'attivazione della tirosin chinasi associata alle catene β e γ con conseguente attivazioni di tre pathways che portano a:

- Rilascio immediato di mediatori preformati contenuti nei granuli secretori;

Entro pochi secondi dal crosslinking delle IgE di membrana, i granuli citoplasmatici presenti nei mastociti si fondono nella membrana plasmatica riversando il loro contenuto all'esterno, nello spazio extracellulare. I granuli contengono istamina, proteoglicani (eparina), proteasi (triptasi, chimasi, carbossipeptidasi) e citochine infiammatore (164).

- Sintesi e liberazione di eicosainoidi;

Entro pochi minuti dalla attivazione IgE mediata, i mastociti iniziano la sintesi di eicosanoidi dal clivaggio dell'acido arachidonico derivato da fosfolipidi di membrana (165). Importanti metaboliti includono leucotrieni, in particolare il leucotriene B_4 che aumenta la permeabilità vascolare, induce vasocostrizione e richiama leucociti e le prostaglandine, tra cui ricordiamo la prostaglandina vasoattiva D_2.

- Sintesi de novo di chemochine e citochine.

L'ultima fase di attivazione del mastocita che si verifica entro ore dalla attivazione per via IgE mediata, è rappresentata dalla sintesi de novo di chemochine e citochine pro-infiammatorie come:IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8 IL-10, IL-13, TNF, IFN-γ, TGF-β, PDGF, VEGF, NGF

(166). L'importanza dell'attivazione IgE mediata del mastocita non è ancora completamente definita. Sicuramente, presenta un ruolo predominante nella lotta contro infezioni parassitarie, tanto che topi geneticamente modificati caratterizzati da un deficit di IgE sono fortemente suscettibili a infezioni elmintiche come quelle da *Schistosoma mansoni* e *Trichinella spiralis* (167) (168). Per questo motivo, nonostante i mastociti possano essere responsabili dello sviluppo di malattie allergiche e anafilassi, il mantenimento di tale sistema fino al giorno d'oggi ha sicuramente portato un vantaggio evolutivo al nostro organismo.

3.2.2 Attivazione non IgE mediata

I mastociti sono presenti in siti di contatto con il mondo esterno come l'epitelio e le mucose, infatti oltre ad essere localizzati in cluster perivascolari, sono presenti negli epiteli che rivestono spazi virtuali del nostro organismo come la cavità peritoneale, lo spazio pleurico e la cavità delle articolazioni sinoviali. Queste localizzazioni suggeriscono un loro potenziale ruolo nella sorveglianza immunitaria e nella capacità dei mastociti di individuare patogeni e iniziare la risposta immunitaria (169). Inoltre, l'accumulo di mastociti nelle flogosi croniche suggerisce che tali cellule possano avere un ruolo importante non solo eventualmente nell'iniziazione della flogosi bensì anche nel mantenimento.

3.2.2.1 Mastociti nelle infiammazioni batteriche

L'importanza fisiologica dei mastociti nella difesa contro le infezioni batteriche è stata ampliamente dimostrata. Topi geneticamente modificati caratterizzati da un deficit di mastociti sono più suscettibili a flogosi peritoneali (170) e polmonari (171) e ad una più alta mortalità a infezioni. È stato osservato che insieme a tale vulnerabilità, questi topi sono caratterizzati da una diminuzione dell'infiltrato neutrofilico nel sito di infezione. Neutrofili che possono essere ricostituiti dalla nuova presenza di mastociti come accade nei topi wild type in cui la risposta

dei mastociti non viene inficiata. Entro poche ore dalla flogosi peritoneale nei topi wild type, la paracentesi dimostra un importante aumento del TNF nel liquido peritoneale. Questa osservazione, concomitante al fatto che la somministrazione di farmaci anti-TNF annulla l'effetto dei mastociti, e che l'introduzione di TNF mima l'effetto di tali cellule anche nei topi geneticamente modificati, suggerisce un importante ruolo di questa citochina come segnale per la chemiotassi dei neutrofili. Per queste evidenze, nonostante sia ampliamente dimostrato come i mastociti possano fagocitare e eliminare batteri, in questi modelli sembra che il ruolo chiave dei mastociti non sia tanto quello di azione diretta conto i batteri, quanto quello di produzione di citochine e mediatori pro-infiammatori (TNF e leucotrieni) in grado di richiamare neutrofili e altre cellule immunitarie per contenere l'infezione (172) (173). Oltre all'importante ruolo chemiotattico precedentemente descritto, i mastociti hanno la capacità di rispondere a infezioni batteriche mediante multipli meccanismi. Questi includono l'attivazione della cellula mediante via Toll-Like Receptors (TLRs), CD48 (un recettore per batteri Gram-negativi) e recettori per anafilatossina C3a e C5a (174) (175). Molto interessante è il fatto che l'attivazione del mastocita tramite questi meccanismi determina una risposta potenzialmente diversa rispetto a quella anafilattica IgE/FcεR1 mediata. A differenza infatti di quest'ultima caratterizzata dalla risposta "tutto o nulla", i batteri possono innescare risposte più graduali e una degranulazione proporzionale all'intensità dello stimolo (172) (176). In aggiunta, la produzione di citochine e mediatori lipidici come prostaglandine e leucotrieni si verifica come ultimo evento nell'attivazione del mastocita e tale fenomeno è indipendente dal grado di degranulazione iniziale ma sembra regolato da altri meccanismi (177). Un'importante conseguenza dell'attivazione mastocitaria per via non-IgE mediata è l'innesco dell'immunità adattativa. Eicosanoidi (es. Leucotriene B_4) hanno la capacità di richiamare linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$di memoria che possono essere attivati grazie ai mastociti locali che svolgono le funzioni di cellule

presentanti l'antigene tramite MHC di classe I e MHC-II (178) (179). Inoltre i mastociti avrebbero la capacità di potenziare la risposta immunitaria stimolando e promuovendo la migrazione delle cellule dendritiche nei linfonodi e richiamare allo stesso tempo, i linfociti naive negli stessi linfonodi tramite la liberazione di citochine infiammatorie (TNF e MIP-1β) (180) (181). Sebbene l'importanza fisiologica di ognuna di queste capacità antimicrobiche è lontana dall'essere completamente chiarita, sicuramente le capacità antibatteriche del mastocita rappresentano almeno in parte il motivo per cui non sono scomparse nel corso dell'evoluzione.

3.2.2.2 I mastociti nelle malattie da immunocomplessi.

Come descritto precedentemente, i mastociti esprimono sulla loro membrana oltre ai recettori per le IgE anche i recettori per la porzione costante delle IgG. Questi includono FcγR2b e FcγR3a caratterizzati da una bassa affinità per il ligando e FcγR1 in grado di legare immunocomplessi ad alta affinità (182). La presenza di tali recettori permette ai mastociti di partecipare alla risposta immunitaria umorale, in quanto una volta che un microorganismo patogeno viene opsonizzato da anticorpi IgG specifici viene successivamente eliminato grazie alla degranulazione dei mastociti previo legame delle IgG con i specifici ligandi. Allo stesso tempo però, la presenza di tali recettori rende il mastocita capace di avere un ruolo patogenetico nelle malattie da immunocomplessi (183). Studi rivelano come l'azione patogenetica del mastocita in queste malattie sembra richiedere anche l'intervento del complemento sierico. Una volta che gli immunocomplessi si depositano nell'organo bersaglio grazie al movimento di massa del sangue, avviene l'attivazione per "via classica" del complemento portando alla formazione del frammento C5a che rappresenta ligando per il recettore posto sulla superficie del mastocita (184).

3.3 I mastociti nella membrana sinoviale normale e infiammata.

In assenza di infiammazione, mastociti sparsi sono presenti nella membrana sinoviale normale. Tali cellule sono localizzate prevalentemente del tessuto connettivo lasso sub epiteliale raggruppate in cluster perivascolari e intorno ai nervi. Rappresentano circa il 3% delle cellule presenti nella membrana sinoviale normale (185) e ancora oggi il loro ruolo rimane oggetto di attiva ricerca. L'Artrite Reumatoide rappresenta una delle malattie reumatologiche a patogenesi multifattoriale più importanti nella pratica clinica. È una patologia caratterizzata da una forte componente infiammatoria della membrana sinoviale che soprattutto durante le fasi acute della malattia si manifesta clinicamente con versamento articolare, dolore, limitazione funzionale, e rigidità mattutina. Il "Flares" della patologia è caratterizzata oltre che da un peggioramento della clinica che costringe il paziente a rivolgersi al medico anche da una importante infiammazione acuta della membrana sinoviale che si viene a verificare su un subset di flogosi cronica. L'epitelio della membrana sinoviale passa da uno spessore di 1-3 cellule, fino ad uno spessore che può superare i 10 strati cellulari. Il tessuto connettivo lasso diviene infiltrato da linfociti T, B, neutrofili, macrofagi e mastociti che dal 3% passano a rappresentare circa il 5% di tutte le cellule sinoviali. Il numero di mastociti cambia da paziente a paziente e generalmente varia in maniera proporzionale al grado di infiammazione sinoviale (170) (186). In analogia con la membrana sinoviale normale i mastociti sono concentrati nel tessuto connettivo lasso sub-epiteliale con cluster in prossimità delle lesioni cartilaginee e delle lesioni ossee (187). Recenti ricerche suggeriscono inoltre che una significativa presenza di mastociti è osservabile non solo nell'Artrite reumatoide, ma in molteplici altre forme di artriti che include artrite reumatoide giovanile, lupus eritematoso sistemico e artrite psoriasica (188). Recenti ricerche evidenziano che anche l'artrosi è caratterizzata da un aumento del numero di mastociti nella membrana sinoviale, e a differenza di altri leucociti il loro numero è maggiore nell'artrosi

rispetto ad altre patologie reumatologiche infiammatorie. Parallelamente all'aumento dei mastociti, il liquido sinoviale prelevato da articolazioni infiammate mostra un'importante presenza di triptasi e istamina, entrambi considerati mediatori specifici mastocitari (189) (190). È stato evidenziato che i mastociti presenti nel connettivo sub epiteliale della normale sinovia presentano un pattern enzimatico diverso rispetto ai mastociti che si osservano nelle condizioni infiammatorie. È interessante notare che, mentre i mastociti normalmente presenti nelle condizioni non infiammatorie presentano una positività nei granuli sia per la chimasi che la triptasi (MC_{CT}), i mastocini presenti nella membrana sinoviale infiammata presentano prevalentemente una positività esclusiva alla triptasi (MC_T) probabilmente perchè derivano da cellule progenitrici committed differenziate sotto l'influenza di linfociti T (191) (192). Sebbene ancora oggi non siano chiare le conseguenze di tale differenza, mastociti con fenotipo simile isolati dal polmone e dalla cute hanno rivelato pattern secretivi diversi in termine di citochine e altri mediatori di infiammazione. Sembra infatti evidente come le MC_{CT} del polmone e della cute hanno la capacità di determinare la sintesi e liberazione di IL-4, mentre le MC_T di IL-5 e IL-6 (193). Se questo fosse vero anche nella membrana sinoviale le due popolazioni di mastociti potrebbero avere ruoli diversi nella patogenesi delle artriti infiammatorie. IL-4 prodotta dai MC_{CT} della membrana sinoviale non infiammata ha la capacità di stimolare la fibrosi e deposizione di collagene, mentre l'IL-6 avrebbe la capacità di stimolare i linfociti T e B (194). Le prime sono raggruppate nel connettivo sub-epiteliale profondo dove infatti è possibile osservare un grado di fibrosi maggiore, mentre le MC_T sono localizzate prevalentemente nella porzione più superficiale in associazione con aggregati linfoidi (195). Nonostante, i mastociti dell'artrite reumatoide e quelli dell'artrosi non appaiano istologicamente distinguibili, recenti studi hanno evidenziato come siano presenti delle differenze relative all'espressione dei

recettori di membrana. A differenza infatti dei mastociti presenti nell'artrite reumatoide, quelli dell'artrosi sembrano non presentare il recettore per il frammento C5a del complemento (191).

3.4 Modello murino K/BxN per lo studio dell'artrite

L'importante ruolo dei mastociti sinoviali nella patogenesi delle artriti infiammatorie è stato consolidato grazie al modello murino K/BxN (196) (197) che permette di mimare in modello animale una artrite reumatoide caratterizzata come nell'uomo da un coinvolgimento articolare simmetrico, cronico, danno cartilagineo, osseo e presenza di panno sinoviale (198). Questi topi sono caratterizzati dalla produzione endogena di autoanticorpi contro l'enzima ubiquitario glucosio-6-fosfato isomerasi in risposta all'espressione del recettore T transgenico (TCR) KRN e della MHC di classe II allele Ag7. Questo autoanticorpo presente nel siero di questi ceppi transgenici è responsabile dell'artrite e per questo motivo il siero una volta prelevato e iniettato nei topi da esperimento può indurre infiammazione della membrana sinoviale. La caratteristica chiave di tale modello è quello di avere la possibilità di trasferire questi autoanticorpi in topi riceventi che a loro volta possono presentare caratteristiche specifiche grazie alla manipolazione genica al fine di studiare la risposta dei singoli costituenti della articolazione al trigger infiammatorio (199). Grazie al trasferimento di questo siero in topi con particolari delezioni geniche si è identificato un importante ruolo delle citochine IL-1, TNF, del recettore per le IgG FcγR3, del complemento C3, C5 e del recettore del frammento C5a nella patogenesi della infiammazione sinoviale (200). Sempre tramite tale modello, diverse ricerche hanno evidenziato un ruolo cruciale del mastocita sinoviale nella patogenesi della infiammazione della sinovia. In primo luogo le citochine e i mediatori infiammatori precedentemente citati sono tutti liberati o presenti nel mastocita e in aggiunta la degranulazione dei mastociti rappresenta il

primo evento che viene osservato in seguito alla somministrazione del siero K/BxN (196). In secondo luogo, i topi resi geneticamente "mastociti privi" sono molto più resistenti all'artrite in seguito alla somministrazione del siero K/BxN e allo stesso tempo la ricostituzione del normale pool di mastociti comporta artrite come nei topi wild type. Grazie a queste evidenze, sembra che i mastociti sinoviali possano agire come sentinelle dell'infiammazione, determinando un richiamo delle altre cellule infiammatorie a seguito dell'insulto ricevuto. In loro assenza nessun'altra cellula sinoviale residente sembra avere la capacità di iniziare il "recruitment" (201).

3.5 Ruolo del mastocita sinoviale nell'iniziazione dell'artrite

Come descritto precedentemente, l'attivazione del mastocita può essere innescata da immunocomplessi IgG, complemento, ligandi TLR, IgE e antigeni microbici. Ognuno di queste metodiche può essere un trigger che interviene nella patogenesi dell'infiammazione della membrana sinoviale ed è per questo motivo che rimane ancora oggi un importante campo di ricerca attiva. Per esempio gli immunocomplessi sembrano determinare artrite nella "malattia da siero" e nella crioglobulinemia mista associata a epatite da HCV, ma allo stesso tempo sembrano intervenire nella patogenesi dell'Artrite reumatoide insieme al complemento e all'attivazione IgE mediata come osservabile in alcuni sottogruppi di soggetti (202). Infezioni da batteri o virus possono comportare flogosi articolare attivando i recettori TLRs posti sui mastociti, ma allo stesso tempo studi hanno rivelato come tali recettori possono essere attivati anche in assenza di flogosi. Sembra infatti come le proteine da Shock (HSP 60) e i prodotti di degradazione dell'acido ialuronico fungendo da DAMPs possano essere in grado di attivare i mastociti e il processo flogistico all'interno dell'articolazione (203). Una volta attivati,

molteplici sembrano essere i meccanismi con cui i mastociti potrebbero determinare la flogosi sinoviale (*figura 4*).

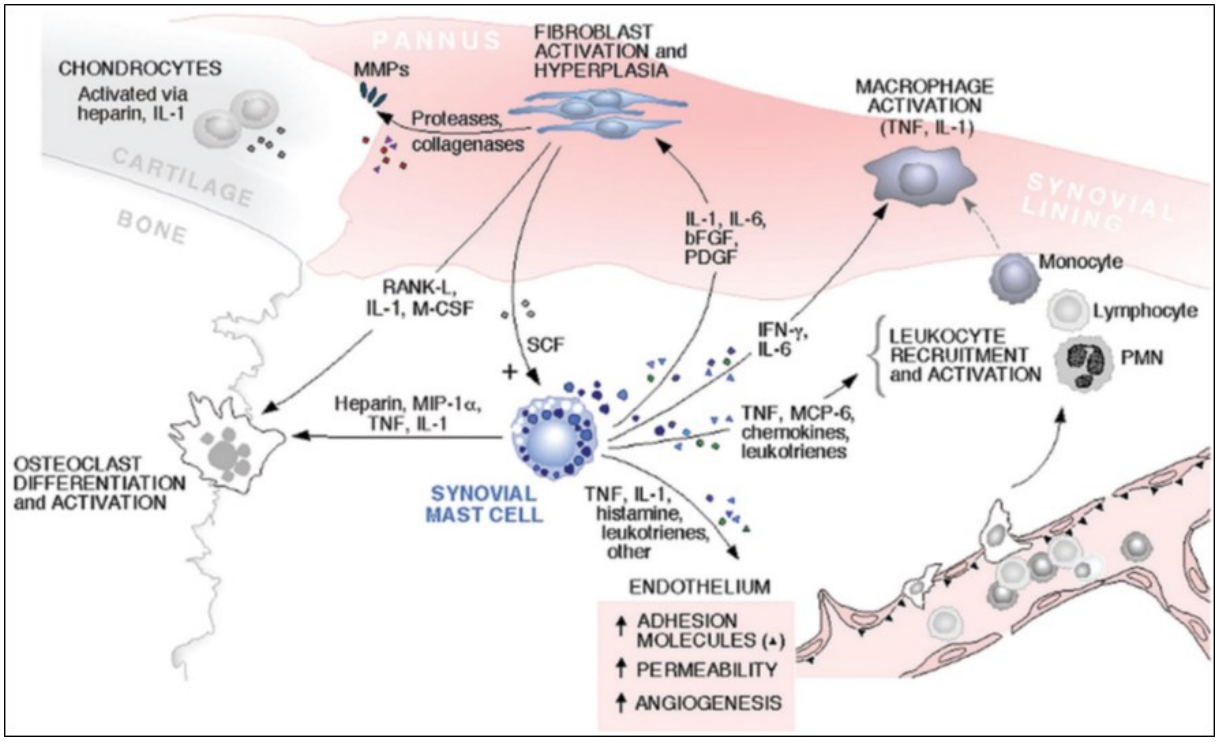


Figura 4: Ruolo del mastocita sinoviale nell'infiammazione sinoviale.

da: Mast cells in inflammatory arthritis. Nigrovic et al. 2004

Mediatori vasoattivi come l'istamina, la prostaglandina D2e leucotrieni aumentano la permeabilità vascolare, mentre TNF, IL-1 e la stessa istamina promuovono l'espressione di molecole di adesione come P-selectina, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 sulla superficie endoteliale (204). Questi eventi, insieme alla liberazione di sostanze chemiotattiche come gli stessi leucotrieni, mMCP-6, IL-8, e TNF portano ad un importante richiamo di leucociti nella membrana sinoviale infiammata. In aggiunta, citochine infiammatorie liberate dal mastocita come IFN-γ e IL-6 sono in grado di attivare i macrofagi residenti nella membrana sinoviale che di conseguenza liberano TNF e IL-1 generando un circolo vizioso. Importante ruolo dei mastociti sembra inoltre essere quello di determinare un'attivazione e iperplasia dei fibroblasti presenti nel connettivo sub epiteliale grazie alla liberazione di IL-1, IL-6, bFGF, PDGF (205).

Questi fibroblasti oltre ad essere responsabile della fibrosi osservabile negli strati più profondi del connettivo sub-epiteliale sembrano essere in grado di liberare collagenasi e proteasi in grado di danneggiare la cartilagine articolare (206).

3.6 Ruolo dei mastociti sinoviali nell'artrite cronica

Nonostante il ruolo dei mastociti nella eziopatogenesi dell'artrite acuta e cronica sia lontano dall'essere completamente chiarito, inizialmente si pensava che queste cellule avessero un ruolo limitato all'artrite acuta. Questo perché mediante il modello murino K/BxN si era visto che la somministrazione di due iniezioni di siero in topi riceventi era seguita dopo 1-2 giorni da una importante sinovite che raggiungeva l'acume in circa 2 settimane, ma si autolimitava fino a risolversi nel giro di 6 settimane. Sebbene alcune patologie articolari come l'artrite associata a crioglobulinemia o alle artriti reattive post-virali hanno di solito un andamento autolimitato, molte altre affezioni articolari come l'artrite reumatoide o l'artrosi hanno un andamento cronico. Visto il forte aumento di mastociti in queste condizioni patologiche sarebbe sorprendente se queste cellule avessero un ruolo solo nella fase iniziale della malattia, per questo motivo è comprensibile ipotizzare dei meccanismi che determinano un'attivazione cronica di questi elementi,anche se il contributo dei mastociti nel mantenimento della flogosi deve essere ancora sperimentalmente determinato. Somministrazioni ripetute di siero proveniente da topi K/BxN in topi riceventi ha mostrato come i mastociti sinoviali possono andare incontro a ripetitivi cicli di attivazione e degranulazione partecipando attivamente al processo infiammatorio cronico.

4. SODIO CROMOGLICATO

Il sodio cromoglicato è il sale bisodico del cromoglicato, un composto chimico di formula C23H16011, dotato di attività farmacologica. È infatti in grado di stabilizzare i mastociti determinando, in tal modo, un miglioramento di alcune patologie di natura allergica, soprattutto asma. Si tratta di un composto stabile ma insolubile in acqua, infatti a pH fisiologico il composto è in buona parte ionizzato e per questo motivo non assorbito.

Il sodio cromoglicato è stato scoperto dal Dr. Roger Altounyan malato lui stesso d'asma. Fu inizialmente considerato un farmaco di svolta nella gestione dell'asma in quanto, in molti casi, i pazienti possono essere liberati dagli steroidi. Successivamente, si è rilevato anche utile come profilassi per l'asma allergica nelle rinocongiuntiviti e nelle allergie alimentari. Il Dr. Altounyan stava indagando su alcune piante con proprietà broncodilatanti. Studiando la Khella, usata come rilassante muscolare fin dai tempi antichi in Egitto, il Dr. Altounyan ne intuì le proprietà terapeutiche e deliberatamente ne inalò i derivati del principio attivo: il khellin, per verificare se potevano bloccare i suoi attacchi d'asma. Dopo diversi anni di sperimentazione riuscì ad isolare un composto efficace e sicuro per l'asma, che fu chiamato sodio cromoglicato.

4.1 Farmacocinetica e farmacodinamica

Il sodio cromoglicato viene poco assorbito per bocca e per tale motivo viene utilizzato localmente tramite inalazione o per aerosol. Per via orale l'assorbimento sistemico è scarso (1% circa) e di esso buona parte viene eliminata inalterata nella bile, urine e feci. L'emivita del composto è di circa 80 minuti.

Il meccanismo d'azione dei cromoni non è del tutto noto. Inizialmente noti come inibitori della degranulazione mastocitaria, questi farmaci, oltre ad inibire in maniera dose dipendente il rilascio dovuto ad IgE di mediatori dell'infiammazione dai mastociti umani, possiedono effetti selettivi di inibizione dell'attività di altre cellule infiammatorie come macrofagi, eosinofili, neutrofili, monociti e del rilascio antidromico di mediatori dell'infiammazione da terminazioni sensitive afferenti. Il meccanismo dell'effetto antidegranulante dei cromoni implica l'inibizione di un canale del cloro sulle cellule infiammatorie e la riduzione della iperpolarizzazione cellulare che attiva l'aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare, a sua volta responsabile della degranulazione. Oltre che sulla reazione asmatica precoce dovuta soprattutto all'attivazione dei mastociti, i cromoni sono efficaci anche dopo la degranulazione mastocitaria conseguente al challenge con antigene e possono inibire anche la reazione asmatica tardiva dove il ruolo fisiopatologico principale è svolto dagli eosinofili.

In uno studio clinico la somministrazione cronica di disodiocromoglicato ha diminuito la percentuale di eosinofili nel liquido di lavaggio broncoalveolare, a dimostrazione di un effetto antinfiammatorio di questi farmaci.

4.2 Indicazioni terapeutiche

I cromoni possono essere somministrati come terapia di controllo dell'asma nei casi di asma persistente lieve. Somministrati come farmaci per la prevenzione, i cromoni inibiscono la risposta asmatica precoce e tardiva conseguente ad inalazione di allergene e la broncocostrizione acuta conseguente ad esercizio fisico ed all'inalazione di aria fredda e di anidride solforosa. Il disodiocromoglicato riduce i sintomi e la frequenza di riacutizzazione di asma, ma l'effetto sull'iperreattività bronchiale aspecifica non è sempre presente. Per quanto

meno efficaci, i cromoni, per la loro elevata tollerabilità, costituiscono un'alternativa terapeutica ai glucocorticoidi inalatori in età pediatrica, dove sono da considerare i possibili effetti inibitori dei glucocorticoidi sull'accrescimento corporeo. La risposta terapeutica ai cromoni è spesso imprevedibile. Pertanto, è generalmente necesssario un periodo di terapia con cromoni di 4-6 settimane per identificare i pazienti con asma che rispondono alla terapia con questi farmaci. In caso di polveri inalabili si utilizza una dose iniziale di 20mg circa 4 volte al giorno, aumentabile fino a 6-8 volte al dì a seconda dei casi. Qualora si debba intraprendere un esercizio fisico se ne può assumere una dose una mezz'ora prima dell'attività.

Oltre all'asma allergica, il sodio cromoglicato trova applicazione in altre patologie d'ordine allergico quali riniti e congiuntiviti e nella prevenzione delle allergie alimentari. Per il trattamento della congiuntivite allergica si possono utilizzare appositi colliri a base di sodio cromoglicato da utilizzarsi 4 volte al giorno. Nella rinite allergica il sodio cromoglicato viene considerato di prima scelta nei bambini anche se antistaminici e cortisonici locali vengono considerati più efficaci. La dose utilizzata è di uno spruzzo per narice 2-4 volte al giorno. In caso di riniti allergiche stagionali la terapia dovrebbe cominciare 2 0 3 settimane prima dell'arrivo della stagione in questione. Nelle allergie alimentari si utilizza una dose di 200mg 4 volte al giorno prima dei pasti. In bambini di età compresa tra i 2 ed i 14 anni, invece, si utilizza un dosaggio di 100mg. Il dosaggio può essere aumentato, in caso di necessità, fino ad un massimo di 40 mg/kg al giorno. Qualora non si riuscisse ad evitare il contatto con alimenti allergenici (per esempio durante i pasti al ristorante o a mesa) si può utilizzare una dose singola di sodio cromoglicato un quarto d'ora prima del pasto per cercare d'evitare lo scatenarsi della sintomatologia.

4.3 Effetti collaterali e tossicità

Disodiocromoglicato presenta solo minimi effetti collaterali e poco frequenti a causa del suo scarso assorbimento. Essi comprendono xerostomia, odinofagia, tosse, senso di affanno o di costrizione toracica. Talvolta può comparire un episodio di broncospasmo transitorio che dopo poco tempo svanisce e che, comunque, può essere trattato con un broncodilatatore. In caso di uso di colliri può aversi un transitorio senso di bruciore e sono stati riportati alcuni casi di alterazione del gusto con comparsa d'un senso d'amaro in bocca. Nell'uso orale per il trattamento delle allergie alimentari talvolta può aversi senso di nausea, dolori articolari e rash cutaneo. In rari casi si può avere comparsa di dermatiti, gastroenteriti o miositi, e ancor meno volte, infiltrati polmonari eosinofili con anafilassi. Non sono noti casi di pericolosità del sodio cromoglicato in gravidanza o durante l'allattamento per cui viene ritenuto sicuro da utilizzare durante questi stadi anche se è bene che ciò avvenga sotto controllo medico.

5. STUDIO SPERIMENTALE: TRATTAMENTO INFILTRATIVO PER L'OSTEOARTROSI DI GINOCCHIO MEDIANTE SODIO CROMOGLICATO E ACIDO IALURONICO

5.1 INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO

L'artrosi rappresenta oggigiorno la causa maggiore di disabilità nell'anziano e anche se è stata per molto tempo considerata una patologia non infiammatoria (2), è ormai accettato dalla letteratura internazionale come la sinovite ricopra un ruolo chiave nella patogenesi della

malattia. Recenti studi di immunoistochimica hanno dimostrato la presenza di infiltrato infiammatorio nella membrana sinoviale delle articolazioni artrosiche. È stato quindi messo a confronto tale infiltrato con quello caratterizzante l'artrite reumatoide. I risultati hanno dimostrato che nella patologia artrosica sono presenti le stesse molecole infiammatorie ma in quantità inferiore, ad eccezione dei mastociti che prevalgono nell'Osteoartrosi. Nella membrana sinoviale infiammata queste cellule sono responsabili del richiamo di altre cellule infiammatorie attraverso il rilascio di citochine, dell'attivazione dei sinoviociti, della stimolazione dell'angiogenesi e inoltre hanno un ruolo preponderante nella percezione del dolore. I meccanismi attraverso cui sono in grado di assolvere tali funzioni non sono ancora perfettamente compresi, ma è noto che siano in grado di produrre tutte le principali citochine implicate nella patogenesi artrosica (261). Data l'importanza di tali elementi nella genesi e progressione della patologia artrosica si è sviluppato grande interesse attorno al mastocita. Nonostante la disponibilità di una vasta gamma di farmaci e modalità di trattamento per l'artrite e le malattie infiammatorie in generale nessuna si è dimostrata essere del tutto soddisfacente per l'osteoartrosi. Il nostro studio descrive un metodo e una composizione per trattare l'infiammazione degli occhi e dell'orecchio comprendente cromoglicato di sodio da solo o in combinazione con acido ialuronico. Inizialmente si è verificata l'effettiva presenza di un numero elevato di mastociti nella membrana sinoviale dei pazienti artrosici tramite tecniche di istologia e immunoistochimica. Secondariamente è stato messo a punto un modello di studio che confermasse il ruolo effettivo del mastocita nella patogenesi artrosica, ovvero la co-coltura tra mastociti e condrociti. Tali passaggi sono stati necessari a confermare tramite studi in vitro l'importanza dei mastociti nella genesi e propagazione della patologia artrosica. Sulle base di queste evidenze sono stati quindi effettuati esperimenti su composti maggiormente efficaci nell'inibire l'attività dei mastociti. All'interno di questi, la categoria dei cromoni, stabilizzatori

di membrana mastocitaria, si sono rivelati essere particolarmente efficaci. Le mast cells (mastocita) sono state infatti descritte per la prima volta da Paul Ehrlich nel 1878 nel contesto della patologia allergica. Il modello della co-coltura è stato quindi utilizzato per verificare l'effetto diretto del cromoglicato di sodio sul mastocita. Quanto è emerso ha dimostrato l'effettiva capacità di ridurre in maniera significativa l'attività del mastocita, in particolare è stata anche valutata l'efficacia del cromoglicato nell'inibizione del mastocita in associazione ad acido ialuronico. Studi in vitro hanno inoltre dimostrato l'assenza di tossicità sul microambiente articolare. Il primo scopo del presente studio è pertanto verificare l'efficacia di un innovativo metodo di trattamento dell'osteoartrosi tramite un inibitore dell'attività mastocitaria, in particolare uno stabilizzatore della membrana mastocitaria come un cromone. Il secondo scopo è brevettare una composizione per uso intrarticolare comprendente un cromone e preferibilmente un altro principio attivo nel trattamento dell'osteoartrosi come ad esempio l'acido ialuronico.

5.2 MATERIALI E METODI

5.2.1 Pazienti artrosici

Primariamente i frammenti di membrana sinoviale sono stati ottenuti direttamente in sala operatoria durante l'intervento di sostituzione protesica. Lo studio osservazionale è stato condotto con il più alto rispetto per i partecipanti, che hanno fornito un consenso informato scritto. Tutti i pazienti sono stati trattati presso la Clinica Ortopedica dell'Azienda Ospedaliera – Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona. Dal gennaio 2015 ad aprile 2017, trenta pazienti

affetti da gonartrosi e sottoposti a protesi totale di ginocchio (gruppo OA ginocchio) sono stati inclusi nello studio. I criteri di inclusione sono:

- età > 50 anni;
- storia di dolore cronico (> 4 mesi) e/o versamento articolare;
- limitazioni delle attività quotidiane;
- artrosi avanzata (Kellgren-Lawrence di grado III e IV);
- non soddisfazione del paziente con il trattamento conservativo.

Criteri di esclusione:

- malattie neurologiche e cardiovascolari (classificato NYHA III - IV);
- diabete;
- atopia;
- osteonecrosi;
- malattie reumatologiche con potenziale interesse dell'articolazione del ginocchio;
- precedente chirurgia del ginocchio;
- utilizzo di farmaci immunosoppressivi e infiltrazioni articolari (acido ialuronico, steroidi ecc) negli ultimi sei mesi.

Nello stesso intervallo di tempo, 30 pazienti sottoposti a artroprotesi di anca sono stati inclusi nello studio (gruppo OA anca). I criteri di inclusione sono rappresentati da:

- età > 50 anni;

- storia di dolore cronico (> 4 mesi) e/o versamento articolare;
- limitazioni delle attività quotidiane;
- artrosi avanzata (Kellgren-Lawrence di grado III e IV);
- non soddisfazione del paziente con il trattamento conservativo.

I criteri di esclusione sono:

- malattie neurologiche e cardiovascolari (classificato NYHA III - IV);
- diabete;
- atopia;
- osteonecrosi;
- malattie reumatologiche con potenziale interesse dell'articolazione dell'anca;
- precedente chirurgia dell'anca;
- morbo di Perthes
- epifisiolisi
- displasia
- utilizzo di farmaci immunosoppressori e infiltrazioni articolari (acido ialuronico, steroidi ecc) negli ultimi sei mesi.

5.2.2 Dati clinici e radiologici

Il dolore dei pazienti è stato valutato con la scala visiva analogica VAS (0-100) mentre i questionari per la valutazione della funzionalità dell'articolazione di anca e ginocchio, rispettivamente HOOS e KOOS (ultima versione 2012), sono stati registrati prima dell'intervento chirurgico. Radiografie standardizzate (postero-anteriore sotto carico per il ginocchio e antero-posteriore della pelvi per l'anca) sono state effettuate a tutti i pazienti inclusi nei gruppi OA di ginocchio e anca. Le radiografie sono state analizzate da un radiologo esperto in patologia muscolo-scheletrica che non era a conoscenza dei dati dello studio secondo la classificazione di Kellgren e Lawrence (KL).

5.2.3 Gruppi di controllo

I pazienti non affetti da artrosi sono stati suddivisi in due gruppi di controllo. Il primo gruppo (gruppo controllo ginocchio) comprende cinque pazienti che sono stati sottoposti ad amputazione traumatica dell'arto inferiore. Il secondo gruppo (gruppo controllo anca) comprende cinque pazienti che sono stati sottoposti ad artroprotesi di anca a seguito di frattura mediale del collo del femore. In entrambi i gruppi di controllo l'anamnesi era negativa per OA, dolore articolare o pregressa chirurgia dell'articolazione presa in esame.

5.2.4 Istochimica e immunoistochimica dei campioni

I campioni di membrana sinoviale ottenuti dalla chirurgia sono stati fissati in formalina al 10% per circa 24 – 48h, successivamente sono stati inclusi in paraffina e sezionati con uno spessore di 3-5 μm. Le sezioni sono state "deparaffinate" in xylene e reidratate tramite una serie crescente di alcol (tutti i reagenti provengono dalla Bio-Optica Spa, Milano, Italia). Per l'analisi istologica di routine, le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina e con il Blu di Toluidina. Polysine ® slides (Menzel-Gläser, Braunschweig) sono state usate per l'analisi immunoistochimica. Le sezioni sono state incubate in 3% di perossido di idrogeno (H2O2) a

temperatura ambiente. Successivamente, le sezioni sono state incubate con anticorpo policlonale di coniglio anti CD-117 umano, diluito in 1:50 in EnVision FLEX Antibody Diluent in atmosfera umidificata per 20 minuti. Il complesso antigene-anticorpo è stato individuato tramite Dako EnVision™ + Dual Link System, HRP/DAB, seguendo le istruzioni della casa produttrice (tutto il materale Dako Agilent Technologies, Carpinteria, CA, USA). I vetrini sono stati contro-colorati con ematossilina di Mayer's (Bio-Optica Spa, Milano, Italia). I vetrini sono stati esaminati con il microscopio ottico Leica Leitz DMRBE (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany). Nel nostro studio abbiamo utilizzato il Blu di Toluidine per individuare i mastociti in quanto tramite questa colorazione si evidenzia una spiccata metacromasia citoplasmatica. In letteratura, è riportato che il Blu di Toluidina è meno sensibile rispetto a colorazioni come la Triptasi utilizzati in altri studi (236). Per risolvere questa criticità abbiamo utilizzato l'immunoistochimica con l'anticorpo anti CD-117 presente sulla superficie del mastocita che ha permesso di individuare le cellule che hanno parzialmente o totalmente degranulato. Sono stati calcolati il numero totale di mastociti e il numero di vasi in 10 adiacenti campi ad alto ingrandimento (hpf) partendo dal centro della sezione e andando da sinistra verso destra, mantenendo l'osservazione negli strati più superficiali della sezione. Mastociti e vasi sono stati contati manualmente da due osservatori indipendenti in cieco. La media della somma del numero totale dei mastociti e del numero totale dei vasi in 10 hpf ottenuta dai due operatori è stata utilizzata per analisi statistica. Nessuno dei due osservatori era a conoscenza delle caratteristiche del paziente da cui il campione di membrana sinoviale proveniva ogni volta. Per valutare l'infiammazione della membrana sinoviale, ogni campione è stato esaminato secondo quanto descritto da Krenn et al. (73), calcolando il cosiddetto "synovitis score (SS)". Il numero degli strati di cellule che costituiscono lo strato epiteliale, il grado di cellularità dello stroma e il grado di infiltrato infiammatorio sono le tre caratteristiche da valutare per calcolare tale score.

L'infiltrato infiammatorio è stato valutato a basso ingrandimento (obiettivo lente 10X), mentre gli altri due parametri sono stati valutati ad alto ingrandimento (obiettivo lente 40X). Ogni parametro può assumere un valore che va da (0) a (3), mentre il synovitis score deriva dalla somma dei valori dei tre parametri. In base a tale somma possiamo avere assenza di sinovite se SS è 0-1, basso grado di sinovite se 2-4, oppure alto grado di sinovite se SS è 5-9. Per ogni campione di membrana sinoviale è stato quindi calcolato:

- numero vasi / 10 hpf;
- numero mastociti / 10 hpf;
- synovitis score.

5.2.5 Analisi statistica

I dati sono stati statisticamente valutati con analisi della media, varianza e t-Student's test. Per ogni confronto effettuato durante lo studio si è scelto un intervallo di confidenza (IC) del 95%.

5.2.6 Co-coltura mastociti

Secondariamente è stato effettuato un prelievo di condrociti e membrana sinoviale da quattro pazienti sottopostisi ad artroprotesi totale di ginocchio. I pazienti da cui è stato effettuato il prelievo erano due maschi e due femmine con i seguenti criteri di inclusione:

- età > 65 anni;
- storia di dolore cronico (> 4 mesi) e/o versamento articolare;
- limitazioni delle attività quotidiane;
- artrosi avanzata severa (Kellgren-Lawrence di grado IV);

- non soddisfazione del paziente con il trattamento conservativo

I criteri di esclusione sono:

- malattie neurologiche e cardiovascolari (classificato NYHA III - IV);
- diabete;
- atopia;
- osteonecrosi;
- malattie reumatologiche con potenziale interesse dell'articolazione dell'anca o del ginocchio;
- precedente chirurgia di anca o di ginocchio;
- morbo di Perthes;
- epifisiolisi;
- displasia;
- utilizzo di farmaci immunosoppressori e infiltrazioni articolari (acido ialuronico, steroidi ecc) negli ultimi sei mesi.

Ottenuto il campione, si è proceduto alla digestione dello stesso tramite collagenasi, poi sono stati isolati i mastociti dalla membrana sinoviale tramite biglie magnetiche con anticorpi anti CD117 e colonnine. I mastociti sono stati stimolati a proliferare e differenziarsi attraverso CSF (Colony stimulaing factors), IL-3 e IL-4. Successivamente è stata realizzata una co-coltura condrociti-mast cells con terreno di coltura DMEM/RPI 1640 ed elaborate tre co-colture per tre diversi esperimenti: esperimento a, esperimento b, controllo c.

a) Esperimento a: calcium ionophore a23187 (10-6 m o 10 µg/ml 4) per 30 minuti;

b) Esperimento b: aggiunta di collagene II;

c) Controllo c: no attivazione mast cell.

Pertanto, l'attivazione di mast cells nel primo campione è stata fatta con calcio ionoforo, il metodo che in letteratura è descritto come il più efficace per attivarle in vitro; nel secondo con collagene II, un prodotto della degenerazione cartilaginea; il terzo è il campione di controllo, senza cioè attivazione delle mast cells.

Rispettivamente per ogni esperimento a, b e controllo dopo 3 – 5 – 7 giorni di co-coltura è stata prelevata una quantità predefinita di terreno, posizionata successivamente in due pozzetti di ogni piastra elisa. Le piastre elisa utilizzate sono state: NGF, BDNF, IL-17A, TNF-alfa, IL-1beta, IFN-gamma.

Oltre a ciò, in laboratorio si è svolto un ulteriore esperimento: seguendo lo stesso procedimento spiegato poche righe sopra, abbiamo allestito una nuova co-coltura di mastociti e cartilagine alla quale questa volta è stato aggiunto cromoglicato di sodio 3 mg/ml, in seguito all'attivazione dei mastociti stessi con collagene II.

5.2.7 *Test di tossicità*

Studi preliminari sono andati a valutare l'eventuale tossicità del cromoglicato di sodio sui componenti nobili dell'articolazione, condrociti e legamentociti. Per fare ciò si è usato il saggio MTT, dove la sigla indica il composto di bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, che è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza colore blu/violaceo. Ciò

accade prevalentemente nei mitocondri; può essere utilizzato per determinare la citotossicità di farmaci o altri tipi di sostanze chimicamente attive e potenzialmente tossiche. L'enzima miticondriale succinato deidrogenasi è attivo infatti soltanto nelle cellule vive, e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano (un sale blu). Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm.

5.2.8 Analisi statistica

I dati sono stati statisticamente valutati con analisi della media, varianza e t-Student's test. Per ogni confronto effettuato durante lo studio si è scelto un intervallo di confidenza (IC) del 95%.

5.3 RISULTATI

Dal gennaio 2015 a aprile 2017, 30 pazienti del gruppo OA ginocchio, 30 del gruppo OA anca, 5 pazienti nel gruppo controllo ginocchio e 5 pazienti nel gruppo controllo anca sono stati inclusi nello studio. Le caratteristiche dei pazienti sono mostrate nella *tabella 1*.

	Knee OA group	Knee control	Hip OA group	Hip control
nr. Of patient	30	5	30	5
Age (years), mean (SD)	73.18 (7.7)	53.2 (8.17)	69.8 (6.3)	65.4 (7.2)
Female, n (%)	11 (36.67 %)	2 (40%)	19 (63.33%)	4 (80%)
VAS pain, mean (SD) [IC 95%]	78.5 (10.27) [74.67-82.33]		78.67 (6.94) [76.08-81.26]	
KOOS/HOOS score, mean (SD),[IC95%]	31.98 (7.73) [29.09-34.87]		31.41 (7.37) [28.66-34.16]	
KL 3 n (%)	13 (43.3%)		18 (60%)	
KL 4 n (%)	17 (56.7%)		12 (40%)	
Total synovitis score, mean	3.77 (0-9)	0.4 (0-9)	2.8 (0-9)	0.6 (0-9)
Lining layer, mean	1.58 (0-3)	0.6 (0-3)	1.2 (0-3)	0.5 (0-3)
Stromal activation, mean	1.5 (0-3)	0.2 (0-3)	1.3 (0-3)	0.4 (0-3)
Infiltrate, mean	1.41 (0-3)	0.3 (0-3)	1.27 (0-3)	0.2 (0-3)
Mastcell/10 hpf, mean (SD), [IC95%]	159.2 (70.49) [132.88-185.52]	20 (5.92) [5.3-34.7]	107.77 (23.55) [94.73-120.81]	14 (2.74) [10.6-17.4]
Vessels/10 hpf, mean (SD), [IC95%]	59.48 (19) [52.25-66.71]	25.2 (3.11) [21.33-29.07]	54.44 (14.11) [47.42-61.46]	16.4 (6.23) [8.67-24.13]

Tabella 1

Legenda:
SD: deviazione standard
IC: intervallo di confidenza

Abbiamo quantificato i mastociti nei frammenti di membrana sinoviale provenienti dai pazienti artrosici e da controlli. I mastociti sono localizzati prevalentemente nello strato sub-intimale in accordo con la letteratura (85) (237) (*Figura 5-6-7)*.

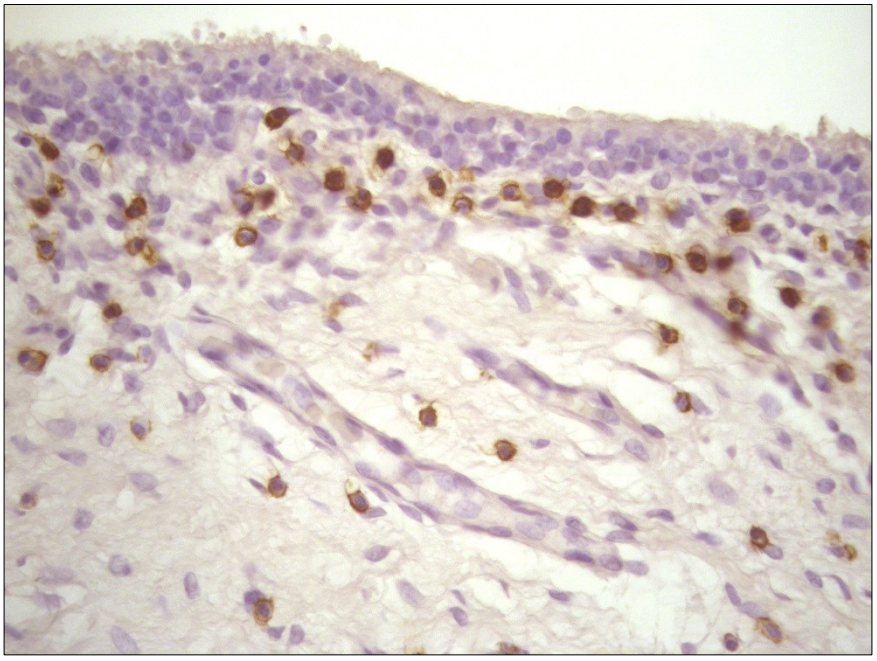


Figura 5: I mastociti sono le cellule risultate positive all'anticorpo anti CD 117 evidenziate con il color marrone, Ingrandimento 40X
Immagine del laboratorio della Clinica Ortopedica dell'Università Politecnica delle Marche.

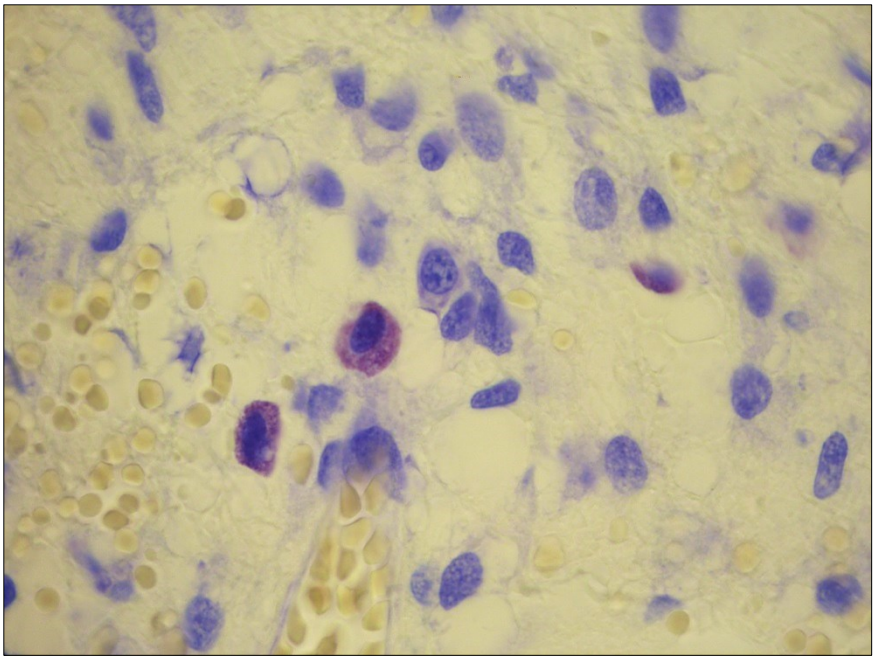


Figura 6: Blu di toluidina (100X). I mastociti presentano metacromasia citoplasmatica.

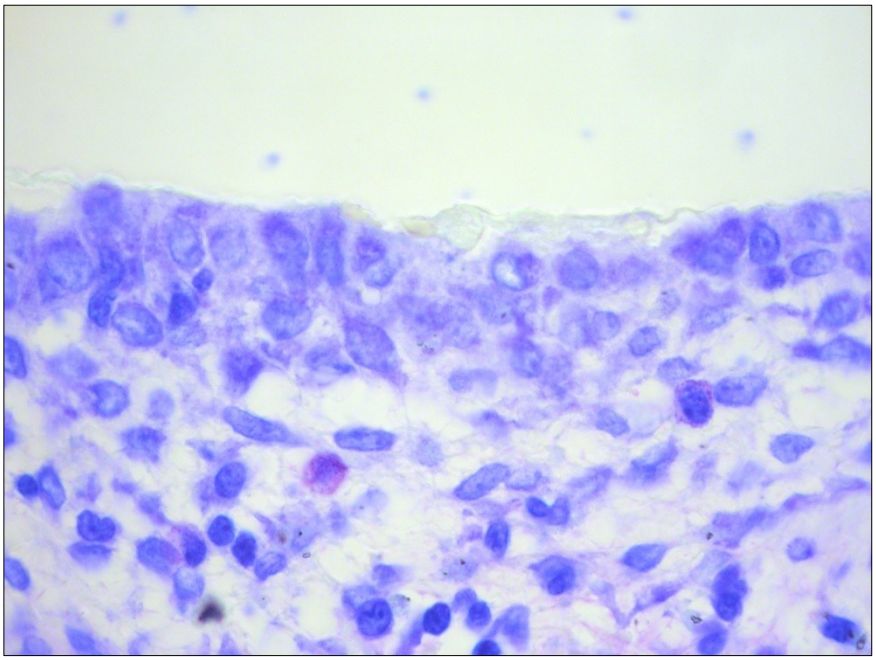


Figura 7: Blu di Toluidina (100X). Mastociti perivascolari con metacromasia

La media dei mastociti per paziente calcolati in 10 hpf è stata di 159.2 IC [132.88 – 185.52] per quanto riguarda il gruppo OA ginocchio, 107.77 IC [94.73 – 120.81] per il gruppo OA anca, 20 IC [5.3 – 34.7] per il gruppo controllo ginocchio e 14 IC [10.6 – 17.4] per il gruppo controllo anca. Tramite l'analisi statistica e lo studio della t di student è stato visto che le medie dei gruppi OA sono maggiori rispetto a quelle dei gruppi controllo e tali differenze sono statisticamente significative (P<0.05) *(Grafico 1)*.

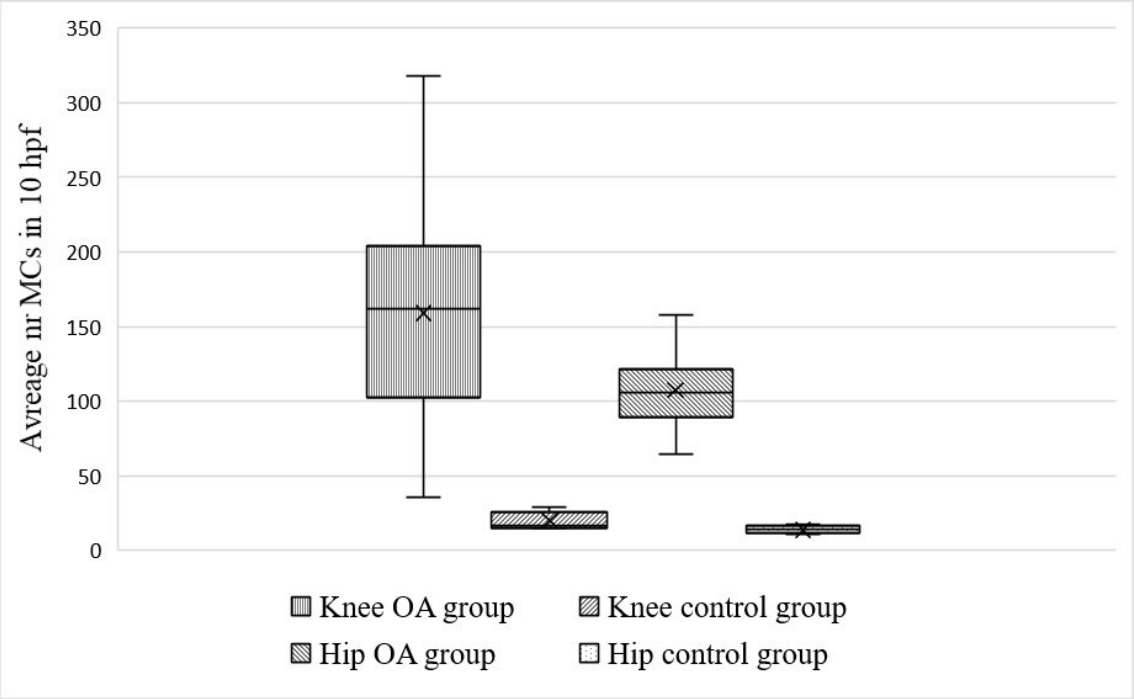


Grafico 1

Per quanto riguarda il synovitis score e il numero di vasi per 10 hpf, abbiamo visto come il valore medio calcolato sui frammenti provenienti da pazienti artrosici è statisticamente maggiore rispetto alla media calcolata nei controlli (P<0.05) (*Grafico 2*). Dai nostri dati è emerso inoltre che il numero di mastociti sembra essere correlato con il valore del sinovitis score e quindi con l'infiammazione della membrana sinoviale. Per quanto riguarda il gruppo OA ginocchio abbiamo diviso tale gruppo in due sottogruppi in relazione del valore del synovitis score, considerando nel primo sottogruppo tutti i frammenti di membrana caratterizzati da un synovitis score < 4, nel secondo i frammenti con synovitis score >4. Abbiamo successivamente calcolato la media della somma di mastociti su 10 hpf nel primo e secondo sottogruppo. La media dei mastociti del secondo sottogruppo è risultata statisticamente maggiore rispetto a quella del primo sottogruppo (P<0.05). I frammenti provenienti dal gruppo OA anca presentano un synovitis score </= 4 (*Grafico 2*).

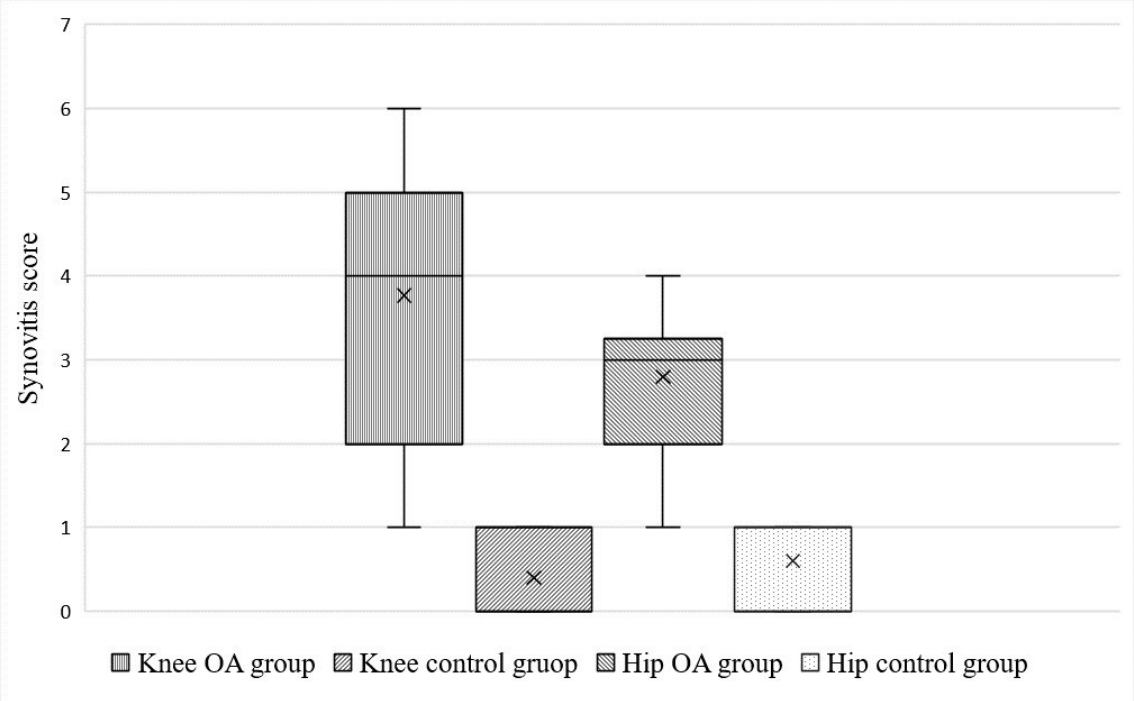


Grafico 2

Per questa ragione abbiamo costituito due sottogruppi, il primo costituito da tutti i frammenti aventi un synovitis score <3, il secondo sottogruppo caratterizzato dallo score infiammatorio >3. Seguendo lo stesso procedimento, descritto precedentemente abbiamo visto che anche nel gruppo OA anca, la media dei mastociti presenti nel secondo sottogruppo è maggiore in modo statisticamente significativo rispetto alla media del primo sottogruppo ($P<0.05$). Per comprendere il possibile contributo dei mastociti nella clinica, in entrambi i gruppi di OA di anca e ginocchio abbiamo posto in relazione la media dei mastociti su 10 hpf con VAS e il valore di funzionalità ottenuto dai questionari di HOOS e KOOS. Abbiamo notato come in entrambi i gruppi, all'aumentare del numero di mastociti abbiamo un trend di crescita della VAS e una diminuzione del punteggio di HOOS (*Grafico 3*) e KOOS (*Grafico 4*).

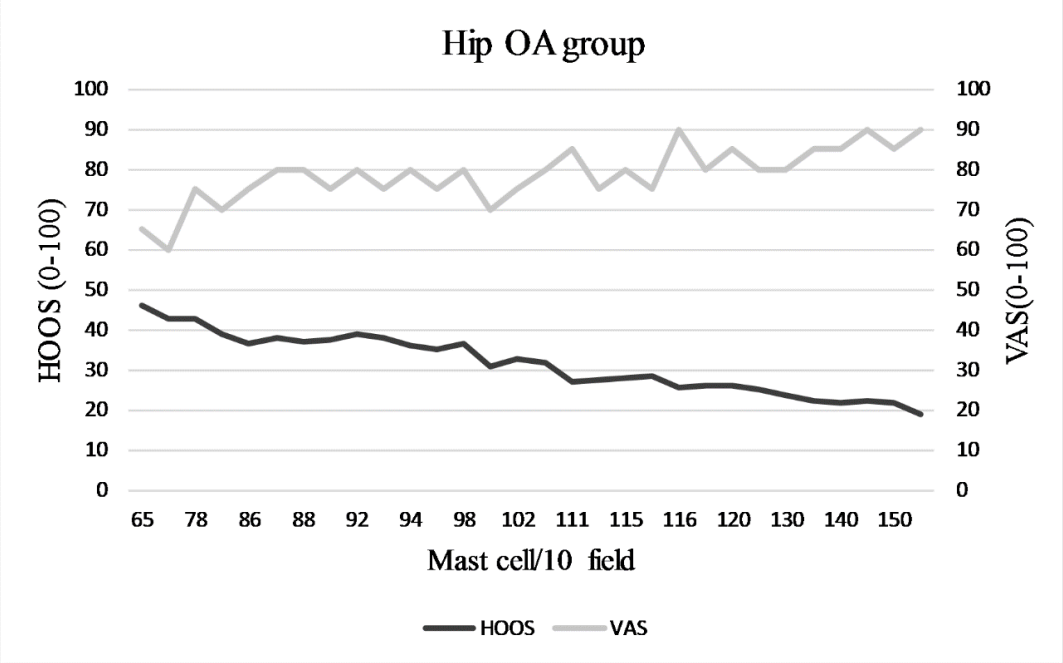


Grafico 3

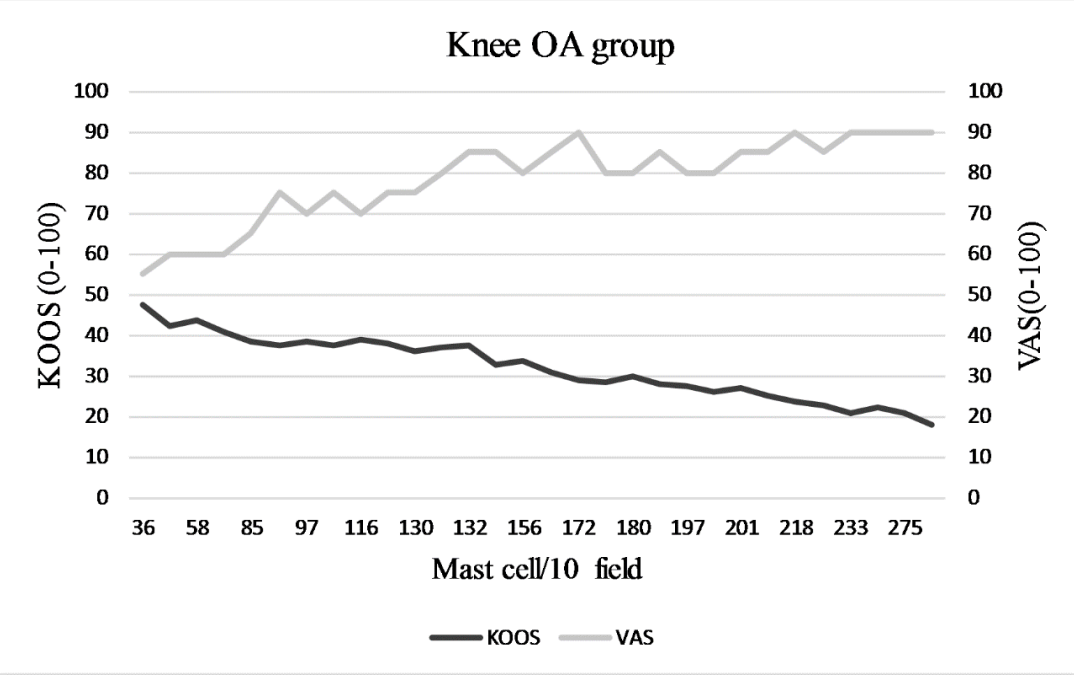


Grafico 4

Per valutare l'associazione tra il numero di mastociti e il danno cartilagineo, in entrambi i gruppi di artrosi abbiamo suddiviso i frammenti di membrana sinoviale in relazione alla classificazione KL. La media dei mastociti in 10 hpf nei frammenti caratterizzati da un'artrosi KL3 è inferiore a quella dei frammenti KL4 anche se tale differenza non è statisticamente significativa ($P>0.05$). I risultati attestano l'attivazione dei mastociti in seguito alla stimolazione con frammenti cartilaginei, il che dimostra un coinvolgimento dei mastociti nella fase precoci della patogenesi artrosica, e le mette in luce come cellule sentinella nell' articolazione e trigger del processo infiammatorio alla base dell'osteoartrosi.

Successivamente, studi preliminari sono andati a valutare l'eventuale tossicità del cromoglicato di sodio sui componenti nobili dell'articolazione, condrociti e legamentociti. La concentrazione plasmatica raggiunta dal cromoglicato di sodio dopo inalazione massima è circa 12,1 ng/mL che corrisponde a 0,0121 µg/mL. Abbiamo valutato l'eventuale tossicità a livello intra articolare fino a un dosaggio 102 superiore a tale valore, a 1 ora, 3 ore, 24 ore e 48 ore di distanza. Per la precisione sono state effettuate infiltrazioni crescenti da 0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 5 µg/mL di Brunicrom 2% messe a confronto con il gruppo controllo, che non ha invece ricevuto sodio cromoglicato.

BRUNICROM 2% dopo 1 ora

CONDROCITI						
	CTRL	**0,01 µg/Ml**	**0,05 µg/mL**	**0,5 µg/mL**	**1 µg/mL**	**5 µg/mL**
	0,052	0,068	0,06	0,064	0,058	0,059
	0,084	0,08	0,075	0,071	0,085	0,061
	0,081	0,076	0,067	0,047	0,06	0,061
MEDIA	0,072333	0,07466667	0,0673333	0,06066667	0,06066667	0,06033333
Dev. St.	0,017673	0,0061101	0,00750555	0,01234234	0,01504438	0,0011547
%vit.		1,03225806	0,93087558	0,83870968	0,93548387	0,83410138
		103%	93%	84%	94%	83%
T test		0,76549118	0,02582363	0,44444444	0,39453857	0,2139988

LEGAMENTOCITI						
	CTRL	**0,01 µg/Ml**	**0,05 µg/mL**	**0,5 µg/mL**	**1 µg/mL**	**5 µg/mL**
	0,118	0,154	0,157	0,15	0,151	0,143
	0,131	0,145	0,137	0,121	0,143	0,132
	0,124	0,126	0,149	0,122	0,132	0,087
MEDIA	0,12343333	0,1416666	0,14766667	0,131	0,142	0,1206666
Dev. St.	0,00650641	0,0142945	0,01006645	0,01646208	0,009539	0,0296704
%vit.		1,13941019	1,18766756	1,0536193	1,14209115	0,097050938
		114%	119%	105%	114%	97%
T test		0,2237941	0,57644128	0,10226304	0,212273	0,2139988

BRUNICROM 2% dopo 3 ore

CONDROCITI						
	CTRL	**0,01 µg/Ml**	**0,05 µg/mL**	**0,5 µg/mL**	**1 µg/mL**	**5 µg/mL**
	0,064	0,066	0,062	0,068	0,062	0,062
	0,083	0,067	0,069	0,056	0,081	0,057
	0,078	0,078	0,056	0,062	0,066	0,059
MEDIA	0,075	0,07033333	0,06233333	0,062	0,06966667	0,05933333
Dev. St.	0,009849	0,00665833	0,00650641	0,006	0,01001665	0,00251661
%vit.		0,93777778	0,83111111	0,82666667	0,92888889	0,79111111
		94%	83%	83%	93%	79%
T test		0,49871959	0,3827866	0,9628096	0,48964441	0,28408567

LEGAMENTOCITI						
	CTRL	0,01 µg/Ml	0,05 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	5 µg/mL
	0,118	0,128	0,146	0,107	0,131	0,111
	0,134	0,107	0,104	0,109	0,124	0,14
	0,123	0,122	0,126	0,119	0,138	0,152
MEDIA	0,125	0,119	0,12533333	0,11166667	0,131	0,13433333
Dev. St.	0,00818535	0,01081665	0,02100794	0,0064291	0,007	0,02107922
%vit.		0,952	1,00266667	0,89333333	1,048	1,07466667
		95%	100%	89%	105%	107%
T test		0,63927783	0,41280782	0,40728914	0,0176544	0,80220306

BRUNICROM 2% dopo 24 ore

CONDROCITI						
	CTRL	0,01 µg/Ml	0,05 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	5 µg/mL
	0,112	0,107	0,103	0,099	0,098	0,098
	0,098	0,093	0,095	0,097	0,094	0,097
	0,095	0,095	0,085	0,093	0,091	0,093
MEDIA	0,101667	0,09833333	0,09433333	0,09633333	0,09433333	0,096
Dev. St.	0,009074	0,00757188	0,0090185	0,00305505	0,00351188	0,00264575
%vit.		0,96721311	0,92786885	0,94754098	0,92786885	0,9442623
		97%	93%	95%	93%	94%
T test		0,18350342	0,0785214	0,29969902	0,15880898	0,30770648

LEGAMENTOCITI						
	CTRL	0,01 µg/mL	0,05 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	5 µg/mL
	0,092	0,09	0,096	0,098	0,108	0,091
	0,089	0,087	0,093	0,095	0,096	0,106
	0,095	0,093	0,111	0,082	0,098	0,091
MEDIA	0,092	0,09	0,1	0,09166667	0,10066667	0,096
Dev. St.	0,03	0,03	0,00964365	0,0085049	0,0064291	0,00866025
%vit.		0,97826087	1,08695652	0,99637681	1,0942029	1,04347826
		98%	109%	100%	109%	104%
T test		=DIV/0!	0,18350342	0,9628096	0,15287422	0,60394098

I dati hanno dimostrato che non ci sono stati significativi cambiamenti nella vitalità delle cellule nobili dell'articolazione, che anzi in alcuni casi risulta aumentata. Infatti, ad un'ora dall'infiltrazione di Brunicrom 2% nelle dosi di 0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL e 1 µg/mL i legamentociti hanno dimostrato una vitalità di rispettivamente di 114 %, 119% e 114% perciò

aumentata. La vitalità di queste cellule seppure minimamente calata nel tempo, a 24 ore è comunque rimasta superiore al 98% nei legamentociti e al 93% nei condrociti. Pertanto, come si evince dai grafici nella loro interezza, i test hanno dimostrato che il cromoglicato di sodio non presenta tossicità rispetto né alla cartilagine né ai legamentociti.

Una volta confermato il ruolo del mastocita sinoviale nella genesi artrosica e appurata la completa tollerabilità del cromoglicato di sodio a livello intra-articolare siamo andati a valutare la capacità di quest' ultimo di inibire l'attività dei mastociti. Per farlo abbiamo allestito una nuova co-coltura di mastociti e cartilagine con l'aggiunta di cromoglicato di sodio 3 mg/ml in seguito all'attivazione dei mastociti stessi con collagene II, così da valutarne le capacità inibenti sul mastocita sinoviale e quindi sulla genesi artrosica (*Grafico 5*).

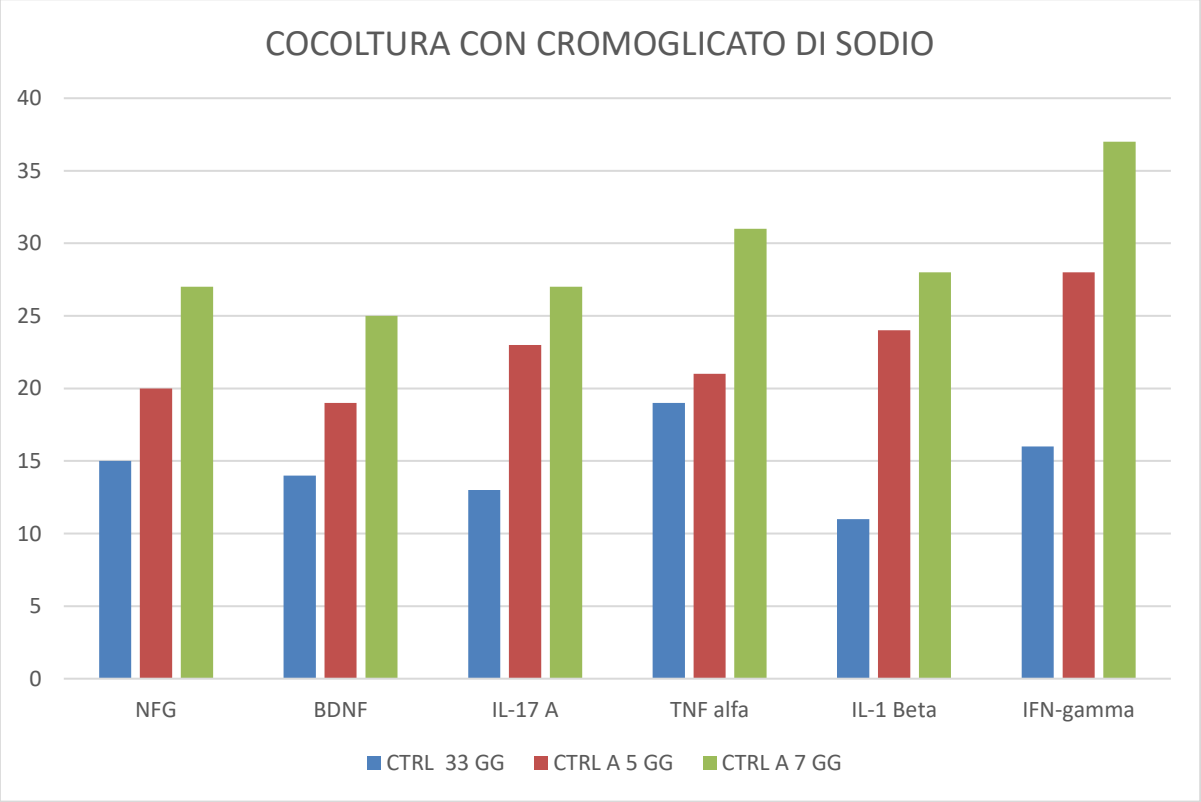


Grafico 5

	CTRL 33 GG	CTRL A 5 GG	CTRL A 7 GG
NFG	15 ng/ml	20 ng/ml	27 ng/ml
BDNF	14 ng/ml	19 ng/ml	25 ng/ml
IL-17 A	13 ng/ml	23 ng/ml	27 ng/ml
TNF alfa	19 ng/ml	21 ng/ml	31 ng/ml
IL-1 Beta	11 ng/ml	24 ng/ml	28 ng/ml
IFN-gamma	16 ng/ml	28 ng/ml	37 ng/ml

I valori risultanti sono stati: dopo 3 giorni NFG 15 ng/ml, BDNF 14 ng/ml, IL-17 A 13 ng/ml, TNF alfa 19 ng/ml, IL-1Beta 11 ng/ml, IFN-gamma 16 ng/ml; dopo 5 giorni NFG 20 ng/ml, BDNF 19 ng/ml, IL-17 A 23 ng/ml, TNF alfa 21 ng/ml, IL-1Beta 24 ng/ml, IFN-gamma 28 ng/ml; dopo 7 giorni NFG 27 ng/ml, BDNF 25 ng/ml, IL-17 A 27 ng/ml, TNF alfa 31 ng/ml, IL-1Beta 28 ng/ml, IFN-gamma 37 ng/ml. Come emerge dai nostri valori, l'aggiunta del cromoglicato di sodio determina una netta riduzione nell'attivazione dei mastociti con conseguente riduzione della produzione di citochine tipiche del microambiente artrosico. Se andiamo infatti a confrontare i valori delle citochine con quelli della co-coltura senza aggiunta di cromoglicato di sodio possiamo notare come in questo caso siano nettamente inferiori (*Grafico 6*).

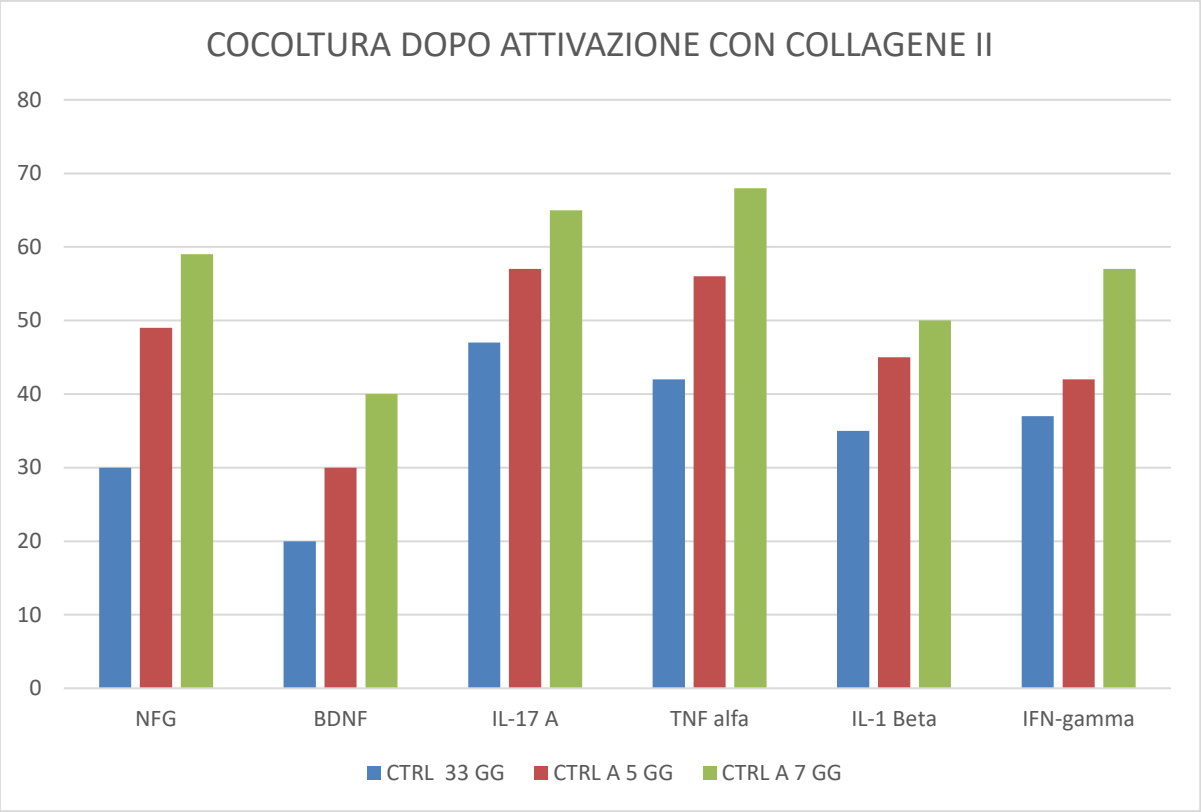


Grafico 6

Infatti, i valori misurati nella co-coltura di cartilagine e mastociti con attivazione degli stessi mediante collagene II sono stati: dopo 3 giorni NFG 30 ng/ml, BDNF 20 ng/ml, IL-17 A 47 ng/ml, TNF alfa 42 ng/ml, IL-1Beta 35 ng/ml, IFN-gamma 37 ng/ml; dopo 5 giorni NFG 49 ng/ml, BDNF 30 ng/ml, IL-17 A 57 ng/ml, TNF alfa 56 ng/ml, IL-1Beta 45 ng/ml, IFN-gamma 42 ng/ml; dopo 7 giorni NFG 59 ng/ml, BDNF 40 ng/ml, IL-17 A 65 ng/ml, TNF alfa 68 ng/ml, IL-1Beta 50 ng/ml, IFN-gamma 57 ng/ml.

Il passo seguente del presente studio è stato valutare l'efficacia del trattamento infiltrativo con acido ialuronico, il quale rappresenta una pratica standardizzata e diffusa nel trattamento dell'artrosi di ginocchio. Tuttavia, tale terapia presenta limiti di durata e grande variabilità di efficacia tra pazienti diversi. Per queste ragioni negli ultimi anni sono stati proposte numerose

associazioni con altri composti che potessero implementarne l'efficacia: sorbitolo, condroitin solfato, mannitolo, steroidi. Dati i risultati importanti ottenuti in vitro con i cromoni abbiamo dunque pensato ad un innovativo farmaco composto da un'associazione tra acido ialuronico e cromoglicato di sodio. Tale associazione permette di combinare le proprietà dei due componenti:

- Acido ialuronico: capacità viscosupplementative, viscoinduttive, antinfiammatorie.
- Cromoglicato di sodio: capacità antinfiammatorie mirate sul mastocita.

La combinazione dei due composti dà origine a una soluzione con un effetto che determina un'azione potenziata: oltre che sintomatica, mirata sul mastocita con effetto a monte sulla cascata infiammatoria. Le dosi utilizzate sono:

- acido ialuronico (800-1200 kDa) 16 mg/2ml, nonché il dosaggio standard nella somministrazione di acido ialuronico intra articolare;
- cromoglicato di sodio 6 mg/2ml, tale dosaggio rappresenta la quantità che si è dimostrata più efficace nel ridurre in vitro la funzionalità del mastocita senza interferire con l'azione dell'acido ialuronico.

Abbiamo inoltre replicato i test di tossicità attraverso il saggio MTT per il cromoglicato di sodio a tale dosaggio, da solo e in associazione ad acido ialuronico (HA).

Test di tossicità ad un'ora

	1	2	3	Media	DS	%vitalità	
Cr-S	0,109	0,139	0,135	0,12766667	0,01628906	0,903302	90%
HA	0,113	0,143	0,17	0,142	0,02851315	1,004717	100%
HA + Cr-S	0,147	0,152	0,165	0,15466667	0,00929157	1,09434	101%
controllo	0,137	0,136	0,151	0,14133333	0,0083865		

Test di tossicità a 3 ore

	1	2	3	Media	DS	%vitalità	
Cr-S	0,138	0,132	0,153	0,141	0,01081665	0,915584	91%
HA	0,097	0,13	0,15	0,12566667	0,0267644	0,816017	81%
HA + Cr-S	0,153	0,152	0,171	0,15866667	0,01069268	1,030303	103%
controllo	0,149	0,155	0,158	0,154	0,00458258		

Test di tossicità a 24 ore

	1	2	3	Media	DS	%vitalità	
Cr-S	0,113	0,112	0,154	0,12633333	0,02396525	0,735922	74%
HA	0,089	0,085	0,112	0,0953333	0,01457166	0,55534	55%
HA + Cr-S	0,095	0,109	0,105	0,103	0,00721111	0,6	60%
Controllo	0,168	0,17	0,177	0,17166667	0,00472582		

Test di tossicità a 48 ore

	1	2	3	Media	DS	%vitalità	
Cr-S	0,132	0,081	0,128	0,11366667	0,02836077	0,734914	73%
HA	0,087	0,083	0,097	0,089	0,0072111	0,575431	58%
HA + Cr-S	0,01	0,093	0,094	0,09566667	0,00378594	0,618534	62%
controllo	0,149	0,142	0,173	0,15466667	0,01625833		

Come si può notare questo dosaggio non ha portato alcuna evidenza di tossicità sulla cartilagine. È importante tenere presente, inoltre, che l'emivita del cromoglicato di sodio è di circa 12 ore. Di conseguenza la lieve riduzione di vitalità nei test a 24 e 48 ore non inficia la tollerabilità del composto. Le concentrazioni raggiunte a livello plasmatico in seguito alla somministrazione inalatoria sono 0,0000121 mg/l. Tale concentrazione non è sufficiente a determinare alcun effetto sul mastocita sinoviale. Per questo la somministrazione per via intra articolare che permette il raggiungimento di una quantità 102 volte superiore rappresenta un'applicazione radicalmente differente per il cromoglicato di sodio. A questa concentrazione infatti è possibile un'azione diretta, dimostrata in vitro sul mastocita sinoviale e quindi sui meccanismi alla base dell'infiammazione e sulla trasmissione della sintomatologia algica.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

È ormai accettato dalla letteratura internazionale come l'artrosi sia una patologia che interessi tutta l'articolazione. Osso, cartilagine e membrana sinoviale comunicano mediante interazioni cellula-cellula e mediante il rilascio di mediatori solubili. L'infiammazione della membrana sinoviale è molto probabilmente un processo secondario indotto dall'attivazione della immunità innata a seguito del danno cartilagineo che caratterizza l'artrosi (69). Per quanto riguarda il primo obiettivo del nostro studio, tutti i frammenti di membrana sinoviale prelevati da entrambi i gruppi artrosici hanno mostrato infiammazione e un numero di mastociti nettamente superiore rispetto ai gruppi di controllo. In accordo con la letteratura, ciò evidenzia come la flogosi della membrana sinoviale non deve più essere considerata esclusiva di malattie infiammatorie

croniche, ma allo stesso tempo caratterizza la patologia osteoartrosica. L'Oarsi ha fornito una nuova definizione di artrosi secondo cui la stessa origina dalla usura della matrice extracellulare e cartilaginea in seguito a microtraumi che portano alla produzione dei pattern molecolari associati al danno (DAMP) i quali attivano il sistema immunitario innato tramite i Toll-like receptors. I TLR sono costitutivamente espressi da una varietà di cellule immunitarie innate inclusi macrofagi e mastociti. Secondo questa nuova lettura dunque, i mastociti possono essere identificati quali cellule sentinella dell'osteoartrosi. Per validare questo modello, si è osservato come in entrambi i gruppi il numero di mastociti sia correlato con il grado di sinovite della membrana. Questo potrebbe indicare che i mastociti sono stimolati a proliferare in un quadro di flogosi, oppure che i mastociti stessi richiamano altri leucociti, espletando il ruolo di sentinelle dell'infiammazione. Infatti, i risultati attestano l'attivazione dei mastociti in seguito alla stimolazione con frammenti cartilaginei, il che dimostra un coinvolgimento dei mastociti nelle fasi precoci della patogenesi artrosica, e le mette in luce come cellule sentinella nell'articolazione e trigger del processo infiammatorio alla base dell'osteoartrosi.

Questi presupposti sul ruolo dei mastociti nell'artrosi di ginocchio, sono stati di fondamentale importanza per lo sviluppo del nostro studio sperimentale sull'uso d'inibitori dell'attività dei mastociti in associazione ad acido ialuronico nel trattamento dell'osteoartrosi (OA). Con inibitori dell'attività dei mastociti s'intendono tutte quelle sostanza in grado di diminuire o inibire l'attività fisiopatologica dei mastociti, come ad esempio gli stabilizzatori della membrana cellulare dei mastociti, i cromoni. Nel nostro studio come forma di realizzazione preferita è stato usato il sodio cromoglicato, che è conosciuto da sempre per il suo impiego per via inalatoria nella terapia dell'asma. Al contrario, nel nostro studio è stato usato in forma iniettabile, nella cocoltura realizzata in laboratorio. Infatti, per verificare la tossicità e l'efficacia del sodio cromoglicato è stata data vita ad una co-coltura di mastociti e condrociti ottenuti da

pazienti sottoposti ad artroprotesi totale di ginocchio, simulando in questo modo un'iniezione diretta nel sito interessato dalla patologia ("iniezione intrarticolare"). Una quantità efficace di sodio cromoglicato per il trattamento dell'osteoartrosi secondo il presente studio può essere nell'intervallo di 2-80 mg, preferibilmente 5-20 mg, preferibilmente disciolto o sospeso in soluzione salina fisiologica o altro idoneo veicolante per iniezione nel corpo umano. Tipicamente 1-4 ml della composizione può essere iniettata in una sola somministrazione.

Inoltre, il presente studio ha utilizzato una composizione che comprendeva una quantità terapeuticamente efficace di almeno un inibitore dell'attività dei mastociti, in particolare di sodio cromoglicato, in combinazione con almeno un altro ingrediente attivo per il trattamento dell'osteoartrosi. Preferibilmente, l'altro agente di trattamento dell'osteoartrosi è sotto forma di una composizione iniettabile, cioè una composizione che nel futuro potrebbe essere iniettata direttamente nel sito interessato dalla patologia. Di conseguenza, esempio di trattamento contemplato dalla presente invenzione include ad esempio un agente per la viscosupplementazione, steroidi o altri ingredienti attivi nel trattamento di questa patologia. Come qui usato, il termine "viscosupplementazione" si riferisce a qualsiasi sostanza che viene utilizzata per ripristinare e/o aumentare l'ammortizzazione e lubrificazione del liquido sinoviale mediante iniezione intrarticolare. Esempi di agenti di viscosupplementazione includono l'acido ialuronico (HA) e altri ialuronato di sodio e composti, che sono zuccheri complessi naturali della famiglia glicosamminoglicano. Acido ialuronico, in particolare, è un polimero a catena lunga contenente unità ripetitive disaccaride di Na-glucoronate-Nacetilglucosamina. A titolo di esempio, disponibili in commercio includono Synvisc®, Hyalgan®, Supartz® e Orthovisc®. Ad esempio, non limitativo, la composizione della presente invenzione può comprendere acido ialuronico in 8-40 mg/ml, preferibilmente 16-32 mg/ml, ad esempio acido ialuronico con peso molecolare 800-1200 KDa. Le composizioni della presente invenzione possono anche

contenere altri materiali come stabilizzanti, conservanti, ed altri additivi noti nello stato della tecnica e compatibili con la via di somministrazione scelta. Le composizioni possono essere in forma liquida o di gel.

ESEMPIO DI FORMULAZIONE

COMPONENTE	QUANTITA' (percentuale in peso)
Sodio cromoglicato	6 mg
Acido ialuronico 800-1200 KDa	16 mg
Tampone fosfato	-q.b.
Acqua	-fino a 2ml

Dal presente studio, si evince dunque come l'aggiunta di sodio cromoglicato alla cocoltura determina una riduzione della liberazione di citochine rispetto allo stato "attivato". Perciò è plausibile ipotizzare come una terapia infiltrativa con cromoglicato di sodio e acido ialuronico possa rappresentare un "Disease modifing therapy" in cui le proprietà reologiche dell'acido ialuronico, si associano alla capacità antinfiammatoria dei cromoni. Ovviamente, addizionali studi sia preclinici che successivamente clinici sono indispensabili per stabilire la sicurezza e l'efficacia clinica di questa terapia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Cartilage, Osteoarthritis. [Online] 9 04 2015. https://www.oarsi.org/research/standardization-osteoarthritis-definitions.

2. *Synovial fluid cell analysis.* M., Dougados. 1996, Bailleres Clin. Rheumatol, Vol. 10, p. 519-534.

3. *Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity.* al., Loeuille D. et. 52, 2005, arthritis Rheum., p. 3492-3501.

4. *Usufulness of high resolution US in the evalutation of effusion in osteoarthitic first carpometacarpal joint.* A, Iagnocco e Coari, G. 29, 2000, Scandal. J. Rheumatol. , p. 170-173.

5. *Synovitis: a potential predective factor of structural progression of tibiofemoral knee osteoarthritis-result of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients.* Aryal, X, Pickering, E.H. e Woodworth, T. 13, 2005, Ostaoarthritis Cartilage , p. 361-367.

6. Sellam, J e Berembaum, F. Clinical feautures of osteoarthritis. *Kelley's Textbook of Rheumatology.* Philadelphia : Firestein G. S., 2008, p. 1547-1560.

7. *The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis* . Sellam, J e Berembaum, F. 6, 2010, Nat Rav Rheumatol, p. 625-635.

8. *Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in ostoarthritis: a review.* BJ, de Lange-Brokaar e Ioan-Facsinay A, Van Osch GJ. 20, 2012, Osteoarthritis Cartilage, p. 1484-1499.

9. *Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis.* PA, Nigrovic e DM, Lee. 217, 2007, Immunol Rev, p. 19-37.

10. Kelly W, Harris E, Ruddy S, et al. Osteoarthritis: Clinical patterns and pathology. *Textbook of rheumatology.* Philadelphia : Sauders, 1985, p. 1432.

11. *The economic cost and social and psychological impact of musculoskeletal conditions.* Yelin E, Callahan LF, for the National Arthritis Data Work Group. 38, 1995, Arthritis Rheum , p. 1351-62,.

12. *Seven chronic conditions: their impact on US adults' activity levels and use of medical services.* Verbrugge LM, Patrick DL. 85, 1995, Am J Public, p. 173-82.

13. *COART France 2003 report on new socioeconomic data on osteoarthritis in France.* M., Solignac. 2004, Presse Med, p. 33.

14. *Estimates of the prevalence of arthritis andother rheumatic conditions in the United States: part II.* Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H,Deyo RA, et al. 58, 2008, Arthritis Rheum, p. 26-35.

15. *Prevalence and Impact of chronic joint symptoms – seven states.* CfDCaP, (CDC). 47, 1998, Morb Mortal Wkly Rep, p. 345–51.

16. *Epidemiologia e costi sociali dell'artrosi in Italia: dati recenti.* Ciocci A, Mauceri T. 46, Reumatismo , p. 14-20.

17. *Sanitary costs of osteoarthritis.* Leardini G, Mascia MT, Stisi S, Sandri G, Franceschini M. 53, 2001, Reumatismo, p. 316-22.

18. *Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations.* ootman JM, Helmick CG. 54, 2006, Arthritis Rheum, p. 226-229.

19. *Prevalence of disabilities and associated health conditions among adults United States.* McNeil JM, Binette J. 2001, MMWR JAMA, p. 120–125.

20. *Aging Processes and the Development of Osteoarthritis.* Loeser, Richard F. 25, 2013, Curr Opin Rheumatol, p. 108–113.

21. *Impact of mechanical trauma on matrix and cells.* D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, et al. 391, 2001, Clin Orthop Relat Res,, p. 90-99.

22. *Cytokines in cartilage injury and repair.* M, Lotz. 391, 2001, Clin Orthop Relat Res, p. 108-115.

23. *Osteoarthritis: epidemiology.* Arden N, Nevitt MC. 20, 2006, Best Pract Res Clin Rheumatol, p. 3-25.

24. *Obesity and knee osteoarthritis.* Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. 109, 1988, The Framingham Study Ann Intern Med, p. 18-24.

25. *The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment.* Felson DT, Goggins J, Niu J, Zhang Y, Hunter DJ. 50, 2004, Arthritis Rheum, p. 3904-3909.

26. *Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review.* E. Yusuf, R.G. Nelissen, A. Ioan-Facsinay, V. Stojanovic-Susulic, J. DeGroot, G. van Osch, S. Middeldorp, T.W. Huizinga, M. Kloppenburg,. 69, 2010, Ann. Rheum. Dis, p. 761–765.

27. *Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin.* M. Rosenbaum, M. Nicolson, J. Hirsch, S.B. Heymsfield, D. Gallagher, F. Chu, R.L. Leibel. 81, 1996, J. Clin. Endocrinol. Metab, p. 3424–3427.

28. *Leptin in osteoarthritis: Focus on articular cartilage and chondrocytes.* Scotece M, Mobasheri A. 140, 2015, Life Sci, p. 75-8.

29. *Pathophysiology of obesity on knee joint homeostasis: contributions of the infrapatellar fat pad.* Santangelo KS, Radakovich LB, Fouts J, Foster MT. 26, 2016 , Horm Mol Biol Clin Investig, p. 97-108.

30. *Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: focus on the role of fat mass and adipokines.* Lago F, Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. 63, 2011 , Arthritis Care Res , p. 1083-90.

31. *Age-associated increases in the size of the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis as measured by 3T MRI.* Chuckpaiwong B, Charles HC, Kraus VB, Guilak F, Nunley JA. 28, 2010, Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, p. 1149-1154.

32. *The infrapatellar adipose body in humans of various age groups.* Jedrzejczyk T, Mikusek J, Rudnicki P, Lopata P. 55, 1996, Folia Morphol, p. 51–55.

33. *The infrapatellar fat pad induces inflammatory and degradative effects in articular cells but not through leptin or adiponectin.* Gross JB, Guillaume C, Gegout-Pottie P, Reboul P, Jouzeau JY, Mainard D, Presle N. 35, 2017, Clin Exp Rheumatol, p. 53-60.

34. *Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study.* Spector TD, Cicuttini J, Baker J, et al. 312, 1996, BMJ, p. 940–44.

35. *Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis.* Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S,Hasegawa A, Koziol J, Lotz MK,D'Lima DD. 19, 2011, Osteoarthritis Cartilage, p. 1132-1141.

36. *Management of osteoarthritis of the knee.* Bennel K.L., Hunte D. Jr., Hinman R.S. 2012, BMJ,, p. 345.

37. *Occupational risk factors for osteoarthritis of the knee: a meta-analysis.* McWilliams DF, Leeb BF, Muthuri SF, Doherty M, Zhang W. 91, 2011, Osteoarthritis & Cartilage, p. 829–39.

38. BBC, News. Compulsory retirement age at 65 fully abolished. 2011.

39. *Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!).* F., Berenbaum. 1, 2013, Osteoarthritis Cartilage, p. 16-21.

40. *Inflammatory synovitis in degenerative joint disease.* Goldenberg DL, Egan MS, Cohen AS. 9, 1982, J Rheumatol. , p. 204–9.

41. *Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis.* Lindblad S, Hedfors E. 30, 1987, Arthritis Rheum, p. 1081–8.

42. *Subtyping of osteoarthritic synoviopathy.* Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T. 20, 2002, Clin Exp Rheumatol, p. 633–40.

43. *Synovitis score: discrimination between chronic low grade and high grade synovitis.* Kreen V, Morawietz L, Burmester GR et al. 49, 2006, Histopathology, p. 358-364.

44. *Synovial inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: molecular characterization and relationship to symptoms.* Scanzello CR, McKeon B, Swaim BH, DiCarlo E, Asomugha EU, Kanda V, Nair A, Lee DM,. 63, 2011, Arthritis Rheum. 2011; 63:391–400, p. 391–400.

45. *The reliability of a new scoring system for knee osteoarthritis MRI and the validity of bone marrow lesion assessment: BLOKS (Boston Leeds Osteoarthritis Knee Score).* Hunter DJ, Lo GH, Gale D, Grainger AJ, Guermazi A, Conaghan PG. 67, 2008, Ann Rheum Dis., p. 206–11.

46. *Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis.* . Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, Tirman PF, Miaux Y, White D, Kothari M, Lu Y, Fye K, Zhao S, Genant HK. 12, 2004, Osteoarthritis Cartilage, p. 177–190.

47. *Assessment of synovitis in the osteoarthritic knee: Comparison between manual egmentation, semiautomated segmentation, and semiquantitative assessment using contrast-enhanced fat-suppressed T1-weighted MRI.* Fotinos-Hoyer AK, Guermazi A, Jara H, Eckstein F, Ozonoff A, Khard H, Norbash A, Bohndorf K, Roemer FW. 64, 2010; , Magn Reson Med., p. 604–609.

48. *Anatomical distribution of synovitis in knee osteoarthritis and its association with joint effusion assessed on non-enhanced and contrast-enhanced MRI.* Roemer FW, Kassim Javaid M, Guermazi A, Thomas M, Kiran A, Keen R, King L, Arden NK. 18, 2010, Osteoarthritis Cartilage, p. 1269-1274.

49. *Contrast-enhanced ultrasound in monitoring the efficacy of a bradykinin receptor 2 antagonist in painful knee osteoarthritis compared with MRI.* Song IH, Althoff CE, Hermann KG, Scheel AK, Knetsch T, Burmester GR, Backhaus M. 68, 2009, Ann Rheum Dis., p. 75–83.

50. *Synovial thickening detected by MR imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis.* Fernandez-Madrid F, Karvonen RL, Teitge RA, Miller PR, An T, Negendank WG. 13, 1995, Magn Reson Imaging, p. 177–83.

51. *Correlation between synovitis detected on enhanced-magnetic resonance imaging and a histological analysis with a patient-oriented outcome measure for Japanese patients with end-stage knee osteoarthritis receiving joint replacement surgery.* Liu L, Ishijima M, Futami I,

Kaneko H, Kubota M, Kawasaki T, Matsumoto T, Kurihara H, Ning L, Xu Z, Ikeda H, Takazawa Y, Saita Y, Kimura Y, Xu S, Kaneko K, Kurosawa H. 29, 2010, Clin Rheumatol. , p. 1185–90.

52. *Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity.* Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A et al. 52, 2005, Arthritis Rheum. , p. 3492–501.

53. *Clinical and ultrasonographic predictors of joint replacement for knee osteoarthritis: results from a large, 3- year, prospective EULAR study. .* Conaghan PG, D'Agostino MA, Le Bars M, Baron G, Schmidely N, Wakefield R, Ravaud P, Grassi W, Martin-Mola E, So A, Backhaus M, Malaise M, Emery P, Dougados M. 69, 2010, Ann Rheum Dis. , p. 644–647.

54. *NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. .* Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. 11, 2010, Curr Drug Targets. , p. 599–613.

55. *The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis.* Bondeson, J., Blom, A., Wainwright, S., Hughes, C., Caterson, B. and van den Berg, W. 62, Arthritis Rheum, p. 647–657.

56. *Innate immune recognition.* R., Janeway CA Jr. Medzhitov. 20, 2002, Annu Rev Immunol. , p. 197–216.

57. *DAMPening inflammation by modulating TLR signalling.* Piccinini AM, Midwood KS. 2010, Mediators Inflamm. .

58. *RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide.* Carrion M, Juarranz Y, Perez-Garcia S, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP, Gutierrez-Canas I. 63, 2011, Arthritis Rheum., p. 1626–1636.

59. *Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling.* Kyburz D, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Gay RE, Carson DA, Gay S. 48, 2003, Arthritis Rheum., p. 642–50.

60. *Toll-like receptor signalling.* Akira S, Takeda K. 4, 2004, Nat Rev Immunol, p. 499–511.

61. *Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.* Chevalier X, Groult N, Larget-Piet B, Zardi L, Hornebeck W. 37, 1994, Arthritis Rheum. , p. 1013–22.

62. *Presence of ED-A containing fibronectin in human articular cartilage from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.* Chevalier X, Claudepierre P, Groult N, Zardi L, Hornebeck W. 23, 1996, J Rheumatol., p. 1022–30.

63. *Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees.* Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M. 56, 1997, Ann Rheum Dis, p. 299–307.

64. *The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis.* Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N. 9, 2001, Osteoarthritis Cartilage, p. 654–63.

65. *Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis.* Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Ribeiro-Dias F, van den Berg WB. 118, 2008, J Clin Invest, p. 205–216.

66. *The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes.* Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, Kim HY. 54, 2006, Arthritis Rheum, p. 2152–63.

67. *Chondrocyte innate immune myeloid differentiation factor 88-dependent signaling drives procatabolic effects of the endogenous Toll-like receptor 2/Toll-like receptor 4 ligands low molecular weight hyaluronan and high mobility group box chromosomal protei.* Liu-Bryan R, Terkeltaub R. 62, 2010, Arthritis Rheum., p. 2004–12.

68. *The (-1486T/C) promoter polymorphism of the TLR-9 gene is associated with end-stage knee osteoarthritis in a Chinese population.* Su SL, Yang HY, Lee CH, Huang GS, Salter DM, Lee HS. 2011, J Orthop Res. .

69. *Early alteration of synovial membrane in osteoarthrosis.* Cantatore FP, Benazzo F, Ribatti D, Lapadula G, D'Amico S, Tursi A, Pipitone V. 7, 1988, Clin Rheumatol., p. 214–9.

70. *Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane.* Konttinen YT, Ceponis A, Meri S, Vuorikoski A, Kortekangas P, Sorsa T, Sukura A, Santavirta S. 55, 1996, Ann Rheum Dis. , p. 888–94.

71. *A cartilage catabolic factor from synovium.* Dingle JT, Saklatvala J, Hembry R, Tyler J, Fell HB, Jubb R. 184, 1979, Biochem J. , p. 177–80.

72. *Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes.* Richardson DW, Dodge GR. 61, 2000, Am J Vet Res, p. 624–30.

73. *Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes.* Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. 82, 1988, J Clin Invest, p. 2026–37.

74. *Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins.* Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R, Rosenfeld SA, Copeland RA et al. 284, 1999, Science, p. 1664–6.

75. *Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3.* Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. 43, 2000, Arthritis Rheum., p. 801–11.

76. *The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors.* Kokebie R, Aggarwal R, Lidder S, Hakimiyan AA, Rueger DC, Block JA, Chubinskaya S. 2011, Arthritis Res Ther.

77. *Interleukin-1 receptor antagonist production in cultured synovial cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.* Fujikawa Y, Shingu M, Torisu T, Masumi S. 54, 1995, Ann Rheum Dis, p. 318–20.

78. T., Srikulmontree. Osteoarthritis. [Online] 2012,. [Riportato: 01 07 2017.] http://www.rheumatology.org..

79. Banks K, Hengeveld E. Maitland's clinical companion: an essential guide for students. 2012.

80. *EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis.* Zhang W, Doherty M, Peat G, Bierma-Zeinstra MA, Arden NK, Bresnihan B, et al. 69, 2010, Ann Rheum Dis., p. 483-9.

81. Conaghan PG, Felson DT. Structural associations of osteoarthritis pain: lessons from magnetic resonance imaging. *Novartis Found Symp,.* 2004, pp. 260: .

82. Garnero P, Peterfy C, Zaim S, Schoenharting M. Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study. *Arthritis Rheum,.* 2005, 52, p. 2822-9.

83. *Knee osteoarthritis prevalence, risk factors,pathogenesis and features: Part I.* B., Heidari. 2012, Caspian J Intern Med, p. 205-212.

84. *Subchondral magnetic resonance imaging changes in early osteoarthrosis associated with tibial osteonecrosi.* Lotke PA, Ecker ML, Barth P, Lonner JH. ,. 16, 2000, Arthroscopy, p. 76-81.

85. *Which radiographic techniques should we use for research and clinical practice?* C.Which, Buckland-Wright. 20, 2006, Best Pract Res Clin Rheumatol, p. 39-55.

86. *Atlas of standard radiographs.* Kellgren JH, Jeffrey M, Ball J. Oxford : s.n., 1963, Blackwell Scientific.

87. *Definition of osteoarthritis of the knee for epidemiological studies.* Spector TD, Hart DJ, Byrne J, Harris PA. [a cura di] 52. 1993, Ann. Rheum. Dis, p. 790-794.

88. *Differences in descriptions of Kellgren and Lawrence grades of knee osteoarthritis.* Schiphof D, Boers M, Bierma-Zeinstra SMA. 67, 2008, Ann. Rheum. Dis, p. 1034-1036.

89. *Association of painwith radiological changes in different compartments and views of the knee joint.* Cicuttini FM, Baker J, Hart DJ, Spector TD. 4, 1996, Osteoarthritis Cartilage, p. 143-147.

90. *Clinical signs of early osteoarthritis: reproducibility and relation to X-ray changes in 541 women in the general population.* Hart DJ, Spector TD, Brown P, Wilson P, Doyle DV, Silman A. 50, 1991, Ann Rheum Dis, p. 467-470.

91. *Radiographic assessment of osteoarthritis in population studies: whither Kellgren and Lawrence?* Spector TD, Cooper C. 1, 1993, Osteoarthritis Cartilage, p. 203–206.

92. *Osteoarthrosis of the knee. a radiographic investigation.* S., Ahlbäck. 277, Stockh : s.n., 1968,, Acta Radiol Diagn , p. 7–72.

93. *The etiology of chondromalacia patellae.* RE, Outerbrigde. 43, 1961, J Bone joint Surg Br, p. 752-757.

94. *A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy.* FR, Noyes e CL, Stabler. 17, 1989, Am J Sport Med, p. 505-513.

95. *Clinical evaluation of cartilage defects and repair.* M, Brittberg. Goteborg : s.n., 2000. "Cartilage and Cartilage repair in th new Millenium".

96. *Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment.* KEITH SINUSAS, MD. 2001, American Family Physician, p. 50-56.

97. *Practice guidelines Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee.* 2011, Rheumatology.

98. *EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis.* Fernandes L., Hagen K.B., Bijlsma J.W.J et al. 2013, Ann Rheum Dis.

99. *Osteoarthritis: the care and management of osteoarthritis in adults.* Conditions., National Collaborating Centre for Chronic. 59, 2008, p. 1.

100. *Land-based exercise for osteoarthritis of the knee: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Fransen M, McConnell S. J Rheumatol, pp. 36:. 36, 2009, p. 1109-17.

101. *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: Part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through*

January 2009. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, et al. 18, 2010, Osteoarthritis Cartilage, p. 476-99.

102. *Land-based exercise for osteoarthritis of the knee: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Fransen M, McConnell S. 36, 2009, J Rheumatol,, p. 1109-17.

103. *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis PART II OARSI evidence-based, expert consensus guidelines.* Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, Tugwell P. 16, 2008, Osteoarthritis Cartilage, p. 137–62.

104. *Care and management of osteoarthritis in adults: summary of NICE guidance.* Conaghan PG, Dickson J, Grant RL. 336, 2008, BMJ, p. 502-3.

105. *Physical exercise and reduction of pain in adults with lower limb osteoarthritis: a systematic review.* Escalante Y, Saavedra JM, Garcia-Hermoso A, et al. 23, 2010, J back Musculoskelet Rehabil, p. 175-86.

106. *Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis.* Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. 66, 2007, Ann Rheum Dis, p. 433-9.

107. *Ottawa Panel evidence-based clinical practice guidelines for the management of osteoarthritis in adults who are obese or overweight.* Brosseau L, Wells GA, Tugwell P, Egan M, Dubouloz CJ, Casimiro L, et al. 91, 2011, Physical Ther, p. 843-61.

108. *Acetaminophen for osteoarthritis.* Towheed TE, Maxwell L, Judd MG, Catton M, Hochberg, Wells G. 2006, Cochrane Database Syst Rev.

109. *American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee.* Hochberg MC, Altman RD, Toupin April K, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J, et al. 64, 2012,, Arthritis Care Res, p. 465-74.

110. *The management of osteoarthritis:an overview and call to appropriate conservative treatmentment.* Hunter DJ, Lo GH. 34, 2008, Rheum Dis Clin North Am., p. 689-712.

111. *A double-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy and safety of duloxetine for the treatment of chronic pain due to osteoarthritis of the knee.* Chappell AS, Desaiah D, Liu-Seifert H, Zhang S, Skljarevski V, Belenkov Y, et al. 11, 2011, Pain Pract, p. 33-41.

112. *Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem celldifferentiation toward tissue regeneration.* Busilacchi, A., Gigante, A., Mattioli-Belmonte, M., Manzotti, S., & Muzzarelli, R. A.A. 98,, 2013, Carbohydrate Polymers, p. 665–676.

113. *Oral chondroprotection with nutraceuticals made of chondroitin sulphate plus glucosamine sulphate in osteoarthritis.* Bottegoni C., Muzzarelli R., Giovannini F., Busilacchi A., Gigante A. 2014, Carbohydrate Polymers, p. 126–138.

114. *Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee.* Bellamy N, Campbell J, Welch V, Gee TL, Bourne R, Wells GA. 2009,, Cochrane Database Syst Rev.

115. *Local effects of intra-articular corticosteroids.* . Habib GS, Saliba W, Nashashibi M. 29:, 2010, Clinical Rheumatology, p. 347–56.

116. *The efficacy and duration of intra-articular corticosteroid injection for kneeosteoarthritis: a systematic review of level I studies.* Hepper CT, Halvorson JJ, Duncan ST, Gregory AJ, Dunn WR, Spindler KP. 17, 2009, J Am Acad Orthop Surg, p. 638-646.

117. *Clinical comparison of triamcinolonehexacetonide and betamethasone in the treatment of the knee-joint.* EJ, Valtonen. 41, 1981, Scand J Rheumatol Suppl, p. 1-7.

118. *Intra-articular steroids in knee osteoarthritis: a comparative study of triamcinolone hexacetonide and methylprednisolone acetate.* Pyne D, Ioannou Y, Mootoo R, Bhanji A. 23, 2004, Clin Rheumatol, p. 116-120.

119. *Intra-articular triamcinolone hexacetonide in knee osteoarthritis: factors influencing the clinical response.* Gaffney K, Ledingham J, Perry JD. 1999, Ann Rheum Dis.

120. *Lidocaine potentiates the chondrotoxicity of methylprednisolone.* Seshadri V, Coyle CH, Chu CR. 5, 2009, Arthroscopy, p. 337-347.

121. *The role of intra-articular hyaluronan (Sinovial) in the treatment of osteoarthritis.* Gigante A, Callegari L. 31, 2011, Rheumatol Int., p. 427-44.

122. *Hyaluronic acid and knee osteoarthritis.* N, Bellamy. 55, 2006, J Fam Pract, p. 967-8.

123. *Intra-articular hyaluronan therapy.* KW, Marshall. 8, 2003, p. 221-232.

124. *Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee.* Bernstein J, Hou SM, Wang CT. 2004, J Bone Joint Surg Am.

125. *Evidence based knee injections for the management of arthritis.* Cheng T.O., Souzdalnitsk D.i, Vrooman B. 2012.

126. *Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis.* Lo GH, LaValley M, McAlindon T, Felson DT. 290, 2003, JAMA,, p. 3115-21.

127. *Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee.* Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. 2006, Cochrane Database Syst Rev.

128. *Intraarticular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee:systematic review and meta-analysis.* Arrich J, Piribauer F, Mad P, Schmid D, Klaushofer K, Mullner M. 172, 2005, p. 1039-43.

129. *Knee osteoarthritis diagnosis, treatment and associated factors of progression: part II.* B.Heidari. 2011, Caspian J Intern Med.

130. *Infiltrative treatment with Platelet Rich Plasma (PRP).* Mangone G., et al. 11, 2014, Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism, p. 67-72.

131. *Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis.* Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, et al. 68, 2007, Am J Vet Res, p. 290-6.

132. *Homologous platet-rich plasma for the treatment of knee involment in primary Sjogrens syndrome.* Bottegoni C, Farinelli L, Aquili A, Chiurazzi E, Gigante A. 2016, J Biol Regul Homeost Agents.

133. *Platelet-rich plasma: Intraarticular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions.* Kon E, Buda R, Filardo G, et al. 18, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, p. 472-479.

134. *Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis.* Jang SJ, Kim JD, Cha SS. 23, 2013, Eur J Orthop Surg Traumatol,, p. 573-80.

135. *Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee.* 2000, Arthritis & Rheumatism.

136. *Arthroscopy of the knee joint.* Burman MS, Finkelstein H, Mayer L. 16, 1934, J Bone Joint Surg Am, , p. 255e68.

137. *Management of Primary Knee Osteoarthritis and Indications for Total Knee Arthroplasty for General Practitioners.* Van Manen M.D, Nace J. 2012, The Journal of the American Osteopathic Association.

138. *Effect of arthroscopic debridement for osteoarthritis of the knee on health-related quality of life.* Dervin GF, Stiell IG, Rody K, Grabowski J. 2003, J Bone Joint Surg Am, p. 10-19.

139. *The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee.* Joern W.-P. Michael, Klaus U. Schlüter-Brust, Peer Eysel. 107, 2010, Deutsches Ärzteblatt International,, Deutsches Ärzteblatt International,, p. 152–62.

140. *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.* Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 331, 1984, N Engl J Med, p. 889–95.

141. *Engineered articular cartilage: influence of the scaffold on cell phenotype and proliferation.* Gigante A., et al. 14, 2003, J Mater Sci, p. 713-716.

142. *Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery.* Gigante A., Bevilacqua C., Ricevuto A., Mattioli-Belmonte M., Greco F. 15, 2007, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, p. 88–92.

143. *A Prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee* . Bentley G, Biant LC, Carrington WJ, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, Skinner JA, Pringle J. 2003, J Bone Joint Surg, p. 223–230.

144. *The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee.* Joern W.-P. Michael, Klaus U. Schlüter-Brust, Peer Eysel. 107, 2010, Deutsches Ärzteblatt International, p. 152–62.

145. *Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial.* Horas U, Pelinkovic D, Herr G, et al. 85, J bone Joint Surg (Am),, p. 185–92.

146. *Autologous osteochondral grafting-technique and long-term results.* Hangody L, Vásárhelyi G, Hangoy LR, et al. 2008, Injury, p. 32–9.

147. *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part I: Critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence.* Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N et al. 15, 2007, Osteoarthritis Cartilage, p. 981-1000.

148. *High tibial osteotomy for the treatment of osteoarthritis of the knee: a review of the literature and a meta-analysis of follow-up studies.* Virolainen P, Aro HT. 2004, Arch Orthop Trauma Surg, Vol. 124, p. 258-61.

149. *Radiographic patterns and associations of osteoarthritis of the knee in patients referred to hospital.* Ledingham J, Regan M, Jones A, Doherty M. 52, 1993,, Ann Rheum Dis, p. 520-6.

150. *Unicompartmental knee arthroplasty for the treatment of unicompartmental.* Griffin T, Rowden L, Morgan D, Atkinson R, Woodruff P, Maddern G. 77, 2007, osteoarthritis, p. 214-22.

151. *Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty: a qualitative and systematic review of the literature.* Ethgen O, Bruyere O, Richy F, dardennes C, Reginster J-Y. 86, 2004, J Bone Joint Surg Am, p. 963-74.

152. *Kinemax Outcomes Group. Predicting the outcome of total knee arthroplasty.* Lingard EA, Katz JN, Wright EA, Sledge CB. 86, 2004, J Bone Joint Surg Am, p. 2179-86.

153. *Relazione sullo stato sanitario del paese. Ministero della Salute. 2009-2010.*

154. *Complications of Total Knee Arthroplasty Standardized List and Definitions of The Knee Society.* William L. Healy MD, Craig J. Della Valle MD, Richard Iorio MD,et al. 471, 2013, Clin Orthop Relat Res, p. 215–220.

155. *Periacetabular osteotomy; preoperative radiographic predictors of outcome.* Murphy S, Deshmukh R. 405, 2002, Clin Orthop Relat Res, p. 168-174.

156. *Hip resurfacing: a tecnology reborn.* Cutts S, Carter PB. 82, 2006, Post grad Med J, p. 802-5.

157. *Timing of total joint replacement affects clinical outcomes among patients with osteoarthritis of the hip or knee.* Fortin PR, Penrod JR, Clarke AE et al. 46, 2002, Arthritis Rheum, p. 3327-30.

158. *Association between hospital and surgeon procedure volume and outcomes of total hip replacement in the United states medicare population.* Katz JN, Losina E, Barret J, et al. 83-A, 2001, J Bone Joint Surg Am, p. 1622-9.

159. *Mast cells in inflammatory arthritis.* Nigrovic, Peter A e Lee, David M. 7, 2004, Arthritis Res Ther, p. 1-11.

160. *Mast cells.* Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA:. 77, 1997, Physiol Rev, p. 1033-1079.

161. *Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. .* Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ. 271, 1996, Science, p. 818-822.

162. *The c-kit receptor, stem cell factor and mast cells. What each is teaching us about the others.* Galli SJ, Tsai M, Wershil BK:. 142, 1993, Am J Pathol, p. 965-974.

163. *The biology of IGE and the basis of allergic disease.* Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite L. 21, 2003, Annu Rev Immunol , p. 579-628.

164. *Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6.* Huang C, Friend DS, Qiu WT, Wong GW, Morales G, Hunt J,Stevens RL:. 160, 1998, J Immunol, p. 1910-1919.

165. *The immediate phase of c-kit ligand stimulation of mouse bone marrow-derived mast cells elicits rapid leukotriene C4 generation through posttranslational activation of cytosolic phospholipase A2 and 5-lipoxygenase.* Murakami M, Austen KF, Arm JP:. 182, 1995, J Exp Med, p. 197-206.

166. *Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-α/cachectin.* Gordon JR, Galli SJ. 346, 1990, Nature, p. 274-276.

167. *Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with Schistosoma mansoni.* King CL, Xianli J, Malhotra I, Liu S, Mahmoud AA, Oettgen HC. 158, 1997, J Immunol, p. 294-300.

168. *IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with Trichinella spiralis.* Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Friend DS, Oettgen HC. 172, 2004, J Immunol , p. 1139-1145.

169. *Mast cells as sentinels of innate immunity. .* Galli SJ, Maurer M, Lantz CS:. 11, 1999, Curr Opin Immunol, p. 53-59.

170. *Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis.* Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. 381, 1996, Nature, p. 75-77.

171. *Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-α. ,.* Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN:. 381, 1996, Nature , p. 77-80.

172. *Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria.* Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, Abraham SN. 152, 1994, J Immunol, p. 1907-1914.

173. *Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis.* Malaviya R, Abraham SN. 67, 2000, J Leukoc Biol, p. 841-846.

174. *Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells.* McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH, Marshall JS. 170, 2003, J Immunol, p. 1625-1629.

175. *Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines.* Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG. 14, 2002, Int Immunol 14, p. 1065-1074.

176. *Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo.* Dvorak AM, McLeod RS, Onderdonk A, Monahan-Earley RA, Cullen JB, Antonioli DA, Morgan E, Blair JE, Estrella P, Cisneros RL, et al. 99, 1992, Int Arch Allergy Immunol, p. 74-83.

177. *Mast cell modulation of immune responses to bacteria.* Malaviya R, Abraham SN:. 179, 2001, Immunol Rev , p. 16-24.

178. *Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues.* Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, von Andrian UH. 4, 2003, Nat Immunol, p. 965-973.

179. *Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment.* Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD. 4, 2003, Nat Immunol, p. 982-990.

180. *Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen independent effects of IgE.* Bryce PJ, Miller ML, Miyajima I, Tsai M, Galli SJ, Oettgen HC. 20, 2004, Immunity 2004, p. 1-20.

181. *Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection.* McLachlan JB, Hart JP, Pizzo SV, Shelburne CP, Staats HF, Gunn MD, Abraham SN. 4, 2003, Nat Immunol 2003, p. 1199-1205.

182. *Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: up-regulation by IFN-gamma.* Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD:. 164, 2000, J Immunol, p. 4332-4339.

183. *Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis.* Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. 258, 1992, Science, p. 1957-1959.

184. *Neutrophil elicitation in the reverse passive Arthus reaction. Complement-dependent and independent mast cell involvement.* Ramos BF, Zhang Y, Jakschik BA:. 152, 1994, J Immunol, p. 1380-1384.

185. *The microscopic structure of normal human synovial tissue .* W:, Castor. 3, 1960, Arthritis Rheum, p. 140-151.

186. *Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. .* Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. 27, 1984, Arthritis Rheum, p. 845-851.

187. *Mast cells at sites of cartiage erosion in the rheumatoid joint. .* Bromley M, Fisher WD, Woolley DE. 43, 1984, Ann Rheum Dis, p. 76-79.

188. *Quantitation of human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases.* HP, Godfrey, Ilardi, C e al., Engber W et. 8, 1984, Arthritis Rheum, p. 852-856.

189. *Histamine in rheumatic diseases.* Partsch G, Schwagerl W, Eberl R. 41, 1982, Z Rheumatol , p. 19-22.

190. *Preliminary study of the tryptase levels in the synovial fluid of patients with inflammatory arthritis.* Lavery JP, Lisse JR:. 72, 1994, Ann Allergy, p. 425-427.

191. *Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis.* Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, Walchshofer S, Ghannadan M, Willheim M, Sillaber C, Graninger WB, Smolen JS, Valent P. 41, 1998, Arthritis Rheum, p. 233-245.

192. *Distribution, activation and tryptase/chymase phenotype of mast cells in the rheumatoid lesion.* Tetlow LC, Woolley DE:. 54, 1995, Ann Rheum Dis, p. 549-555.

193. *Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content.* Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST:. 155, 1995, J Immunol, p. 297-307.

194. *Human mast cell subsets – distinct functions in inflammation? .* McNeil HP, Gotis-Graham I:. 49, 2000, Inflamm Res, p. 3-7.

195. *Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression.* Gotis-Graham I, McNeil HP:. 40, 1997, Arthritis Rheum, p. 479-489.

196. *Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. .* Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. 297, 2002, Science, p. :1689-1692.

197. *The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis.* Corr M, Crain B. 169, 2002, J Immunol, p. 6604-6669.

198. *Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity.* Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. 87, 1996, Cell , p. 811-822.

199. *From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins.* Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL,. 10, 1999, Immunity, p. 451-461.

200. *Arthritis critically dependent on innate immune system players.* Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, et al. 16, 2002, Immunity, p. 157-168.

201. *Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. .* Maccioni M, Zeder-Lutz G, Huang H, Ebel C, Gerber P, Hergueux J, Marchal P, Duchatelle V, Degott C, van Regenmortel M, et al. 195, 2002, J exp Med, p. 1071-1077.

202. *Hemolytic complement in synovial fluid.* Pekin TJ Jr, Zvaifler NJ. 43, 1965,, J Clin Invest, p. 1372-1382.

203. *Activation of mammalian Toll like receptors by endogenous agonists.* Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL:. 23, 2003, Crit Rev Immunol, p. 15-44.

204. *Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo.* Gaboury JP, Johnston B, Niu XF, Kubes P. 154, 1995, J Immunol, p. 804-813.

205. *Ultrastructure of synovial changes in rheumatoid disease and in seronegative inflammatory arthropathies.* Hollywell C, Morris CJ, Farr M, Walton KW:. 400, 1983, Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol , p. 345-355.

206. *Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis.* C:, Ritchlin. 2, 2000, Arthritis Res , p. 356-360.

208. *Characterization of synovial mast cells in knee osteoarthritis: association with clinical parameters.* BJ, de Lange Brokaar, M, Kloppenburg e al., Andersen SN et. 2016, Osteoarthritis cartilage, p. 664-671.

209. *Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fcy receptor I and Fcy receptor II.* Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A et al. 65, 2013, Arthritis Rheum., p. 109-119.

210. Smith MD, Walker JG. *The synovium.* s.l. : Rheumatology Editors, 2011.

211. *The synovial membrane of joints and bursae.* JA, Key. 1932, Special Citology, Vol. 2, p. 1055-76.

212. *The structure and function of the synovial membrane.* DV., Davies. 1950, BMJ, p. 92-95.

213. *Microvascular distribution in normal human synovium.* Wilkinson LS, Edwards JCW. 167, 1989, J Anat, p. 129-136.

214. *Innervation of synovium.* PI., Mapp. 54, 1995, Ann Rheum Dis, p. 398-403.

215. *Distribution of lymphatic vessels in normal and arthritic human synovial tissues.* Xu H, Edwards J, Banerji S, Prevo R, Jackson DG, Athanasou NA. 62, 2003, Ann Rheum Dis , p. 1227-1229.

216. *The microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints.* Smith MD, Barg E, Weedon H, et al. 62, 2003, Ann Rheum Dis, p. 303-7.

217. *Immunohistochemistry of synovium.* Edwards JCW, Wilkinson LS. 1995, Mechanisms and models in rheumatoid arthritis., p. 133-150.

218. *Differential distribution of FcgRIIIa in normal human tissues and co-localization with DAF and fibrillin-1: implications for immunological microenvironments.* Bhatia A, Blades S, Cambridge G, Edwards JCW. 94, 1998, Immunology, p. 56-63.

219. *The involvement of dendritic cells in chronic inflammatory disease.* Poulter LW, Janossy G. 21, 1985, Scand J Immunol, p. 401-7.

220. *Immunohistochemical reassessment of accessory cell populations in normal and diseased human synovium.* Wilkinson LS, Worrall JG, Sinclair HS, Edwards JCW. 29, 1990, Br J Rheumatol, p. 259-63.

221. *A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes.* Stevens CR, Mapp PI, Revell PA. 10, 1990, Rheumatol Int, p. 103-6.

222. *Light microscopic characterisation of the fibroblastic synovial lining cell (synoviocyte).* Wilkinson LS, Pitsillides AA, Worrall JG, Edwards JCW. 35, 1992, Arthritis Rheum , p. 1179-84.

223. *Interactions among lymphocytes, monocytes and other synovial cells in the rheumatoid synovium.* Krane SM, Goldring SR, Dayer JM. 7, 1982, Lymphokines, p. 75-87.

224. *Synovial intimal fibroblasts. .* JCW, Edwards. 54, 1995, Ann Rheum Dis , p. 395-7.

225. *Expression of B cell survival cofactors on synovial fibroblasts.* Leigh RD, Cambridge G, Edwards JCW. 1996, Br J Rheumatol, p. 110.

226. *Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study.* Singh JA, Araysi T, Duray P, Schumacher HR. 63, 2004, Ann Rheum Dis, p. 785-90.

227. *Ultrastructure of the joint capsule in the rat: presence of two kinds of capillaries.* Suter ER, Majno G. 202, 1964, Nature , p. 920-1.

228. *Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervations in rheumatoid arthritis.* Pereira da silva JA, Carmo-Fonseca M. 17, 1990, J Rheumatol, p. 1592-9.

229. *Substance P-, calcitonin gene-generelated peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis.* Mapp PI, Kidd BL, Gibson SJ, et al. 37, 1990, Neuroscience , p. 143-153.

230. *Sympathetic innervations of normal and rheumatoid synovial tissue.* B., Widenfalk. 25, 1991, Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, p. 31-33.

231. JCW., Edwards. Functions of synovial lining. *The synovial lining in health and disease.* London : Chapman & Hall, 1987, p. 41-74.

232. *Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts.* Jay GD, Britt DE, Cha CJ. 27, 2000, J Rheumatol, p. 594-600.

233. *Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules. .* JR., Levick. 54, 1995, Ann Rheum Dis, p. 417- 423.

234. *Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets.* Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. 44, 2001, Arthritis Rheum, p. 1237-47.

235. *Enumeration and Localization of Mesenchymal Progenitor Cells and Macrophages in Synovium from Normal Individuals and Patients with Pre-Osteoarthritis or Clinically Diagnosed Osteoarthritis.* O'Brien K, Tailor P, Leonard C, et al. 18, 2017, International Journal of Molecular Sciences, p. 774.

236. *Pathophysiology of obesity on knee joint homeostasis: contributions of the infrapatellar fat pad.* Santangelo KS, Radakovich LB, Fouts J, Foster MT. 2016, Horm Mol Biol Clin Investig, p. 97-108.

237. *Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: focus on the role of fat mass and adipokines.* Lago F, Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. 63, 2011, Arthritis Care Res, p. 1083-90.

238. *Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production.* Presle N, Pottie P, Dumond H, Guillaume C, Lapicque F, Pallu S, Mainard D, Netter P, Terlain B. 14, 2006, Osteoarthritis Cartilage, p. 690–5.

239. *Aloe, L. 109, 2001, Arch. Physiol. Biochem, p. 354–356.*

240. Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in osteoarthritis pain. Pecchi E, Priam S, Gosset M, Pigenet A, Sudre L, Laiguillon MC, BerenbaumF,Houard X. 16, 2014 , Arthritis Res Ther.

241. Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. Sawada J, Itakura A, Tanaka A, Furusaka T, Matsuda H. 95, 2000, Blood, p. 2052-8.

242. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. Lewin, G.R., Ritter, A.M., Mendell, L.M.,. 13, 1993, J. Neurosci., p. 2136–2148;.

243. Expression of NGF, Trka and p75 in human cartilage. Gigante A, Bevilacqua C, Pagnotta A, Manzotti S, Toesca A, Greco F. 47, 2003, Eur J Histochem, p. 339-44.

244. Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, et al. 2009, Arthritis Research & Therapy.

245. Effect of nerve growth factor on cultured human chondrocytes. Gigante A, Senesi L, Manzotti S, Palmieri A, Skrami E, Sollazzo V. 4, 2016, J Biol Regul Homeost Agents., p. 1-6.

246. Human tryptase cleaves pro-nerve growth factor (pro-NGF): hints of local, mast cell-dependent regulation of NGF/pro-NGF action. Spinnler K, Fröhlich T, Arnold GJ, Kunz L, Mayerhofer A. 286, 2011, J Biol Chem. , p. 31707-13.

247. Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1beta, TNF-alpha and TGF-beta. Xiang Y, Masuko-Hongo K, Sekine T, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Kato T:. 14, 2006, Osteoarthritis Cartilage, p. 1163-1173.

248. Up-regulation of protease-activated receptor-2 by bFGF in cultured human synovial fibroblasts. Abe K, Aslam A, Walls AF, Sato T, Inoue H:. 79, 2006, Life Sci, p. 898-904.

249. Activation of proteinase-activated receptor 2 in human osteoarthritic cartilage upregulates catabolic and proinflammatory pathways capable of inducing cartilage degradation: a basic science study. Boileau C, Amiable N, Martel-Pelletier J, Fahmi H, Duval N, Pelletier JP. 6, 2007, Arthritis Res Ther.

250. Peripheral PAR-2 triggers thermal hyperalgesia and nociceptive responses in rats. Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Tanaka A, Itoh H, Nishikawa H. 12, 2001, Neuroreport , p. 715-719.

251. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum AI, Andrade-Gordon P, et al. 7, 2001, Nat Med , p. :821-826.

252. Expression and proinflammatory role of proteinase-activated receptor 2 in rheumatoid synovium: ex vivo studies using a novel proteinase-activated receptor 2 antagonist. Kelso EB, Ferrell WR, Lockhart JC, Elias-Jones I, Hembrough T, Dunning L, Gracie JA, McInnes IB:. 56, 2007, Arthritis Rheum, p. 765-771.

253. Activation of protease-activated receptor-2 leads to inhibition of osteoclast differentiation. Smith R, Ransjo M, Tatarczuch L, Song SJ, Pagel C, Morrison JR, et al. 19, 2004, J Bone Miner Res, p. 507e16.

254. Neurotrophin-3 Induces BMP-2 and VEGF Activities and Promotes the Bony Repair of Injured Growth Plate Cartilage and Bone in Rats. Su YW, Chung R, Ruan CS, Chim SM, Kuek V, Dwivedi PP, Hassanshahi M, Chen KM, Xie Y, Chen L, Foster BK, Rosen V, Zhou XF, Xu J, Xian CJ. 31, 2016, J Bone Miner Res, p. 1258-1274.

255. Roles of Neurotrophins in Skeletal Tissue Formation and Healing. Su YW, Zhou XF, Foster BK, Grills BL, Xu J, Xian CJ. 2017, J Cell Physiol.

256. Anti-apoptotic action of nerve growth factor in mouse osteoblastic cell line. Mogi M, Kondo A, Kinpara K, Togari A. 2000, Life Sci, p. 1197-1206.

257. NGF stimulates differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Yada M, Yamaguchi K, Tsuji T. 1994, Biochem Biophys Res Commun, p. 1187-1193.

258. Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. Dean, G., Hoyland, J., Denton, J., Donn, R. and Freemont, A. 32, 1993, Br J Rheumatol, p. 671–675.

259. Epidemiologic, social and sanitary aspects of rheumatoid diseases. A, Ciocci. 30, 2002, Artrite e Reumatismi, p. 14-17.

260. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. 18, 2010, Osteoarthritis Cartilage,, p. 24-33.

261. DH., Neustadt. Osteoarthritis. Conn's Current Therapy. Philadelphia : Rakel RE, 2003, p. 1075-1079.