



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**IL TRATTAMENTO DELLE TENDINOPATIE
CRONICHE MEDIANTE MICRO-INNESTI
ADIPOSI: STUDIO IN VITRO E IN VIVO
SU MODELLO ANIMALE**

Relatore: Chiar.mo
Prof. Antonio Gigante

Tesi di Laurea di:
Arianna Severi

Correlatore: Chiar.mo
Prof. Michele Riccio

A.A. 2019-2020

INDICE

Introduzione.....	4
1 Anatomia e fisiologia del tendine.....	7
1.1 La struttura macroscopica.....	7
1.2 La guaina tendinea.....	8
1.3 Il paratenonio, l'epitenonio e l'endotenonio.....	8
1.4 L'orientamento delle fibre nei tendini umani	9
1.5 La struttura microscopica.....	10
1.5.1 Cellule tendinee.....	11
1.5.2 Matrice extracellulare.....	11
1.6 L'apporto sanguigno del tendine	13
1.7 L'innervazione e i meccanocettori tendinei.....	14
1.8 Il comportamento biomeccanico del tendine	15
2 Fisiopatologia delle lesioni tendinee.....	18
2.1 Tendinopatie	18
2.2 L'aspetto istopatologico del tendine affetto da tendinopatia.....	18
2.3 Lesioni tendinee acute e croniche	19
2.3.1 Lesioni tendinee acute.....	20
2.3.2 Lesioni tendinee croniche.....	21
2.4 La coesistenza di cambiamenti degenerativi e infiammatori nella tendinopatia cronica	23
2.5 L'effetto del processo di invecchiamento sul tendine	24
2.6 Tendinopatie specifiche: l'esempio della tendinopatia Achillea	26
3 Diagnosi e classificazione delle lesioni tendinee.....	28
3.1 Metodiche diagnostiche: l'ecografia.....	28
3.2 Metodiche diagnostiche: l'elastosonografia	30
3.3 Metodiche diagnostiche: la risonanza magnetica	31
3.4 Classificazione delle lesioni tendinee.....	32
4 Il trattamento delle tendinopatie: current concepts	36
4.1 Processi riparativi.....	36
4.2 Il ruolo dei fattori di crescita nella riparazione del tessuto tendineo	39

4.3 Terapie attuali	40
4.3.1 Trattamenti conservativi	41
4.3.2 Trattamenti chirurgici	43
4.3.3 Infiltrazioni di corticosteroidi e PRP	44
4.3.4 Terapia genica.....	45
5 Il ruolo della medicina rigenerativa nelle patologie muscoloscheletriche..	47
5.1 Cellule staminali mesenchimali.....	47
5.2 Cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo (ASCs).....	49
5.3 Applicazione delle ASCs nella rigenerazione muscoloscheletrica	50
5.3.1 Rigenerazione del tessuto cartilagineo	50
5.3.2 Ricostruzione del tessuto osseo	50
5.3.3 Osteoartrosi e artriti	51
5.3.4 Malattie muscolari	52
5.3.5 Tendinopatie	53
5.4 Tecniche di processazione dell'ipoaspirato e tecniche di isolamento delle ASCs	54
5.5 ASCs: Differenze tra VAT e SAT	57
5.6 Capacità differenziativa delle ASCs.....	58
6 Introduzione e scopo dello studio	60
7 Materiali e metodi	62
7.1 Criteri di inclusione dello studio	62
7.2 Sistema Rigenera®	62
7.3 Progettazione dello studio	64
7.3.1 T ₀ - Induzione enzimatica della lesione	64
7.3.2 T ₁ - Prelievo di grasso, processazione e somministrazione di SVF	66
7.3.3 T ₂ - Controlli di cut off a un mese	68
7.3.4 T ₃ - Controlli prima e dopo sacrificio degli animali	69
7.4 Analisi statistica	71
7.4.1 Statistica parte ecografica	71
7.4.2 Statistica parte istologica	71
8 Risultati	72
8.1 Valutazione clinica	72

8.2 Valutazione ecografica	73
8.2.1 Ecografia B-mode	73
8.2.2 Elastosonografia	75
8.3 Valutazione istologica	79
9 Discussione dei risultati e conclusioni	83
Ringraziamenti	89
Bibliografia	90

Introduzione

Il termine tendinopatia indica genericamente qualsiasi tipo di lesione a carico della struttura tendinea.

Storicamente il primo termine utilizzato per descrivere il dolore tendineo cronico fu “tendinite”, ma quest’ultimo poneva l’accento sull’aspetto infiammatorio della lesione tendinea che inizialmente sembrava avere un ruolo centrale nella patogenesi della stessa. Tuttavia, le tradizionali modalità di trattamento volte a modulare l’infiammazione hanno avuto scarso successo (1) e gli studi istologici su campioni chirurgici mostrano costantemente la presenza di lesioni degenerative, con un’infiammazione assente o minima (2,3). Ad oggi, quindi, anche se i meccanismi patogenetici intrinseci delle tendinopatie sono ancora largamente sconosciuti, viene per lo più favorita l’ipotesi che l’infiammazione e i cambiamenti degenerativi coesistano spesso nel corso dei disturbi del tendine e che i loro contributi relativi siano difficili da analizzare (4). Per queste motivazioni, il termine “tendinite” è stato progressivamente abbandonato e sostituito con quello più generico di tendinopatia.

Dal punto di vista epidemiologico, le tendinopatie rappresentano sicuramente un problema sempre più rilevante nel mondo dello sport. Infatti, fino al recente passato, le attività sportive e fisiche riguardavano principalmente i giovani e le persone di mezza età; mentre oggi, con un aumento del tempo libero, un numero sempre maggiore di persone trascorre il tempo praticando sport a scopo ricreativo o competitivo (5).

Inoltre, nel corso degli ultimi due decenni, gli atleti hanno ricevuto richieste sempre maggiori riguardo le loro prestazioni. Ciò ha determinato un aumento del rischio di infortuni sportivi acuti e da overuse, poiché essi sono tenuti ad allenarsi più spesso, più intensamente e più a lungo.

Durante l’esercizio fisico, vengono esercitati uno stress e una forza elevati sul tendine, aumentandone il rischio di lesioni. Nel salto ripetuto sul posto, per esempio, è stata misurata una forza di circa 4000 N nel tendine di Achille, che corrisponde a circa il doppio della forza di reazione al suolo. Inoltre, sempre nel salto, il contributo dell’energia elastica è di circa il 40% del lavoro meccanico totale, e la maggior parte di questa energia viene immagazzinata nel tendine stesso. Ciò implica che il tendine svolge un ruolo importante come elemento attivo dell’unità muscolo-tendine durante lo sport (6).

Oltre agli sportivi, dato che l’età media della popolazione è in continuo aumento grazie al

Il termine tendinopatia indica genericamente qualsiasi tipo di lesione a carico della struttura tendinea.

Storicamente il primo termine utilizzato per descrivere il dolore tendineo cronico fu “tendinite”, ma quest’ultimo poneva l’accento sull’aspetto infiammatorio della lesione tendinea che inizialmente sembrava avere un ruolo centrale nella patogenesi della stessa. Tuttavia, le tradizionali modalità di trattamento volte a modulare l’infiammazione hanno avuto scarso successo (1) e gli studi istologici su campioni chirurgici mostrano costantemente la presenza di lesioni degenerative, con un’infiammazione assente o minima (2,3). Ad oggi, quindi, anche se i meccanismi patogenetici intrinseci delle tendinopatie sono ancora largamente sconosciuti, viene per lo più favorita l’ipotesi che l’infiammazione e i cambiamenti degenerativi coesistano spesso nel corso dei disturbi del tendine e che i loro contributi relativi siano difficili da analizzare (4). Per queste motivazioni, il termine “tendinite” è stato progressivamente abbandonato e sostituito con quello più generico di tendinopatia.

Dal punto di vista epidemiologico, le tendinopatie rappresentano sicuramente un problema sempre più rilevante nel mondo dello sport. Infatti, fino al recente passato, le attività sportive e fisiche riguardavano principalmente i giovani e le persone di mezza età; mentre oggi, con un aumento del tempo libero, un numero sempre maggiore di persone trascorre il tempo praticando sport a scopo ricreativo o competitivo (5).

Inoltre, nel corso degli ultimi due decenni, gli atleti hanno ricevuto richieste sempre maggiori riguardo le loro prestazioni. Ciò ha determinato un aumento del rischio di infortuni sportivi acuti e da overuse, poiché essi sono tenuti ad allenarsi più spesso, più intensamente e più a lungo.

Durante l’esercizio fisico, vengono esercitati uno stress e una forza elevati sul tendine, aumentandone il rischio di lesioni. Nel salto ripetuto sul posto, per esempio, è stata misurata una forza di circa 4000 N nel tendine di Achille, che corrisponde a circa il doppio della forza di reazione al suolo. Inoltre, sempre nel salto, il contributo dell’energia elastica è di circa il 40% del lavoro meccanico totale, e la maggior parte di questa energia viene immagazzinata nel tendine stesso. Ciò implica che il tendine svolge un ruolo importante come elemento attivo dell’unità muscolo-tendine durante lo sport (6).

Oltre agli sportivi, dato che l’età media della popolazione è in continuo aumento grazie al miglioramento della qualità della vita degli ultimi decenni, lo sviluppo di tendinopatie è un problema che in generale affligge un numero sempre maggiore di individui poiché uno dei

principali fattori di rischio intrinseci è l'età. Infatti, se da una parte la guarigione incompleta e le caratteristiche tendinopatiche sono state associate al sovraccarico cronico (come ad esempio appunto negli sportivi), dall'altra le stesse caratteristiche istopatologiche sono state descritte anche quando un tendine è privo di carico (situazione frequente nei soggetti più anziani): la protezione dallo stress sembra esercitare quindi un effetto deleterio. In particolare, lo scarico di un tendine induce cambiamenti delle cellule e della matrice simili a quelli osservati in uno stato di sovraccarico e diminuisce l'integrità meccanica del tendine stesso (7).

Tuttavia, anche se il problema delle tendinopatie coinvolge un numero sempre maggiore di persone, non esiste ancora un trattamento che porti definitivamente e in tutti i casi alla guarigione della patologia. Nonostante l'abbondanza di opzioni terapeutiche, infatti, sono stati condotti pochissimi studi prospettici randomizzati, controllati con placebo, per assistere i medici nella scelta della migliore gestione dei pazienti secondo l'evidence-based medicine: i trattamenti che sono stati studiati includono, tra gli altri, farmaci antinfiammatori non steroidei, esercizio eccentrico, iniezioni sclerosanti, ultrasuoni e trattamento con le onde d'urto, come si discuterà più avanti.

Comunque, quella che può apparire clinicamente come una tendinopatia acuta potrebbe essere in realtà un fallimento ben avanzato di una risposta di guarigione cronica in cui non vi sono prove istologiche né biochimiche di infiammazione. La letteratura disponibile a questo proposito suggerisce che, in assenza di un evidente processo infiammatorio, non esiste una base razionale per l'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei nella tendinopatia cronica (8).

Un altro concetto da sottolineare è che le terapie nominate in precedenza per la maggior parte non sono dei trattamenti rigenerativi, ma solo sintomatici e cosa più importante non si riscontra un risultato omogeneo nei pazienti trattati. L'ideale sarebbe mettere a punto una terapia che sia rigenerativa, efficace su un numero elevato di pazienti e possibilmente dai costi non troppo elevati.

Nel corso di questo elaborato verrà analizzata la struttura tendinea dal punto di vista anatomico-fisiologico, verranno indagate le principali tendinopatie dal punto di vista patogenetico e le soluzioni terapeutiche attualmente disponibili mettendone in evidenza i pro e i contro. Infine, si entrerà nel vivo dello studio prospettico il cui scopo è quello di valutare l'effetto rigenerativo di micro-innesti adiposi (SVF) ottenuti mediante disaggregazione meccanica su lesioni tendinee indotte sperimentalmente in un modello animale, rispetto al gruppo di controllo.

CAPITOLO 1

Anatomia e fisiologia del tendine

1.1 La struttura macroscopica

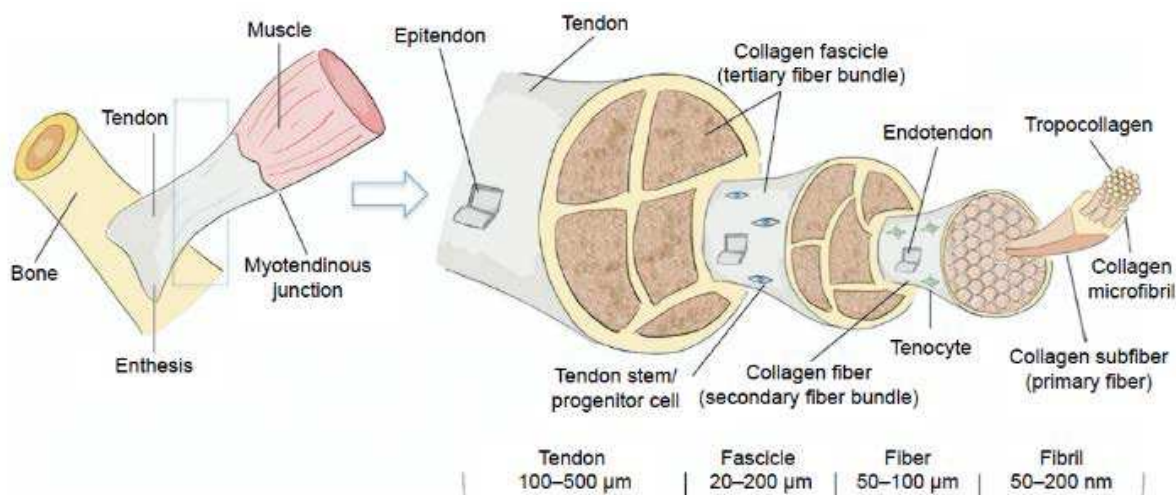


Figura 1 La struttura macroscopica del tendine

Il tendine rappresenta la struttura anatomica interposta tra muscolo ed osso deputata a trasmettere la forza generata dal ventre muscolare alla struttura ossea stessa, rendendo in tal modo possibile il movimento articolare. Ogni ventre muscolare è basicamente dotato di due tendini, uno prossimale e uno distale. Il punto anatomico di unione con il ventre muscolare viene chiamato giunzione muscolotendinea (MTJ), mentre il sito di unione con la struttura ossea prende il nome di entesi o giunzione osteotendinea (OTJ). Una struttura tendinea integra si presenta come una tessitura fibroelastica di colore bianco brillante e, da un punto di vista biomeccanico, presenta una forte resistenza nei confronti dei carichi di natura tensiva. La struttura dei vari tipi di tendini umani può variare considerevolmente sia dal punto di vista della sua forma, sia per ciò che concerne la fattura attraverso la quale si connette alla struttura ossea. Ad esempio, i tendini dei muscoli flessori o estensori del polso e delle dita sono tipicamente lunghi e sottili, per consentire una fine e precisa modulazione del movimento; mentre i tendini e dei muscoli flessori o estensori della gamba sono corti e robusti per permettere la trasmissione di potenza e forza (9).

1.2 La guaina tendinea

La guaina tendinea è costituita da due strati: il primo, denominato guaina fibrosa, rappresenta lo strato esterno e costituisce il canale di scorrimento tendineo. Il secondo strato, detto guaina sinoviale, costituisce lo strato interno ed è formata da due foglietti sierosi (parietale e viscerale), i quali delimitano uno spazio che contiene un liquido molto simile a quello sinoviale. La guaina sinoviale assolve il compito di agevolare lo scivolamento del tendine all'interno della guaina fibrosa (9).

La guaina fibrosa è formata da una rete di cellule simil-spugnose, con fibre e fibrille orientate longitudinalmente, obliquamente o circolarmente in rapporto all'asse lungo del tendine. La sua parete interna è ricoperta dalle cellule di rivestimento della guaina sinoviale (foglietto parietale), mentre la superficie tendinea è a contatto con le cellule di rivestimento del foglietto viscerale. È possibile distinguere due tipi principali di cellule sinoviali di rivestimento: cellule di tipo A e di tipo B. Quelle di tipo A sono "macrophage-like cells" (cellule di origine neuroectodermica che presentano molte proprietà caratteristiche dei macrofagi), che rappresentano circa il 20-30% del totale. Queste cellule secernono acido ialuronico che svolge un importante ruolo come sostanza lubrificante durante il meccanismo di scorrimento del tendine. Le cellule di tipo B invece presentano caratteristiche simili a quelle dei fibroblasti e rappresentano il restante 70-80% del totale. Anche esse producono liquido sinoviale ricco di acido ialuronico. Oltre alle cellule di tipo A e B esiste un terzo tipo di cellule sinoviali denominate tipo C, che presentano caratteristiche intermedie tra quelle di tipo A e quelle di tipo B; si ritiene che le cellule di tipo C partecipino attivamente ai processi di reazione autoimmune ed all'attivazione delle cellule di tipo T.

Le guaine tendinee circondano tipicamente i tendini delle mani e dei piedi e soprattutto sono presenti in zone anatomiche caratterizzate da percorsi tendinei curvi e/o particolarmente lunghi, come ad esempio il tunnel carpale e quello tarsale. Il loro compito è quello di minimizzare l'attrito che si verifica tra il tendine e le strutture anatomiche circostanti migliorandone, in tal modo, lo scorrimento.

1.3 Il paratenonio, l'epitenonio e l'endotenonio

Il paratenonio è costituito da un tessuto connettivo lasso e circonda i tendini sprovvisti di guaina. Il tessuto connettivo che forma il paratenonio è costituito principalmente da collagene di tipo I e III; sono inoltre presenti fibrille elastiche e cellule sinoviali che rivestono la

superficie interna del paratenonio stesso. Il paratenonio circonda tutti i tendini sprovvisti di guaina sinoviale, ovvero la maggior parte e, pur non avendo la stessa efficienza anatomica di quest'ultima, garantisce comunque una facilitazione nello scorrimento tendineo riducendo l'attrito.

Al di sotto del paratenonio, l'intero corpo tendineo è ulteriormente circondato da una sottile guaina di tessuto connettivale denominato epitenonio, che vede la sua struttura esterna ed interna rispettivamente in contiguità con il paratenonio e l'endotenonio. L'epitenonio appare organizzato come una rete fibrillare piuttosto densa formata da fibre collagene disposte in modo longitudinale, obliquo e trasversale.

In condizioni di mancanza di tensione, la maggior parte delle fibre di collagene dell'epitenonio presenta nei confronti delle fibre del tendine un'angolazione di 60° che, in condizioni di tensione tendinea (ovvero quando il tendine viene allungato), decresce fino a circa 30° ; a questo proposito, si è avanzata l'ipotesi che tale sistema fibrillare rappresenti uno strumento di difesa meccanica nei confronti di possibili sovratensionamenti del tendine.

L'endotenonio riveste singolarmente ogni fibra tendinea e lega tra loro le fibre sino a formare unità di maggiori dimensioni denominate fasci. Tale strutturazione anatomica prevede che un certo numero di fibre formi un fascio cosiddetto primario che, unendosi ad altri fasci primari, dia origine a fasci secondari, i quali, unendosi a loro volta, vadano a costituire dei fasci terziari che vanno infine a formare la struttura tendinea finale. L'endotenonio circonda tutti e tre i tipi di fasci.

Allo scopo di ottimizzare l'effetto del legame sia tra le fibre di collagene che tra i fasci, si può osservare un alto grado di idratazione dei proteoglicani che si trovano tra l'endotenonio e la superficie delle fibre collagene che formano i fasci. Nonostante questa funzione di legame, l'endotenonio permette comunque il meccanismo di scorrimento tra fibre e fascicoli, veicolando inoltre sia i vasi sanguigni che linfatici ed i nervi sin nello strato profondo del tendine.

1.4 L'orientamento delle fibre nei tendini umani

Grazie all'uso del microscopio elettronico si osserva come le fibrille tendinee siano orientate sia in senso longitudinale che trasversale ed orizzontale, e come le fibre longitudinali si incrocino vicendevolmente formando una sorta di treccia spiralizzata. Questa complessa struttura anatomica fa capire in termini biomeccanici come l'organizzazione tendinea

possa, grazie alla sua tridimensionalità strutturale, mostrare delle così elevate capacità di assorbimento nei confronti degli stress longitudinali, orizzontali, trasversali e rotazionali.



Figura 2 Disposizione allineata delle fibrille tendinee al microscopio elettronico

Un ottimo esempio di questa struttura tridimensionale ci è fornita dal tendine di Achille. Esso origina come continuazione anatomica del muscolo gastrocnemio, vicino alla sua origine il tendine achilleo presenta una struttura ampia e piatta, diviene poi maggiormente stretto e rotondeggiante distalmente, infine si espande di nuovo a circa 4 cm dalla sua inserzione calcaneare. Le fibre tendinee, nel loro decorso verso il basso, si possono spiralizzare lateralmente sino a 90°: in tal modo le fibre che prossimalmente erano sulla superficie anteriore si ritrovano, a livello distale, lateralmente, e sempre distalmente le fibre laterali divengono anteriori, quelle anteriori diventano mediali e quelle mediali posteriori.

1.5 La struttura microscopica

Il tendine rientra nella categoria dei tessuti connettivi, ossia dei tessuti caratterizzati dalla presenza di cellule nel contesto di una matrice extracellulare (ECM). In particolare, rientra nella classe dei tessuti connettivi propriamente detti, e ancora più nello specifico è un tessuto connettivo denso regolare. Il tendine è composto preminentemente da fibre collagene disposte in file parallele e strettamente adese per offrire la massima forza. Anche le cellule, in questo caso denominate tenociti, che producono e mantengono le fibre, sono addensate e allineate lungo i fasci di fibre. I tenociti sono circondati da matrice cellulare specializzata che li separa dalle fibrille di collagene portanti. Nelle sezioni parallele all'asse principale dei tendini osservate al microscopio elettronico, sono visibili proiezioni citoplasmatiche cellulari a partenza dai tenociti che giacciono tra le fibre e hanno l'aspetto di sottili guaine. Nella maggior parte delle sezioni longitudinali in ematossilina eosina, tuttavia, i tenociti

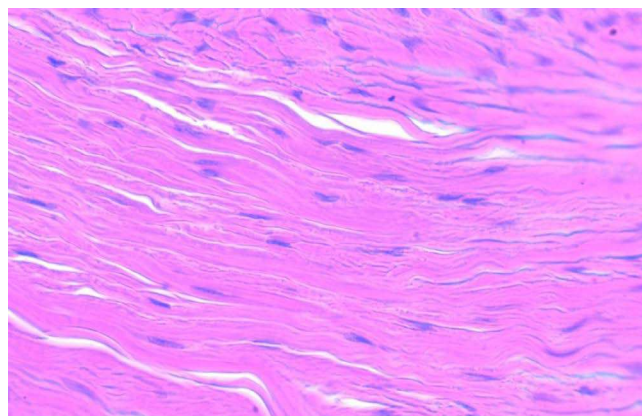


Figura 3 Struttura microscopica del tendine al microscopio ottico

appaiono solo sotto forma di file di nuclei tipicamente appiattiti e basofili, poiché le espansioni citoplasmatiche non risultano generalmente evidenti in quanto si confondono con le fibre collagene.

1.5.1 Cellule tendinee

Il tenocita è la cellula più abbondante del tendine e ha aspetto fusiforme e allungato raggiungendo anche i 300 micrometri di lunghezza, con orientamento lungo la direzione delle fibrille collagene. La forma immatura del tenocita è denominata tenoblasto, quest'ultimo è metabolicamente più attivo rispetto al primo, ma comunque entrambi sono implicati nella sintesi di tutti i componenti della ECM. In particolare, oltre a produrre il Tendon Sinovial Fluid (TSF, il liquido sinoviale tendineo che svolge un importante ruolo nei processi di nutrizione del tendine stesso), essi sono coinvolti nei processi di riparazione, nella sintesi e nel turnover del collagene e svolgono un ruolo di controllo a livello sia strutturale, che funzionale delle guaine e dei singoli fasci. Gli elementi prodotti dai tenoblasti e dai tenociti sono organizzati in un complesso schema organico nell'ambito della composizione tendinea vera e propria.

1.5.2 Matrice extracellulare

La matrice extracellulare del tendine è costituita da acqua, proteoglicani, glicosamminoglicani, collagene ed elastina.

Collagene: le fibre collagene rappresentano la componente strutturale più abbondante del tessuto connettivo (principalmente collagene di tipo I, e circa il 5% di collagene di tipo III e II, quest'ultimo presente solamente a livello delle entesi). La molecola del collagene misura circa 300 nm in lunghezza e 1,5 nm in spessore e presenta una testa e una coda. All'interno di una fibrilla, le molecole di collagene si dispongono testa-coda lasciando uno spazio tra loro, in file parallele, sfalsate di un quarto della loro lunghezza.

La forza delle fibrille risiede nei legami covalenti che si stabiliscono tra le molecole delle file adiacenti, non nella disposizione testa-coda delle molecole delle singole file.

La singola molecola di collagene è composta da tre catene polipeptidiche denominate

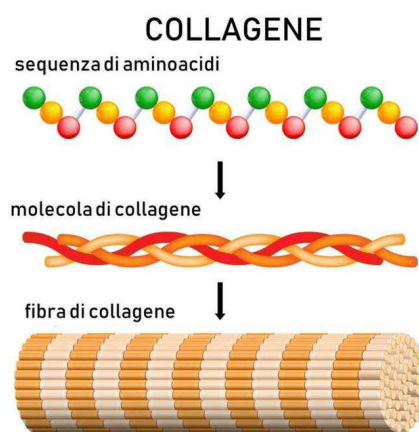


Figura 4 Composizione di una fibra di collagene

catene α , che si attorcigliano costituendo una tripla elica ad andamento destrorso. Ogni tre aminoacidi nella catena si trova una molecola di glicina, fatta eccezione per le estremità delle catene α . Ogni molecola di glicina è frequentemente preceduta da idrossiprolina e idrossilisina e seguita da prolina. Questi aminoacidi sono essenziali per la conformazione della tripla elica. Le catene α che formano la tripla elica non sono tutte uguali, ma presentano una composizione con un numero variabile di aminoacidi da 600 a 3000. Sulla base delle varie combinazioni delle catene α sono stati individuati più di venti tipi di collagene diversi, classificati utilizzando i numeri romani in ordine di scoperta.

La specifica molecola di collagene si definisce omotrimerico (se costituita da tre catene uguali) o eterotrimerico (se formata da due o tre catene α geneticamente distinte). Per esempio, il collagene di tipo I, principale componente dei tendini, è un eterotrimerico: due catene α , identificate come α_1 sono identiche, mentre la restante catena, identificata come α_2 , è differente.

La maggior parte delle molecole di collagene polimerizza in aggregati sopramolecolari come fibrille o reti e si divide in alcuni sottogruppi sulla base delle similarità strutturali o della sequenza aminoacidica:

- I collageni fibrillari includono le molecole di collagene di tipo I, II, III, V e XI. Questi tipi sono caratterizzati dalla ripetizione ininterrotta della sequenza glicina-prolina-idrossiprolina e si aggregano a formare fibrille.
- I collageni associati a fibrille con tripla elica interrotta presentano nella loro tripla elica delle interruzioni che danno flessibilità alla molecola. Sono collocati sulla superficie di differenti fibrille e rappresentati dai tipi IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX e XXI.
- I collageni che formano una rete esagonale sono rappresentati dai tipi VIII e X.
- I collageni transmembrana sono i tipi XIII, XVII, XXIII e XXV.
- Le multiplexine (collageni con triple eliche multiple e interruzioni) comprendono il collagene di tipo XV e quello di tipo XVIII, che risiedono in parti differenti della membrana basale.
- I collageni che formano la membrana basale includono il tipo IV, che è responsabile della superstruttura del collagene nella membrana basale delle cellule epiteliali e il collagene di tipo VII, che costituisce le fibrille ancoranti deputate all'attacco della membrana basale alla matrice extracellulare.

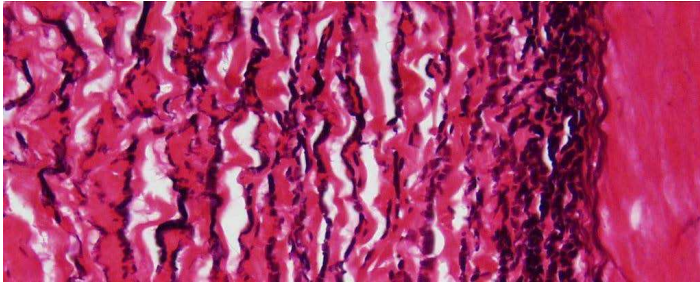


Figura 5 Immagine al microscopio ottico delle fibre elastiche, colorate in nero

Elastina: è un costituente strutturale fondamentale dei tendini e dei legamenti, il suo ruolo è quello di permettere ai tessuti tendinei e legamentosi di tornare alla forma originale una volta che sono stati sottoposti a forze di trazione.

L'elastina è composta dagli aminoacidi glicina, valina, alanina e prolina che formano le unità di base di tropoelastina, le quali si uniscono tra loro con legami di tipo covalente dando origine ad una struttura elastica e, allo stesso tempo, resistente.

Proteoglicani: sono delle macromolecole dal core proteico più o meno complesso sul quale si ramificano, attraverso legami covalenti, lunghe catene di polisaccaridi o glicosamminoglicani (GAG). Questi ultimi sono formati dall'aggregazione di migliaia di unità disaccaridiche di residui di acido ialuronico e N-acetilglucosammina. I proteoglicani di grandi dimensioni, come l'aggrecano, sono localizzati soprattutto nelle aree soggette a forze di attrito e compressione e sono responsabili del comportamento viscoelastico del tendine. Essi agiscono infatti da lubrificanti, facilitando lo scivolamento delle fibrille collagene e occupano lo spazio tra queste, prevenendone il collasso. I proteoglicani con peso molecolare minore, invece, come la decorina e il biglicano, modulano l'organizzazione tridimensionale e la disposizione delle fibrille collagene.

1.6 L'apporto sanguigno del tendine

L'apporto sanguigno a livello tendineo avviene principalmente grazie ai vasi che circondano la struttura tendinea stessa. A livello della giunzione miotendinea i vasi sanguigni provenienti dal perimisio muscolare penetrano all'interno dei fascicoli tendinei, mentre altri vasi di calibro minore penetrano nel tendine attraverso il peritenonio, ramificandosi in seguito abbondantemente lungo il decorso dell'asse tendineo principale. Ove sia presente una guaina sinoviale, la rete sanguigna penetra nel tendine attraverso il mesotenonio. La giunzione osteo tendinea non rappresenta invece un sito di particolare interesse anatomico per ciò che riguarda l'entrata dei vasi sanguigni.

Il foglio parietale della guaina sinoviale riceve la maggior parte dei vasi dai tessuti circostanti, anche se una parte di vasi, facente sempre capo alla guaina, prende origine dalle branche

provenienti dal mesotenonio, a livello del quale i vasi sono organizzativamente strutturati in archi. La parte superficiale del tendine riceve i vasi sanguigni dal mesotenonio; questi stessi vasi, passando in parte attraverso l'epitenonio ed estendendosi lungo i setti dell'endotenonio, vanno a formare un sistema di connessioni tra la rete sanguigna peri e intra-tendinea.

Nei tendini che non posseggono una vera e propria guaina sinoviale assume particolare importanza la rete vascolare appartenente al paratenonio. Le arterie del paratenonio, pur presentando un'ampia variabilità tra tendine e tendine ed anche tra diverse porzioni dello stesso tendine, sono in genere di piccolo/medio calibro ed ognuna di esse è accoppiata ad una o due vene. Le arterie del paratenonio penetrano trasversalmente od obliquamente l'epitenonio in direzione dei setti dell'endotenonio per formare la rete vascolare intratendinea.

La vascolarizzazione del tendine appare più sviluppata nel tendine giovane, che mostra infatti una ricca rete vascolare rispetto al tendine anziano, il quale nel corso degli anni tende progressivamente ad impoverirsi dal punto di vista della vascolarizzazione. Nel tendine maturo quindi, ed ancor più in quello anziano, l'apporto nutritivo dipenderebbe maggiormente dalla diffusione del liquido sinoviale che non dalla perfusione vascolare.

Il flusso sanguigno aumenta poi da tre a sette volte nel corso d'esercizio, questi dati fanno chiaramente capire come durante l'attività fisica il tendine non soffra di ridotto apporto di ossigeno e di come conseguentemente non possa sviluppare aree ischemiche.

1.7 L'innervazione e i meccanocettori tendinei

L'innervazione tendinea, di tipo sensitivo, deriva dai muscoli e dai tessuti cutanei e peritendinei adiacenti e consiste in un plesso longitudinale composto da varie terminazioni situate principalmente nelle vicinanze della giunzione miotendinea.

In base alle loro differenze di tipo anatomico e funzionale le terminazioni nervose a livello dei tendini, dei legamenti e della capsula articolare possono essere suddivise in quattro categorie:

- Le terminazioni nervose di tipo I o corpuscoli di Ruffini (CR);
- Le terminazioni nervose di tipo II o corpuscoli di Pacini (CP);
- Le terminazioni nervose di tipo III o organi tendinei del golgi (OTG);
- Le terminazioni nervose libere (TNL).

Sia i CR che i CP che gli OTG sono meccanocettori che svolgono il ruolo di trasduttori convertendo gli stimoli di tipo pressorio o tensivo in segnali nervosi afferenti, e assumendo in tal modo un importante ruolo nell'ambito del movimento corporeo. A livello del tendine

essi si ritrovano sia sulla superficie che in profondità.

1.8 Il comportamento biomeccanico del tendine

Il tendine è un tessuto connettivo denso, la cui funzione principale è quella di connettere il muscolo all'osso e di trasmettere a esso le forze generate dall'apparato contrattile, consentendo il movimento dei segmenti scheletrici. I tendini sono dotati di notevole resistenza, sono flessibili e possiedono un certo grado di estensibilità: infatti da un lato si possono flettere nettamente a livello di alcune articolazioni e dall'altro sono in grado di assorbire gli stress meccanici e, conseguentemente, possono limitare il potenziale danno muscolare (9).

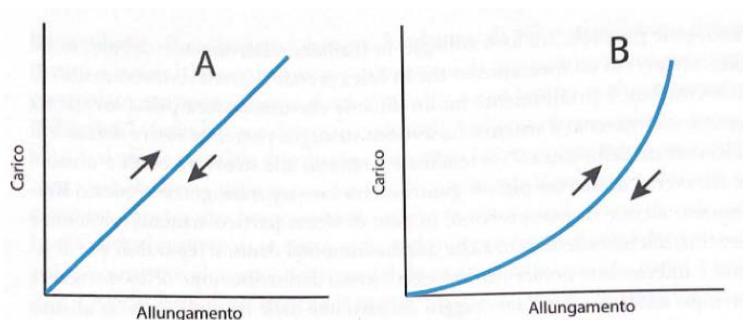


Figura 6 Nel riquadro A è rappresentato sotto forma grafica un comportamento completamente elastico e reversibile, altrimenti definibile come “Hookiano”. In questo caso, l’allungamento che il materiale subisce, dipende linearmente dall’intensità della forza che viene applicata. Nel riquadro B invece è rappresentata la classica curva a J, tipica del comportamento completamente elastico dei tessuti animali. In questo secondo caso, maggiore è il carico applicato, minori risultano l’allungamento o la compressione subiti dal materiale stesso. (9)

I tendini sono da considerarsi i principali interpreti del fenomeno elastico. Il collagene infatti, che è il principale costituente dei tendini, mostra un comportamento molto simile a quello di una corda, ossia la sua elica si contrae su se stessa riducendosi leggermente di diametro ed il suo comportamento elastico è rappresentabile graficamente con una curva a

forma di J. Questo fatto dimostra che la maggior parte dei tessuti biologici non hanno un comportamento così detto “Hookiano” (la legge di Hooke sostiene che l’allungamento che il materiale subisce dipende linearmente dall’intensità della forza applicata; sotto forma grafica è rappresentato come una retta): in altre parole, una curva carico-allungamento a forma di J evidenzia come la deformazione sotto carico dei tessuti di origine animale, pur essendo del tutto elastica e reversibile, non sia comunque perfettamente lineare [FIG 6]. Su questi tessuti infatti, una leggera trazione provoca inizialmente un apprezzabile allungamento, ma ad un ulteriore aumento della tensione l’incremento dell’allungamento stesso sarà molto minore. Occorre poi sottolineare che la tipica curva carico-allungamento del tendine si presenta particolarmente ripida nella parte iniziale e che il suo allungamento massimale è comunque piuttosto basso rispetto alla media degli altri materiali biologici. La sua capacità

di immagazzinare energia elastica, al contrario, è elevatissima rispetto a quasi tutti i materiali biologici tradizionali.

Oltre alla spiccata capacità di accumulare energia elastica, il tendine mostra anche eccezionali doti di robustezza strutturale grazie all'utilizzo di tre strategie (9). La prima strategia di conservazione strutturale adottata è quella che si può definire di “coesione strutturale debole programmata”, il tendine è infatti costituito da fasci di fibre collagene paralleli, tra loro collegati in maniera relativamente debole: in tale modo, attraverso un meccanismo che in fisica prende il nome di meccanismo di Cook-Gordon, è praticamente molto difficile che una fessura possa propagarsi attraverso il sistema. La seconda strategia potrebbe essere definita di “suddivisione dello sforzo”: il tendine è connesso alla struttura ossea e muscolare attraverso numerose piccole giunzioni tra loro separate per cui alcune di esse possono, in caso di sforzi particolarmente violenti e repentini, cedere senza che questo comporti danni irreparabili per il sistema. L'ultima strategia potrebbe essere definita come “avvertimento di cedimento strutturale”, ossia la forte sensazione di dolore che si prova nel caso di un allungamento eccessivo della struttura tendinea, una strategia conservativa semplice ma estremamente efficace.

La relazione intercorrente tra lo sforzo a cui viene sottoposto il tendine e la tensione generata è rappresentata attraverso la curva di stress-strain [FIG 7]. In condizioni di riposo, si osserva che le fibre collagene e le fibrille tendinee mostrano una configurazione spaziale di tipo ondulato (crimping, osservabile nella toe region ossia nella prima parte della stress-strain curve). Tale configurazione ondulata scompare nel momento in cui il tessuto tendineo venga sollecitato sino a circa il 2% delle sue capacità tensive; il tendine ritorna comunque

alla sua primitiva configurazione ondulata non appena cessino le forze di deformazione (tale comportamento è osservabile nella parte iniziale della linear region cioè nella seconda parte della stress-strain curve). Il comportamento assunto nella prima parte della linear region è definibile pertanto come elastico. Se il tendine viene invece sollecitato oltre il suo “strain

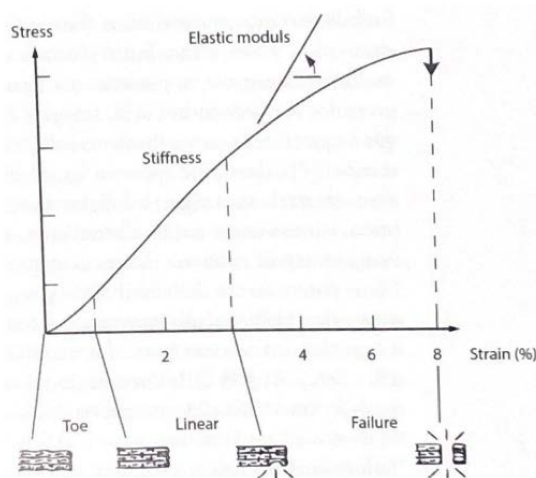


Figura 7 Una stress-strain curve (ossia una curva che mette in relazione lo sforzo e la tensione) relativa ad un tendine. La stress-strain curve ha un andamento molto simile alla curva forza-elongazione ed entrambe rappresentano dei validi strumenti per lo studio delle proprietà meccaniche dei tessuti biologici. (9)

limit", ossia la regione compresa tra il 2 e il 5% delle sue capacità tensive, si possono osservare dei micro-cedimenti strutturali che possono, in parte, spiegare la diminuzione di forza osservabile in questa parte della curva. Tuttavia, se la sollecitazione non eccede il 4%, il tendine appare in grado di riacquistare, al cessare della sollecitazione stessa, la sua originale lunghezza. A questo proposito è interessante notare che nel momento in cui un tendine viene testato nella sua integrità anatomica, la linear region si estende fino a valori compresi tra il 20 e il 50%; questo comportamento è molto probabilmente da addebitarsi alla particolare struttura tridimensionale che il tendine mostra quando testato nella sua integrità strutturale. Al di là della linear region il tendine va incontro a cedimento strutturale in modo difficilmente prevedibile, fino a giungere a rottura completa nel momento in cui lo strain raggiunge il failure-load. Al momento del cedimento strutturale totale, le fibre si retraggono fino ai due rispettivi monconi.

Osservando la stress-strain curve si evince che la tensione intratendinea è in continuo aumento sino all'inizio della fase di allungamento e subisce un decremento nel momento in cui inizia lo "slittamento" interfibrillare, che poi porterà al cedimento strutturale. Tuttavia, anche in questa fase di relativo decremento di tensione, le fibre tendinee continuano ad allungarsi. Sempre dall'attenta osservazione della curva, si nota anche come il tendine mostri un comportamento perfettamente elastico sino ad un valore di tensione pari circa al 4%, oltre il quale inizia il range di viscosità.

CAPITOLO 2

Fisiopatologia delle lesioni tendinee

2.1 Tendinopatie

Con il termine “tendinopatia” si identifica in modo generico qualsiasi patologia a carico dei tendini. Storicamente fu “tendinite” il primo termine utilizzato per descrivere una sintomatologia dolorosa di tipo cronico a livello di un tendine, concetto che implicava di per sé l’esistenza di uno stato infiammatorio quale processo patologico primario. Tuttavia, successivamente apparvero in letteratura i risultati dei primi studi istologici che mostravano la presenza di un processo di tipo degenerativo che era perlomeno coesistente con quello infiammatorio. Tutto ciò mise in seria discussione il ruolo patogenetico primario del processo infiammatorio stesso nell’ambito della patologia tendinea (3), da allora il termine “tendinite” è stato progressivamente sostituito con il termine più generico ma più consoni di “tendinopatia”. Inoltre, come si vedrà più avanti, la tendinite non è altro che un particolare tipo di tendinopatia.

2.2 L’aspetto istopatologico del tendine affetto da tendinopatia

Nel tendine sano le fibre si mostrano, da un punto di vista dell’architettura strutturale, arrangiate parallelamente e compattate tra loro. Nel tendine lesionato, al contrario, le fibre mostrano un netto incremento del loro aspetto ondulato ed una marcata separazione strutturale, talvolta si evidenzia anche una perdita netta della loro normale organizzazione. Nel tendine semplicemente tendinosico, ossia che abbia comunque mantenuto una sua

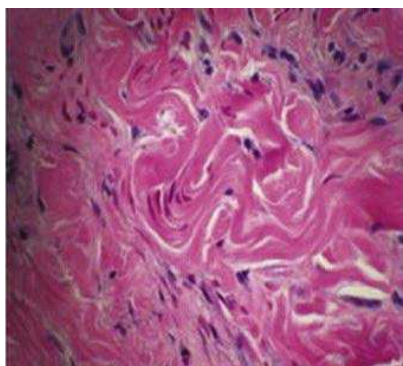


Figura 8 Immagine al microscopio ottico di un tendine affetto da tendinopatia

continuità strutturale, si può notare invece che l’aumento dell’aspetto ondulato delle fibre è meno accentuato rispetto a quello osservabile nel tendine francamente lesionato. I nuclei dei tenociti del tendine affetto da tendinopatia appaiono generalmente appiattiti ed affusolati e, talvolta, organizzati in linea. Nel tendine lesionato invece i tenociti si mostrano nettamente diminuiti numericamente e i nuclei sono arrotondati. In alcuni casi i tendini lesionati mostrano una vascolarizzazione anarchica, spesso correlata

con l'importanza del processo degenerativo in atto, inoltre questa neo-vascolarizzazione generalmente corre parallelamente rispetto alle fibre collagene. Si può anche osservare un incremento del contenuto di GAG, i quali potrebbero influenzare la struttura delle fibre e la loro organizzazione, inducendo una risposta riparativa che potrebbe contemplare anche un processo di neo-vascolarizzazione.

2.3 Lesioni tendinee acute e croniche

Le patologie tendine-specifiche includono lesioni tendinee principalmente acute e croniche. Se i sintomi sono presenti da più di 3 mesi, la tendinopatia è classificata come cronica, se sono presenti da 6 fino a 12 settimane prima è considerata subacuta, mentre se essi sono presenti da non più di 6 settimane si parla di lesioni acute (10).

La lesione acuta del tendine si riferisce alla rottura parziale o completa dello stesso, che ne interrompe la continuità e può alla fine portare alla perdita di movimento. La rottura del tendine è seguita da un processo di guarigione naturale, sebbene questa sia meno efficace rispetto a quanto avviene in altri componenti del sistema muscolo-scheletrico (11).

La lesione cronica del tendine, si riferisce ai sintomi clinici tra cui dolore, tenerezza focale del tendine, diminuzione della forza e movimento nei tendini interessati. Contrariamente alla rottura parziale o completa, questo tipo di lesione tendinea si verifica senza lacerazione macroscopica del tendine, e può essere identificata dalle seguenti caratteristiche istologiche: disorganizzazione della fibrilla di collagene, aumento del contenuto di proteoglicani e glicosaminoglicani e aumento dell'ECM, ipercellularità e neo-vascolarizzazione. Questi cambiamenti cellulari e molecolari modificano le proprietà meccaniche del tendine e possono causare dolore (11).

Le tendinopatie sono favorite da numerosi fattori estrinseci e intrinseci. I più comuni fattori di rischio intrinseci comprendono il sesso, l'età e le malattie come il diabete mellito di tipo 2 e l'obesità (12). Per quel che riguarda il sesso, per esempio, la maggior parte delle lesioni tendinee si verificano nei maschi. La predominanza maschile nelle rotture del tendine di Achille varia tra 7 a 1 e 4 a 1 (13). Sebbene il 60% delle lesioni da uso eccessivo subite durante la corsa si verifichi negli uomini, sotto ai 30 anni sono però le donne quelle a maggior rischio di lesioni da overuse. Anche la predisposizione genetica può influenzare il rischio di lesioni tendinee (14).

Il principale fattore estrinseco riconosciuto invece è il carico anomalo, spesso collegato

all'esercizio fisiologico, allo sport e ad ambienti di lavoro specifici.

Si ritiene che la tendinopatia cronica derivi da un carico meccanico anomalo ripetitivo, mentre la lesione acuta del tendine spesso si verifica dopo un solo evento di sovraccarico isolato (11).

2.3.1 Lesioni tendinee acute

Crass et al. in uno studio (15) hanno esaminato la rottura tendinea su modello equino per quel che riguarda l'aspetto istologico ed ecografico: in questo studio le rotture tendinee vengono definite lesioni in acuto del tendine caratterizzate dal punto di vista istologico dalla presenza di emorragia associata a edema e inizialmente a una minima reazione cellulare. All'ecografia in questo stadio il tendine lesionato risulta slargato e di ecogenicità diminuita rispetto al tendine normale. Successivamente, nella fase infiammatoria precoce, predomina invece l'ipercellularità: sono presenti fibroblasti e monociti inframmezzati alle fibre del tendine residuo. All'ecografia queste fibre si vedono come aree lineari iperecogene che separano delle zone dove non si rilevano echi, corrispondenti alle aree in cui è presente l'infiltrato infiammatorio. Si entra poi nella fase infiammatoria tardiva quando l'infiammazione acuta si risolve e i macrofagi carichi di emosiderina diventano evidenti, così come l'aumento di sostanza fondamentale che suggerisce l'iniziale formazione di collagene. Dal punto di vista ecografico le aree di cellularità residua e di precoce formazione del collagene risultano iperecogene. Segue poi una fase in cui si verifica una quasi completa risoluzione della reazione infiammatoria, e all'istologia è presente una zona centrale che rappresenta il tessuto fibroso ancora immaturo, circondata da una zona a maggiore cellularità dove il processo di fibrogenesi avviene attivamente. Quando poi il processo di guarigione è completo, le fibre divengono essenzialmente riallineate lungo l'asse del tendine, anche se non del tutto. Persistono inoltre un'infiltrazione cellulare dell'endotenonio e un aumentato numero di fibroblasti.

Tra le cause principali di rottura tendinea, oltre ai fattori di rischio estrinseci e intrinseci nominati sopra, non si può non citare per esempio la terapia con fluorochinoloni. In uno studio (16) in cui sono stati analizzati 98 pazienti trattati con fluorochinoloni il tendine di Achille era il sito di lesione più comune (88 casi su 98). Trentanove casi (44%) erano bilaterali. Altri siti includevano il tendine del tricipite (2 casi), guaina del tendine flessore (dito; 2 casi), pollice (3 casi), rotuleo (1 caso), tendine sopraspinato (1 caso), quadricipite (1 caso), subscapularis terrea (1 caso) e cuffia dei rotatori (1 caso). Ottantadue pazienti (84%) hanno manifestato tendinite. Il tempo medio di insorgenza dei sintomi ($\pm$ DS) dopo l'inizio della

terapia con fluorochinoloni era di $17,6 \pm 19,5$ giorni; tuttavia, il 50% dei casi si è verificato entro i primi sei giorni. La rottura del tendine si è verificata in 40 soggetti (41%), con un inizio medio ($\pm$ DS) di $25,6 \pm 42,3$ giorni (mediana, 6 giorni) dopo l'inizio del trattamento con fluorochinolone. È stato riportato che la lesione del tendine si verifica già 2 ore dopo aver ricevuto la prima dose di fluorochinolone (ciprofloxacina) (17) fino a 6 mesi dopo la fine del trattamento (18).

Clinicamente, la lesione tendinea si manifestava più comunemente con dolore intenso e insorgenza improvvisa. Altri segni e sintomi frequenti includevano tenerezza alla palpazione, edema e difficoltà nel movimento dell'area interessata. Sono stati anche riportati noduli dolorosi, guaine ispessite dei tendini, calore, rigidità ed eritema. Le diagnosi sono state fatte principalmente mediante esame fisico, sebbene occasionalmente fossero utilizzate radiografia, ecografia, scansione nucleare o risonanza magnetica.

2.3.2 Lesioni tendinee croniche

L'esatta patogenesi della tendinopatia cronica rimane in gran parte sconosciuta ma sembra essere un processo multifattoriale, in cui sono implicati i fattori estrinseci e intrinseci nominati in precedenza, come età (per la diminuzione del flusso sanguigno arterioso con l'ipossia locale, meno nutrizione, metabolismo alterato e radicali liberi); perfusione vascolare (l'ischemia si verifica quando un tendine è al massimo della sua trazione e studi sulla microdialisi (19) hanno dimostrato alte concentrazioni intratendinee di lattato nei tendini di Achille con dolore cronico. Nel momento del rilassamento, poi, si verifica riperfusione, che genera radicali liberi dell'ossigeno); carico fisico (sport/occupazione); forza eccessiva; caricamento ripetitivo; movimento anomalo/insolito; anomalie genetiche e geneticamente determinate; malattie infettive; condizioni neurologiche e molti altri. Manca, però, per la maggior parte di questi fattori lo sfondo scientifico, motivo per cui essi devono essere considerati come teorie non comprovate e, soprattutto, la loro importanza clinica non è ben nota (10).

Nonostante questa condizione si verifichi anche in individui fisicamente inattivi, la visione tradizionale della tendinopatia è quella di una lesione del tendine associata a un uso eccessivo da carico meccanico ripetitivo (20), microrotture e fasi acute e poi croniche di tendinite che portano alla degenerazione del tendine stesso. Al momento, la teoria della deformazione meccanica è la teoria più accettata per spiegare i meccanismi che causano le lesioni da sovraccarico del tendine (21,22): secondo quest'ultima un carico pesante ripetuto può produrre

cambiamenti patologici iniziali nella matrice extracellulare o nei componenti cellulari di un tendine. In particolare, quando il carico supera la forza del tendine (resistenza), il danno progressivo (la capacità basale del tessuto di riparare sè stesso dopo essere stato sopraffatto dal processo microtraumatico ripetitivo) può portare alla distruzione della struttura del tendine che viene interrotta micro e macroscopicamente da questo ripetitivo sforzo (spesso di natura eccentrica). Di conseguenza le fibre di collagene iniziano a scivolare l'una accanto all'altra, causando la rottura dei cross-link con edema infiammatorio e dolore, e formando un'area focale di degenerazione intratendinea, ove sono presenti rotture parziali e rotture complete.



Figura 9 Cambiamenti strutturali nella tendinopatia achillea cronica. Il lato sinistro dell'ipotetico tendine è sano. Le fibre di collagene sono strettamente raggruppate e sono prevalentemente collagene di tipo I. I vasi sanguigni sono radi e si trovano principalmente nel tessuto connettivo più libero che circonda i fasci di collagene (area ingrandita). La parte destra rappresenta i tipici cambiamenti in un tendine tendinopatico. Le fibre di collagene sono più sottili e organizzate più liberamente e contengono una quantità maggiore di collagene di tipo III. Vi è un aumento della quantità di proteoglicani (giallo e blu), che porta ad un aumento del contenuto di acqua (edema) all'interno del tessuto. Questi cambiamenti strutturali sono coerenti con le lesioni dei tessuti e possono includere sia aree degenerative (ad es. Morte cellulare estesa o metaplasia) sia aree reattive, in cui sembra che si stia verificando una guarigione o una fibrosi in corso. Brukner P, Khan K. Clinical Sports Medicine. 3rd ed. Sydney, Australia: McGraw-Hill; 2006

Si ritiene quindi che il trauma cumulativo indebolisca la struttura cross-linked del collagene, la matrice non collagena e gli elementi vascolari del tendine e infine porti alla tendinopatia (10).

È molto probabile che il sovraccarico svolga un ruolo decisivo nella tendinopatia perché l'incidenza cumulativa della tendinopatia Achillea durante la vita è quasi 10 volte più alta tra gli atleti di resistenza d'élite che tra le persone sedentarie (23). Inoltre, l'esercizio avrebbe importanti effetti sulla funzione immunitaria. Questi effetti sono mediati da diversi fattori, tra cui, tra l'altro, il rilascio indotto durante l'esercizio stesso di ormoni dello stress classici (24), insieme con quello di una moltitudine di mediatori pro-infiammatori, come ad esempio citochine (che possono essere rilevate nel plasma e nelle urine durante e dopo l'esercizio), prostaglandine e neuropeptidi. Il tendine e le cellule endoteliali sembrano essere in grado di produrre la maggior parte di questi mediatori.

2.4 La coesistenza di cambiamenti degenerativi e infiammatori nella tendinopatia cronica

Numerosi autori concordano sul fatto che i fenomeni di tipo infiammatorio e quelli di tipo degenerativo si possano riscontrare assai raramente in modo isolato e su come invece, molto più spesso, coesistano in aree adiacenti dello stesso campione anatomico osservato (6), anche se normalmente il processo degenerativo prevale su quello infiammatorio (25). In linea generale infatti, i cambiamenti macroscopici a livello intra-tendineo, nel caso di tendinopatia, possono essere descritti come la formazione di un'area scarsamente demarcata all'interno della quale è identificabile una perdita focale della struttura tendinea: la porzione tendinea affetta perde il suo aspetto traslucido ed appare grigiastra ed amorfa; il tendine appare ispessito in modo fusiforme o nodulare ed al suo interno si possono talvolta osservare calcificazioni, fibro-calcificazioni e metaplasia ossea. Le differenti porzioni di area tendinea degenerata mostrano un'ampia variabilità per ciò che riguarda la densità cellulare, in alcune zone si può infatti osservare un incremento della densità cellulare contestuale ad un alto tasso di attività metabolica; al contrario, in altre zone sono osservabili solo poche cellule picnotiche o addirittura non ci sono cellule.

Alcuni cambiamenti patologici si notano spesso anche nella matrice tendinea, a livello della quale è frequentemente osservabile materiale mucoide contestualmente ad una separazione delle fibre collagene. Queste ultime di solito mostrano un'irregolarità, una disuguaglianza ed un aumento nel loro crimping, oltre ad una perdita della visibilità della barra trasversale. Le fibre degenerate possono essere sostituite da zone di calcificazione o da infiltrati lipidici, che danno origine al noto fenomeno della tendolipomatosi. Si verifica inoltre un netto incremento, rispetto al collagene di tipo I, della quota di collagene di tipo III, il quale è dotato di un numero minore di cross-links tra ed all'interno delle unità di tropocollagene. Nonostante l'evidenza di tali mutamenti di tipo degenerativo però, nell'ambito del tessuto tendineo affetto da tendinopatia, la loro effettiva rilevanza clinica non è ancora del tutto chiara. L'ipossia degenerativa, la degenerazione mucoide, le calcificazioni e la tendolipomatosi rappresentano infatti tutti fenomeni che, singolarmente o in associazione, sono riscontrabili anche in un'alta percentuale di tendini di individui sani ed asintomatici di età superiore ai 35 anni (26).

Nel caso di tendinopatia sono di frequente riscontro anche dei cambiamenti a livello della struttura peritendinea, che appaiono con maggior frequenza nei tendini provvisti di guaina sinoviale. Nella fase acuta di una tendinopatia infatti, all'esame istologico si evidenzia frequentemente la presenza di essudato fibrinoso, seguito poi da una seconda fase caratterizzata

da una diffusa proliferazione di fibroblasti. In seguito ad un'osservazione macroscopica, il tessuto peritendineo appare inspessito e spesso è visibile un fenomeno di adesione tra tendine e paratenonio. Durante la fase di cronicizzazione le cellule di maggior riscontro a livello del peritenonio sono i fibroblasti e i miofibroblasti. Questi ultimi possiedono una modesta quota di actina all'interno del loro citoplasma e sono pertanto in grado di esprimere una certa capacità contrattile. Per queste loro caratteristiche i miofibroblasti possono indurre e mantenere nel tempo uno stato di contrazione prolungata in un quadro di adesione peritendinea, causando dunque uno stato di costrizione vascolare che perturba la circolazione intratendinea la quale, a sua volta, probabilmente innescherebbe un processo reattivo di proliferazione vascolare.

In uno studio condotto dal gruppo di lavoro di Alfredson (3), si riferisce come il livello di PGE2 fosse simile sia nel caso di tendinopatia cronica, che nel caso di assoluta normalità biologica ed istologica, escludendo in tal modo la presenza di un processo infiammatorio nelle fasi tardive del processo tendinopatico. Un'opinione contrastante però è quella di Yang e i suoi collaboratori (27), che al contrario hanno osservato come uno stress esercitato cronicamente a livello del tendine rotuleo induca un aumento della produzione di PGE2 da parte dei fibroblasti. Inoltre, si è visto che i livelli di lattato sono significativamente accresciuti nei tendini patologici, a probabile testimonianza del fatto che la prevalenza dei meccanismi anaerobici del tendine affetto da tendinopatia rappresenta la risposta adattativa ad un'insufficienza dell'apporto di ossigeno a livello tissutale. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che l'ipossia osservabile nei tendini sofferenti a causa di un fenomeno degenerativo induce la produzione di Hypoxia Inducible Factor (HIF) che, a sua volta, provocherebbe l'espressione di VEGF. Quest'ultimo è in grado di provocare una up-regulation dell'espressione delle MMPs (metalloproteasi), che incrementano la degradazione dell'ECM alterando le proprietà meccaniche del tendine. Tutti questi meccanismi potrebbero predisporre il tendine a microtraumatismi cronici e, a lungo termine, ad una franca rottura.

Queste osservazioni sottolineano ulteriormente che il ruolo dell'infiammazione e quello della degenerazione all'interno dei tendini sono strettamente collegati (4).

2.5 L'effetto del processo di invecchiamento sul tendine

Il fenomeno dell'invecchiamento coinvolge anche il tendine, come ogni altra struttura dell'organismo umano, e può essere implicato nello sviluppo di tendinopatia dal momento che l'età rientra tra i fattori di rischio intrinseci. Durante l'invecchiamento, tutti i componenti

della matrice tendinea vanno incontro a profondi cambiamenti sia qualitativi che quantitativi: alla nascita il contenuto di collagene è all'incirca pari al 35% del peso secco del tendine, mentre i proteoglicani sono pari al 5% e le glicoproteine al 6% circa. Alla fine del processo di crescita il contenuto di collagene nei tendini è sensibilmente aumentato, sino a raggiungere una quota pari all'85%, mentre i proteoglicani e le glicoproteine sono scesi ad una quota rispettivamente del 2% e del 3%. Nel tendine dei soggetti anziani il contenuto di collagene può rimanere invariato o scendere leggermente, sino ad attestarsi ad una quota di circa il 75%, mentre il contenuto di proteoglicani e proteine scende ulteriormente.

Il contenuto di acqua, che rappresenta una quota pari a circa l'80-85% al momento della nascita, si porta ad una percentuale compresa tra il 30 e il 70% nel tendine del soggetto anziano. La perdita di acqua unitamente a quella di elastina (anche se in questo caso non vi è unanimità di consensi) e proteoglicani causerebbe una perdita delle caratteristiche elastiche del tendine. Il processo di invecchiamento comporta anche un incremento dei cross-link delle molecole di tropocollagene che, a sua volta, comporta un decremento della solubilità del collagene stesso.

Con l'età decresce anche la CSA (cross sectional area: sezione anatomica trasversale) delle fibrille collagene, inoltre il turnover dello stesso subisce un rallentamento. Tutti questi mutamenti a livello biologico provocano una diminuzione del numero dei tenoblasti, nonché un allungamento ed un assottigliamento delle rimanenti strutture cellulari.

Il processo di invecchiamento determina un aumento della stiffness del collagene, contestuale ad una diminuzione della sua forza tensile. Inoltre, con l'età, il flusso sanguigno e l'attività dei tenociti diminuiscono, concorrendo in tal modo a ridurre le capacità autoriparative del tendine. La diminuzione del flusso sanguigno provoca un cambiamento del metabolismo tendineo che si sposta dal versante aerobico a quello anaerobico attraverso una riduzione del ciclo di krebs: il risultato di tali cambiamenti strutturali e metabolici, che iniziano a palesarsi intorno alla terza decade di vita, è un indebolimento generalizzato della struttura tendinea in quanto tale, che viene esposta, rispetto al tendine giovane, ad un maggior rischio d'incidenza di danni da overuse e/o di natura traumatica. Tuttavia, è necessario considerare che in letteratura si trovano in merito a quest'argomento risultati piuttosto discordanti: infatti, alcuni studi incentrati sul cambiamento della CSA tendinea in funzione dell'età riportano un aumento della stiffness e della forza tensile del tendine stesso (28), mentre altri riferiscono risultati esattamente opposti (29), infine altri ancora non evidenziano nessun tipo di cambiamento strutturale

correlato con l'età (30). È molto probabile che tale discrepanza di risultati sia ascrivibile alla diversa età anagrafica delle popolazioni considerate nei vari studi. In aggiunta, vista la scarsa numerosità degli studi inerenti alle conseguenze meccaniche, biologiche e funzionali indotte dal fenomeno dell'invecchiamento sul tessuto tendineo umano, vengono considerati anche studi eseguiti su modello animale, ma anche in questi ultimi sono evidenti le discrepanze di cui sopra. Inoltre, anche l'applicazione di risultati ottenuti in sperimentazioni sul tendine in vitro applicate al suo comportamento in vivo dovrebbero essere considerate con estrema cautela, questo perché:

- Le forze esercitate su un tendine in vivo possono essere influenzate dall'età e agire su una regione differente rispetto a quella su cui vengono eseguite le misurazioni in vitro;
- Per eseguire una prova di trazione in vitro, è necessario il clampaggio del campione. La fissazione di una struttura fibrosa con una clamp è inevitabilmente associata allo slittamento delle fibre e/o a una eccessiva concentrazione dello stress in quel punto, che può risultare in una rottura prematura. Questi artefatti di misurazione potrebbero essere più profondi nei tendini più giovani perché di solito sono più spessi dei tendini più maturi;
- Molti esperimenti in vitro sono stati eseguiti utilizzando tendini conservati, i quali potrebbero avere proprietà alterate, visto che sono affetti da diversi gradi di invecchiamento dovuti appunto alla conservazione stessa (31).

In sintesi, nonostante l'argomento necessiti ancora di studi di maggior evidenza scientifica, si può comunque evidenziare come l'invecchiamento sia un processo degenerativo che porta la struttura tendinea a profonde alterazioni sia dal punto di vista strutturale che funzionale.

2.6 Tendinopatie specifiche: l'esempio della tendinopatia Achillea

L'eziologia delle lesioni da sovraccarico del tendine di Achille è multifattoriale, sono stati segnalati ad esempio errori di addestramento nel 60-70% delle lesioni da corsa (32). Un rapido aumento del chilometraggio, un aumento dell'allenamento a intervalli e la corsa su strade in pendenza e scivolose sono associati alla paratendinopatia di Achille (33). In uno studio su 698 pazienti con lesioni del tendine di Achille, il 66% aveva paratenonite e il 23% aveva problemi di inserzione del tendine di Achille. Nell'8% dei pazienti, la lesione era localizzata alla giunzione miotendinea e il 3% dei pazienti presentava una rottura completa del tendine.



Figura 10 Tendine di Achille

Dei pazienti con problemi al tendine di Achille, l'89% erano uomini. La corsa era lo sport principale per il 53% dei pazienti studiati (34).

Il continuo sovraccarico del tendine di Achille è, tuttavia, considerato il principale stimolo patologico che porta alla tendinopatia (35). In 455 atleti con problemi al tendine d'Achille, Kvist e colleghi hanno riportato che il 53% era coinvolto in sport di corsa e l'11% era calciatore, sottolineando il ruolo eziologico della corsa (36). Il resto dei pazienti era coinvolto in altri sport in cui la corsa era un importante mezzo di allenamento.

La tendinopatia di Achille però non è sempre associata a un'eccessiva attività fisica come dimostra un altro studio in cui il 31% dei 58 pazienti con tendinopatia Achillea non ha partecipato a sport o attività fisica intensa (37).

La storia naturale della tendinopatia di Achille comunque non è ancora del tutto chiara: è stato stimato che dal 24% al 45,5% dei soggetti affetti che non rispondono alla gestione conservativa viene successivamente sottoposto a gestione operativa (38). In uno studio longitudinale di 8 anni sulla gestione conservativa dei pazienti con tendinopatia di Achille, 24 degli 83 pazienti considerati (29%) hanno dovuto sottoporsi ad una operazione. Una volta guariti, di tutti i pazienti settanta (84%) hanno avuto il pieno recupero del loro livello di attività. A 8 anni, 78 pazienti (94%) erano asintomatici o avevano solo un lieve dolore dopo un intenso esercizio fisico; tuttavia, 34 pazienti (41%) hanno iniziato a soffrire di tendinopatia di Achille nel tendine controlaterale inizialmente non coinvolto (39,40).

CAPITOLO 3

Diagnosi e classificazione delle lesioni tendinee

Il principale obbiettivo della diagnostica per immagini è quello di fornire al clinico indicazioni quanto più possibile aderenti alla realtà anatomico-patologica che si sta valutando allo scopo di consentirgli una accurata pianificazione prognostica e terapeutica.

Le moderne tecniche strumentali consentono di stabilire non solo l'estensione e la gravità della lesione ma anche di migliorare la conoscenza dei meccanismi fisiopatologici che ne determinano l'evoluzione.

3.1 Metodiche diagnostiche: l'ecografia

L'ecografia è una metodica molto utilizzata per studiare la patologia tendinea. Da una parte essa offre grandi vantaggi come il basso costo e la velocità di esecuzione, dall'altra però bisogna ricordare che rimane una tecnica operatore-dipendente. In questo campo sono richieste delle sonde ecografiche ad alta frequenza, in genere 7-12 MHz, al fine di ottenere la risoluzione necessaria per rilevare sottili anomalie del tendine. I recenti progressi nella tecnologia degli

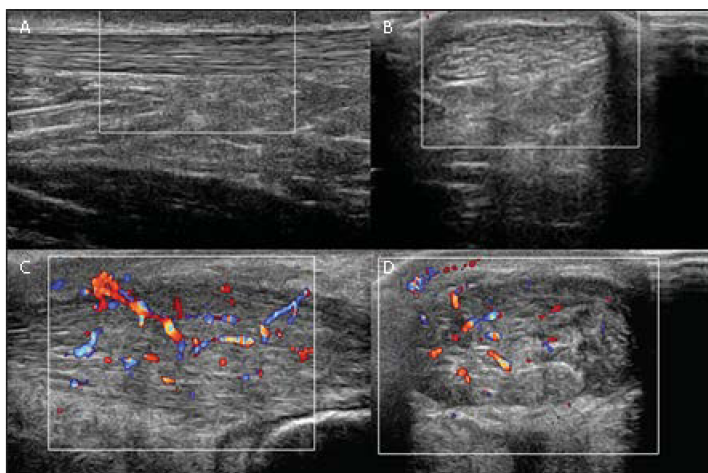


Figura 11 Immagine ecografica di un tendine di Achille con color Doppler. Immagini trasversali (A) e longitudinali (B) di un normale tendine di Achille asintomatico che mostra una normale trama dell'eco tendineo senza segnale Doppler. Immagini trasversali (C) longitudinali e (D) di un tendine di Achille sintomatico che mostrano un ispessimento significativo del tendine e la presenza di alterazioni ipoecogene. In questo caso il segnale Doppler è significativamente evidente anche all'interno del tendine. (66)

ultrasuoni, tra cui una maggiore larghezza di banda del trasduttore, un filtro dinamico e una migliore formazione del fascio continuano a migliorare la risoluzione dell'immagine e i rapporti segnale-rumore. Inoltre, gli sviluppi del software hanno portato alla disponibilità di un campo visivo esteso e di tecniche tridimensionali, che stanno iniziando a trovare applicazioni nell'imaging dei tendini (41). Per evitare artefatti dovuti all'anisotropia del tendine è necessario l'utilizzo di sonde lineari.

Ultimamente, l'attenzione è stata focalizzata soprattutto sull'uso dell'imaging Doppler per la patologia tendinea, con il quale si possono notare molto bene le anomalie di vascolarizzazione presenti nel tendine tendinopatico. Infatti, i tendini normali sono di solito relativamente avascolari [FIG 11].

Come già detto, il tendine normale contiene principalmente collagene di tipo I che è gerarchicamente disposto in fibrille, fibre e fascicoli allineati in parallelo. Queste fibre allineate uniformemente possono essere visualizzate con alte frequenze ponendo la sonda ecografica a livello del fascicolo (42).

La classificazione ecografica di Archambault et al (43), molto utilizzata per descrivere l'aspetto agli ultrasuoni del tendine lesionato, distingue tre gradi:

1. Tendine normale, ad ecostruttura fibrillare omogenea e margini paralleli
2. Slargamento fusiforme o diffuso del tendine (i margini non sono più paralleli ma risultano come inarcati)
3. Presenza di area ipoecogena con o senza slargamento del tendine

Tra i principali cambiamenti istologici che si verificano nella tendinosi, il cambiamento più evidente è l'aumento del numero di cellule, che mostrano un fenotipo alterato, metabolicamente più attivo. Invece dei tenociti appiattiti disposti parallelamente tra le fibre, ci sono un numero maggiore di tenociti arrotondati e attivati che si intervallano lungo tutto il tendine patologico (21). Mentre la determinazione dei cambiamenti del numero e del fenotipo delle cellule va oltre la risoluzione delle modalità di imaging clinico, è possibile rilevare le conseguenze provocate da queste cellule metabolicamente attive. Questi cambiamenti sono stati descritti all'ecografia come aumento delle dimensioni del tendine e alterazione eterogenea o diffusa nell'ecogenicità (44). La disorganizzazione fibrillare è un'altra caratteristica della tendinosi, in cui le fibre si presentano con disposizione casuale, a causa della sostituzione del collagene di tipo I da parte del collagene di tipo II e III. In sezione longitudinale la struttura del tendine normale è lineare, fibrillare e iperecogena, i bordi sono netti e anch'essi iperecogni perché formati dal peritenonio. La disorganizzazione fibrillare e la mancanza di fibre allineate parallelamente generano invece echi multipli, restituendo l'immagine di un'area di ipoecogenicità. (45). Infine, la neovascolarizzazione all'interno del tendine patologico può essere osservata tramite l'imaging ecografico color-power-Doppler [FIG 11]. Weinberg et al. (46) hanno dimostrato che il flusso sanguigno al Doppler è stato osservato solo nei tendini che contenevano un'area di ipoecogenicità e non nei tendini anormalmente ispessiti con normale ecogenicità.

Questa associazione tra la presenza di vasi sanguigni e le aree di disorganizzazione delle matrici suggerisce che l'infiltrazione dei vasi sanguigni potrebbe essere opportunistica.

Anche le radiografie tradizionali e la tomografia computerizzata (TC) sono state utilizzate per studiare la patologia tendinea, ad esempio l'RX ha una sua utilità per quel che riguarda le tendinopatie calcifiche. Tuttavia, gli ultrasuoni rappresentano ad oggi una delle modalità di imaging preferenziali, infatti i progressi nella tecnologia dei trasduttori ad ultrasuoni e il miglioramento della sensibilità dell'eco-color-Doppler hanno notevolmente aumentato l'utilità e l'importanza dell'ecografia. Inoltre, non bisogna dimenticare il fatto che sia molto utile anche come guida per le procedure percutanee. Tuttavia, come accennato inizialmente questa metodica è sicuramente operatore-dipendente, poiché lievi cambiamenti nell'inclinazione del trasduttore ad ultrasuoni generano artefatti imminenti che sono simili a quelli osservati nella patologia tendinea.

3.2 Metodiche diagnostiche: l'elastosonografia

L'elastosonografia (elastografia ad ultrasuoni) è una tecnica che valuta le proprietà meccaniche dei tessuti, per cui, dato che queste ultime vengono alterate nella patologia del tendine, essa può essere utile per migliorare la capacità diagnostica degli ultrasuoni convenzionali. Il principio di base dell'elastosonografia risiede nel fatto che la compressione del tessuto esaminato con la sonda dell'ecografo produce una deformazione, valutata come variazione della distanza tra due punti, differente a seconda del suo grado di "comprimibilità": minore nei tessuti duri e maggiore nei tessuti soffici. Questa deformazione può essere rilevata e quantificata attraverso software dedicati. I tessuti più rigidi hanno valori di deformazione più bassi, mentre i tessuti più soffici hanno valori di deformazione più alti. Tale tecnica risulta per il paziente sovrapponibile ad una comune ecografia e richiede, relativamente all'organo in esame, la stessa preparazione di un'ecografia basale. Sul tessuto oggetto di studio vengono selezionate delle ROI (regioni di interesse) di grandezza tale da inserire la struttura da esaminare ed un'ampia zona di tessuto circostante. Esistono due tipi di elastosonografia:

- 1) Elastosonografia a mano libera, che si avvale della compressione manuale ottenuta imprimendo con il trasduttore ecografico delle leggere compressioni manuali ritmiche sull'organo esaminato. L'esame permette la visualizzazione dell'elastogramma sotto forma di un'immagine sovrapposta a quella in B-mode ed utilizza il confronto dei dati

tra l'immagine prima della compressione e quella ottenuta durante compressione per fornire una valutazione della elasticità del tessuto

- 2) Elastosonografia con compressione meccanica ottenuta mediante l'emissione di impulsi a maggiore energia e a bassa frequenza (transient elastography, con valutazione della deformazione ottenuta dalla pressione acustica (strain).

L'immagine elastosonografica viene espressa con una scala cromatica (per convenzione, rosso: elasticità elevata, Verde: elasticità intermedia; blu: assenza di elasticità) e con dei valori numerici che sono espressione di differenti gradi di elasticità. Ooi et al (47) hanno analizzato 120 pazienti con tendinopatia di Achille e 120 controlli per sesso ed età. Gli autori hanno scoperto che combinando i risultati dell'ecografia B-mode e dell'elastografia ad ultrasuoni miglioravano la sensibilità diagnostica (0,96), la specificità (0,95) e l'accuratezza (0,98), con una migliore correlazione clinica ($P < 0,001$) rispetto all'ecografia in B-mode e all'eco-color-doppler (sensibilità, 0,67; specificità, 0,94; precisione, 0,83). L'aggiunta dell'elastosonografia all'ecografia convenzionale potrebbe migliorare l'associazione con i sintomi clinici (42).

3.3 Metodiche diagnostiche: la risonanza magnetica

La Risonanza Magnetica per le sue caratteristiche intrinseche di elevato contrasto, multiplanarietà, esaltazione del dettaglio anatomico e capacità di individuare lesione ancorché minime, si è dimostrata una delle tecniche più affidabili nello studio delle tendinopatie fornendo quadri diagnostici altamente significativi.



Figura 12 Immagine alla risonanza magnetica di un tendine di Achille normale. (A) Sagittale e (B) assiale densità protonica - immagine della sequenza ponderata che mostra un tendine di Achille normale (freccia) con spessore uniforme e intensità del segnale prevalentemente bassa.

I criteri di semeiotica RM sono ben conosciuti e riproducono fedelmente le alterazioni anatomo-patologiche della lesione. In condizioni di normalità i tendini, così come legamenti, le fibrocartilagini e le capsule articolari ricche di collagene, presentano basso segnale (colore nero, omogeneo) in tutte le sequenze e in tutti i tipi di immagini [FIG 12]. Nel tendine infatti, tra le

fibre e i fascicoli sono presenti acqua e proteine non collagene, come i proteoglicani: questa relazione tra acqua e collagene provoca una forte interazione dipolo-dipolo e uno scarso segnale osservato alla risonanza magnetica (48). Nel tendine affetto da tendinopatia, però, si verifica un aumento del contenuto di proteoglicani, passando dai piccoli proteoglicani ricchi di leucina (ad esempio la decorina) ai più grandi proteoglicani idrofili (ad esempio l'aggrecano), alterando così lo stato di idratazione del tendine (49). Nell'insieme, l'alterazione nell'allineamento fibrillare e un aumento del contenuto d'acqua portano in risonanza magnetica ad un aumento del segnale intratendineo (48).

Riassumendo, la risonanza magnetica ha eccellenti dettagli sul contrasto dei tessuti molli e capacità di imaging multiplanare con eccellente riproducibilità. Tuttavia, lo svantaggio maggiore è rappresentato dal fatto che sia una metodica costosa e di disponibilità limitata. Ciò nonostante, rimane comunque una delle più utilizzate nell'imaging delle tendinopatie insieme con l'ecografia, in quanto quest'ultima può concentrarsi su un'area in cui sia presente dolore o un altro sospetto clinico di patologia, mentre la risonanza fornisce una valutazione globale della regione interessata (47).

3.4 Classificazione delle lesioni tendinee

Secondo una classificazione su base istopatologica (21) le tendinopatie si possono suddividere in:

- **Tendinite:** degenerazione sintomatica del tessuto tendineo con notevole risposta infiammatoria a livello istologico. Il suffisso -ite indica infatti la necessaria presenza di un processo flogistico in atto con tanto di sintomatologia associata come dolore al movimento e alla palpazione. Se la flogosi si estende alle guaine tendinee può associarsi una tumefazione del tendine infiammato.
- **Tendinosi:** è la sofferenza cronica a carico di uno o più tendini che scaturisce dalla degenerazione della normale struttura tendinea. Rientra nel gruppo delle tendinopatie insieme alle tendiniti, ma a differenza di queste ultime non è caratterizzata da un processo flogistico acuto, che anzi spesso è assente, mentre il problema principale è il cambiamento strutturale del tendine stesso. La tendinosi coinvolge tutte le componenti del tendine: collagene, tenociti e matrice extracellulare. Alcune fibre collagene vanno

incontro a rottura, altre perdono il loro orientamento parallelo, si verifica una diminuzione progressiva del diametro delle fibre e in generale della densità del collagene. Possono essere presenti anche micro-rotture, a volte circondate da depositi di eritrociti, fibrina e fibronectina. Le fibre di collagene mostrano un crimping irregolare e una maggiore ondulazione, in contrasto con il normale aspetto a stretti fasci paralleli. Vi è un aumento del collagene di tipo III, con una riduzione della birifrangenza del tendine al microscopio a luce polarizzata. In alcune aree i tenociti sono più abbondanti del normale, e possono avere nuclei arrotondati, inoltre si nota una maggiore produzione di proteoglicani e proteine da parte dei tenociti stessi, suggerendo che sono tornati al loro stadio tenoblastico, con un tasso metabolico elevato. Al contrario, altre aree del tendine possono contenere una ridotta quantità di tenociti, con piccoli nuclei picnotici. Occasionalmente, vi è infiltrazione di linfociti e cellule macrofagiche, probabilmente come parte di un processo di guarigione.

Esistono almeno sei diversi modelli di degenerazione del collagene (ipossico, ialino, mucoide o mixoide, fibrinoide, lipoide, calcifico e metaplasia fibrocartilaginea e ossea). Queste caratteristiche possono coesistere, la loro prevalenza relativa dipende dal sito anatomico e dalla natura dell'insulto causale (per esempio ipossia contro carico meccanico, danno acuto contro cronico). Pertanto, la tendinosi è il risultato finale di una serie di processi patologici con manifestazioni istologiche leggermente diverse.

Nel tendine di Achille, la degenerazione è generalmente mucoide o lipoide. Nella degenerazione mucoide, la regione interessata si ammorbidisce, perdendo il suo normale aspetto bianco luccicante per diventare grigia o marrone. La microscopia ottica rivela fibre di collagene più sottili del normale, con grandi chiazze e vacuoli interfibrillari e un aumento dell'alcianofilia della matrice extracellulare. La degenerazione lipoide provoca un accumulo intratendineo anomalo di lipidi. Inoltre, anche le fibre collagene nei tendini d'Achille sintomatici perdono la loro disposizione gerarchica fascicolare.

La tendinosi non è necessariamente sintomatica. Sebbene le aree di tendinosi siano una caratteristica costante della rottura del tendine di Achille, la stragrande maggioranza di tali pazienti non ha mai avuto sintomi prima della rottura. D'altra parte, i pazienti sottoposti ad un'operazione per tendinopatia di Achille mostrano aree

simili di degenerazione. Allo stato attuale, non si comprende perché la tendinosi causi un disagio significativo in alcuni pazienti, mentre in altri rimane completamente asintomatica fino alla rottura franca del tendine. (50)

- Paratenonite: questo termine include la peritendinite, la tenosinovite e la tenovaginite. È un processo caratterizzato da edema acuto e iperemia del paratenonio, lo strato più esterno che ricopre il tendine, con infiltrazione di cellule infiammatorie. Dopo alcuni giorni, un essudato fibrinoso riempie la guaina tendinea, causando il tipico crepitio che può essere sentito durante l'esame clinico (paratenonite crepitans). Durante la cronicizzazione, compaiono i fibroblasti con un infiltrato linfocitario perivascolare, e le strutture peritendinee si addensano causando la formazione di aderenze. Compaiono poi anche un numero molto elevato (fino al 20% delle cellule non infiammatorie) di miofibroblasti, a indicare che cicatrici e restringimenti associati alla paratenonite sono un processo attivo mediato dalle cellule (50).
- Paratenonite con tendinosi: è una paratenonite associata a degenerazione intratendinea.

Un'altra classificazione (51) utilizza invece l'intensità della sintomatologia algica e il livello di performance funzionale residuo per classificare le tendinopatie in diversi gradi di severità:

- Livello 1: il paziente è asintomatico e il livello di performance funzionale è conservato.
- Livello 2: il dolore si presenta solo dopo un esercizio molto intenso, e scompare al cessare dell'attività fisica. La performance funzionale è conservata.
- Livello 3: il dolore si presenta anche durante esercizi di intensità non elevata e scompare solo 1-2 ore dopo la fine dell'attività fisica. La performance funzionale può essere normale oppure leggermente diminuita.
- Livello 4: il dolore aumenta durante qualsiasi attività fisica e perdura per 4-6 ore dopo la fine dell'esercizio fisico. La performance funzionale risulta significativamente diminuita.

- Livello 5: il dolore si presenta immediatamente dopo l'inizio di qualsiasi attività fisica, e perdura per 12-24 ore dopo la fine dell'attività. L'esecuzione degli esercizi risulta marcatamente accorciata o quasi del tutto impossibile.
- Livello 6: il dolore si presenta anche durante le attività quotidiane, qualsiasi attività sportiva risulta impossibile.

CAPITOLO 4

Il trattamento delle tendinopatie: current concepts

4.1 Processi riparativi

Il processo di riparazione tendinea si suddivide in tre fasi tra loro consequenziali ma, allo stesso tempo, estremamente interconnesse che sono: fase infiammatoria, proliferativa e di maturazione o rimodellamento.

Fase infiammatoria

La fase infiammatoria, detta anche fase essudativa, ha inizio nell'immediato periodo post-traumatico e si protrae sino a circa il quarto-settimo giorno. In seguito al danno subito dalla rete vascolare, sangue, plasma e fluidi tissutali si riversano all'interno dell'area lesionata, mentre le piastrine presenti in quella zona si legano al collagene esposto dall'evento traumatico e rilasciano fosfolipidi che stimolano i meccanismi di coagulazione. Circa un'ora dopo il trauma, nel sito interessato sono già osservabili fibrina e fibronectina che formano dei cross-link con le fibre collagene lesionate. Già queste prime tappe portano alla formazione di una tenue struttura simil-collosa che, seppure ancora strutturalmente fragile, argina l'emorragia locale e supporta meccanicamente le fibre tendinee danneggiate nel resistere alle forze tensili alle quali sono sottoposte.

A questa prima risposta fa seguito, nell'arco di poche ore, una massiccia migrazione nell'area lesionata di leucociti, polimorfonucleati e monociti, attratti da particolari sostanze prodotte nel sito stesso della lesione e denominate agenti chemiotattici. Tra questi spicca per importanza l'istamina, rilasciata dai mastociti, dai leucociti granulari e dalle piastrine: questa esplica un'azione vasodilatatoria, incrementando in tal modo la permeabilità vascolare. Sempre tra le sostanze chemiotattiche, ci sono anche la fibronectina, che esplica la sua azione richiamando leucociti e macrofagi, e la bradichinina che, oltre ad incrementare la permeabilità vascolare, stimola il rilascio di prostaglandine, in particolare la PGE2 che aumenta a sua volta la permeabilità vascolare e ha la capacità di attrarre i leucociti.

Uno dei compiti principali delle cellule pro-infiammatorie è quello di rimuovere dall'area lesionata i tessuti necrotici ed i prodotti di rifiuto: soltanto dopo la loro rimozione, ossia dopo 5-7 giorni, può iniziare appieno la fase proliferativa. Si è visto che le diverse caratteristiche

che la fase infiammatoria può assumere si possono rivelare determinanti per il successo od, al contrario, per il fallimento dei processi di guarigione del tendine, anche se ci sono ancora diverse lacune per quel che riguarda la comprensione del ruolo dei neutrofili e dei macrofagi: per esempio, da una parte alcuni autori indicano che l'attivazione dei macrofagi può rappresentare un nuovo approccio terapeutico nell'ambito della riparazione tissutale (52), dall'altra altri studi sostengono che una deplezione dei macrofagi implicherebbe un sostanziale miglioramento sia della morfologia, che delle proprietà meccaniche dell'interfaccia tendine-osso dopo ricostruzione chirurgica (53). Queste contraddizioni possono essere giustificate, perlomeno in parte, dal fatto che nell'ambito della risposta infiammatoria una molecola può adempiere svariate funzioni e, nello stesso tempo, diverse molecole possono svolgere ruoli sovrapponibili. A questo proposito è opportuno ricordare che i differenti gradi di severità della lesione possono determinare differenti stati di attivazione dei macrofagi:

- Un primo tipo di attivazione, denominata innata, innescata dai lipopolisaccaridi (LPS) o dall'IFN- γ associati allo stato pro-infiammatorio ed alla produzione di IL-6, IL-1 β e TNF- α ;
- Una seconda modalità di infiammazione, denominata classica, attivata dall'azione dell'IL-4 ed IL-23 associate all'azione del TGF- β , del TGF- α , del b-FGF (basic fibroblast growth factor), del PDGF e del VEGF.

La risoluzione dei processi infiammatori viene infine regolata dall'attività dei fibroblasti, i quali permettono ai leucociti infiltratisi nella zona lesionale sia di avviarsi verso un processo di apoptosi, che di lasciare i tessuti attraverso il circolo linfatico.

Fase proliferativa

La fase proliferativa ha inizio con un accumulo di fibroblasti, miofibroblasti e cellule endoteliali all'interno dell'area lesionata. In questa fase inizia la proliferazione di nuovi capillari che cominciano a comunicare funzionalmente con la rete capillare preesistente. Inoltre, i fibroblasti e i miofibroblasti, che possono provenire dal tendine stesso, dall'epitenonio, dalla guaina tendinea o dal paratenonio, mostrano una forte attività proliferativa e di sintesi delle componenti della matrice extracellulare (ECM). In quest'ambito un importante ruolo è svolto dal bFGF, soprattutto per ciò che riguarda la proliferazione cellulare e la vascolarizzazione all'interno dell'area lesionata. L'interazione tra capillari neoformati, fibroblasti, miofibroblasti ed ECM dà origine al tessuto di granulazione, in questo modo il "tappo" di sostanza simil-

collosa formatosi nei primi stadi della fase infiammatoria viene sostituito con una struttura più stabile; contemporaneamente la fibronectina migliora la migrazione e l'adesione dei fibroblasti.

A partire dal settimo giorno dall'evento lesivo, i fibroblasti producono i glicosamminoglicani dell'ECM ed il collagene di tipo III, anche se un netto incremento della sintesi di collagene è osservabile solamente a partire dalla terza settimana dopo l'evento. Tuttavia, le nuove fibre che si vanno formando non hanno ancora né una consistente organizzazione strutturale né un netto orientamento.

Nell'ultimo periodo della fase di proliferazione si verifica una produzione di collagene di tipo I, che continuerà sino alla fine della fase di maturazione e rimodellamento. Il collagene di tipo I, a cominciare circa dal dodicesimo/quattordicesimo giorno, inizia a sostituire il collagene di tipo III, nel frattempo il tessuto di granulazione è ulteriormente maturato e la formazione cicatriziale sta assumendo una sua solidità strutturale. Nel tendine la fase di proliferazione dura mediamente da tre a sei settimane, oltre le quali si passa progressivamente nella fase di maturazione e rimodellamento.

Fase di maturazione o rimodellamento

Quest'ultima fase è quella temporalmente più lunga, si può protrarre infatti fino ad oltre un anno dall'evento lesivo. Durante questo periodo il numero dei macrofagi, dei fibroblasti, dei miofibroblasti e dei capillari diminuisce in modo lento e progressivo, contestualmente a questo anche l'attività di sintesi va scemando. La zona cicatriziale diviene meno densa, la sua capillarizzazione decresce ed anche la sua matrice perde una certa quota fluida. In un primo tempo si assiste ad una progressiva sostituzione del tessuto granulare con tessuto fibroso e, dalla decima settimana in poi, ad un'ulteriore sostituzione di quest'ultimo da parte del tessuto tendineo. Anche la quantità di glicosamminoglicani diminuisce lentamente cambiando la propria distribuzione. In sostanza, durante quest'ultima terza fase si assiste ad un rimodellamento delle fibre collagene neoformate, fino a quando queste non formano una forte struttura permanente. La piena maturazione del collagene ed un totale riallineamento delle fibre richiedono di solito un periodo di almeno cinque-sei mesi, calcolato dall'inizio dell'evento lesivo. Tuttavia, nonostante questo grande processo di rimodellamento, il diametro e i cross-links delle fibre collagene saranno minori rispetto al normale dopo il processo di guarigione, infatti il tessuto cicatriziale che si forma è quasi sempre qualitativamente inferiore

dal punto di vista biomeccanico e quindi molto meno in grado di svolgere le funzioni di un normale tendine, ed è anche più suscettibile a ulteriori danni (54).

4.2 Il ruolo dei fattori di crescita nella riparazione del tessuto tendineo

I fattori di crescita (GF) rivestono un ruolo molto importante all'interno delle varie fasi del processo di riparazione del tendine, ruolo che è diversificato ovviamente in base al loro target di intervento specifico. I GF maggiormente studiati in quest'ambito sono il PDGF, il TGF β , il VEGF e il bFGF.

Il PDGF viene prodotto solamente per un breve periodo immediatamente dopo l'evento lesivo, e stimola la produzione di altri GF. Tuttavia, sembra che sia importante anche nella fase di rimodellamento tissutale: è stato infatti osservato che gioca un ruolo nella stimolazione della sintesi del collagene ma anche di altre proteine come pure nella sintesi del DNA, in maniera dose-dipendente (54).

Il ruolo preciso del TGF β nella guarigione del tendine non è chiaro, a causa della complessa interazione e delle molteplici citochine coinvolte nel processo di guarigione della ferita. È stata comunque evidenziata la sua importanza nella produzione di collagene, nell'angiogenesi, nel ripristino della superficie di scorrimento e persino nella formazione delle aderenze cicatriziali (55). Il TGF β , insieme al PDGF, è molto abbondante all'interno degli α -granuli piastrinici, e la sua attività è osservabile sin dalle prime fasi del processo di guarigione tendineo. Nei mammiferi sono presenti tre isoforme: TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3, che si legano a tre diversi recettori di membrana, ossia RI, RII e RIII. L'espressione del TGF β 1 mRNA nel tendine aumenta in modo assai cospicuo poco dopo l'insorgenza dell'evento lesivo, tanto da poter ipotizzare che uno dei suoi ruoli principali sia la regolazione della risposta infiammatoria iniziale susseguente al danno tissutale. Occorre ricordare che la capacità del TGF β 1 nel produrre collagene è stata messa in relazione anche alla possibilità di sviluppare fibrosi all'interno del tessuto di riparazione, sempre a questo proposito alcuni studi dimostrerebbero come l'equilibrio tra TGF β 1 ed il pool degli altri GF secreti dalle piastrine abbia un'importante implicazione terapeutica nel controllo dell'angiogenesi e della fibrosi (56). Il TGF β 2 agisce in modo molto simile al precedente mentre il TGF β 3 sembra mostrare la capacità di migliorare qualitativamente il tessuto cicatriziale. Tutte le tre isoforme influenzano la produzione di collagene di tipo I e III, tuttavia un aumento di concentrazione di TGF β non è correlato ad un conseguenziale incremento di produzione del collagene stesso (42). In maniera del tutto

simile agli altri GF, il TGF β agisce in modo dose-dipendente ed in stretta sinergia con gli altri GF.

Il VEGF, anche se ricopre un certo ruolo nella fase precoce di migrazione e proliferazione cellulare, è sostanzialmente più attivo dopo il processo di infiammazione, ossia durante le fasi di proliferazione e rimodellamento, nelle quali è un potente attivatore dei processi di angiogenesi. Numerose evidenze testimoniano l'importanza della carenza di ossigeno nella regolazione genica del VEGF sia in vitro che in vivo, rendendolo quindi l'unico mediatore angiogenico ipossia-dipendente (57). L'espressione del VEGF può essere influenzata, oltre che dallo stimolo ipossico, dall'interazione con altri GF, dalle interleuchine e dai processi di osteogenesi. Un incremento dei livelli di VEGF nel sito tendineo lesionato è correlato ad un ben definito pattern di crescita vascolare, che procede dall'epitenonio e dalla rete vascolare intra-tendinea verso il sito di riparazione tissutale, apportando cellule, nutrienti e GF all'area in via di riparazione.

Il bFGF è un efficace stimolatore dell'angiogenesi, della migrazione e della proliferazione cellulare, effetti confermati dalle sperimentazioni sia in vitro che in vivo (58). È stato dimostrato infatti che sia i tenociti che la guaina sinoviale sono in grado di produrre bFGF; inoltre l'attività del bFGF mRNA è in uno stato di up-regulation nell'ambito del sito della lesione tendinea. In aggiunta, altri studi suggeriscono che il bFGF, nelle fasi iniziali del processo di riparazione tendinea, potrebbe regolare l'espressione di geni che codificano per la produzione di collagene di tipo III, molto importante in quanto stabilizza il processo di riparazione stesso (59).

4.3 Terapie attuali

Nonostante l'abbondanza di opzioni terapeutiche, sono stati condotti pochissimi studi prospettici randomizzati controllati con placebo, per aiutare i medici nella scelta del miglior trattamento evidence-based (60). Di seguito si riportano le principali terapie utilizzate, cercando di analizzarne i vantaggi e i punti deboli.

Tutti i vari trattamenti esistenti per la cura delle tendinopatie possono essere suddivisi in trattamenti conservativi, trattamenti non conservativi e altri trattamenti più recenti e all'avanguardia come la terapia tramite iniezioni con fattori di crescita e la terapia genica. Si parlerà infine anche della terapia oggetto del nostro studio, la quale utilizza le iniezioni di frazione vascolo-stromale nell'ambito del sito lesionato per indurre una riparazione del

tessuto tendineo in modo che quest'ultimo mantenga il più possibile le sue caratteristiche iniziali.

4.3.1 Trattamenti conservativi

Tra i numerosi trattamenti conservativi si annovera il protocollo di potenziamento eccentrico, definito come la contrazione di un muscolo mentre lo si allunga, per esempio come avviene nel muscolo tricipite della sura durante l'appoggio del piede al suolo mentre si cammina. I primi esercizi di questo tipo furono proposti da Stanish e colleghi negli anni '80: veniva previsto un programma di allenamento con potenziamento eccentrico associato a esercizi di stretching statico; successivamente Alfredson e colleghi negli anni '90 hanno proposto un altro protocollo che comprendeva solamente il potenziamento eccentrico. Uno studio suggerisce che il primo sembra essere quello che ha dimostrato la maggior efficacia per la gestione dei pazienti con tendinopatia dell'Achilleo e del tendine rotuleo (61).

Gli esercizi eccentrici sono stati proposti per promuovere la formazione di legami crociati nelle fibre di collagene all'interno del tendine, facilitando così il rimodellamento dello stesso. Il concetto di esercizi eccentrici si basa sull'adattamento strutturale delle unità muscolo-tendinee per proteggerle da stress maggiori e quindi prevenire una nuova lesione.

I principi di base in un regime di carico eccentrico sono la lunghezza del tendine, il carico e la velocità. Se il tendine è pre-allungato, la sua lunghezza di riposo aumenta e durante il movimento sarà meno sotto sforzo. Aumentando progressivamente il carico esercitato sul tendine, dovrebbe esserci un conseguente aumento della sua forza intrinseca. Aumentando la velocità di contrazione, si svilupperà una forza maggiore. Tuttavia, è ancora aperto il dibattito su come dovrebbe essere progettato il programma di esercizi: non è ancora chiaro se debba contenere solo esercizi eccentrici (o esercizi concentrici / eccentrici o una combinazione di esercizi), se sia accettabile provare dolore durante e dopo l'esercizio fisico, il numero ottimale di ripetizioni in ciascuna sessione e la frequenza ottimale delle sessioni settimanali (62). Comunque, la tendenza generale suggerisce un effetto positivo degli esercizi eccentrici, senza effetti avversi segnalati (63).

All'interno dei trattamenti conservativi si classifica anche la laserterapia, caratterizzata dall'uso non invasivo dell'energia laser per generare una risposta fotochimica nei tessuti del corpo che hanno una disfunzione o sono danneggiati. In generale, serve ad alleviare il dolore, ridurre le infiammazioni e accelerare il recupero di una vasta gamma di patologie acute e

croniche. Il suo punto di forza è quello di favorire in tempi relativamente brevi (rispetto ad altre forme di terapia) il miglioramento delle funzioni e della mobilità. Il principio base della terapia è quello di “bombardare” con i fotoni il tessuto corporeo, eccitando le cellule con conseguente aumento della circolazione sanguigna nella zona lesa e provocando infine la riduzione del dolore. Durante il trattamento si percepisce una sensazione piacevole di calore che stimola l’organismo ad attivare un processo di autoguarigione. Grazie all’attività cellulare infatti, tale processo continua a ridurre l’infiammazione e il dolore per un massimo di 24 ore dopo il trattamento. Dagli anni ’80 ad oggi un certo numero di trials clinici controllati randomizzati sono stati eseguiti con laserterapia a basse dosi per trattare una varietà di condizioni caratterizzate da dolore muscoloscheletrico e neurogenico. Tuttavia, la maggior parte dei trials non è riuscita a fornire risultati positivi al riguardo (64). Altri studi, però, hanno suggerito che la laserterapia a basse dosi ha un’azione biologica degna di nota sul tessuto tendineo se usata con densità di potenza e dose entro un intervallo ottimale suggerito: esiste una correlazione molto significativa tra l’intervallo ottimale suggerito e un risultato di trattamento efficace per la tendinite subacuta. Sempre nello stesso studio si parla di come una procedura di trattamento ottimale comprenda l’esposizione al laser sulla pelle direttamente al di sopra del tendine ferito ogni giorno o ogni due giorni per almeno 2-4 settimane. La dose di trattamento e la densità di potenza devono essere differenziate per varie posizioni dei tendini in base al tipo di laser, alla distanza dalla superficie della pelle e al volume del tessuto lesionato (65). In conclusione, quindi, nonostante la laserterapia possa fornire vantaggi quali evitare la somministrazione di farmaci e ridurre l’infiammazione e il dolore, soprattutto se associata ad esercizi come quelli nominati sopra, non bisogna dimenticare che i risultati dei trials clinici sono ancora troppo disomogenei per essere presi in considerazione, inoltre l’infiammazione e il dolore, su cui questa terapia va ad agire, sono spesso assenti nelle tendinopatie croniche da overuse.

Ancora, un’altra opzione di trattamento è la terapia a onde d’urto (SWT: shock-wave therapy), diventata popolare nell’ultimo decennio per vari disturbi dei tessuti molli, tra cui la tendinopatia calcifica della cuffia dei rotatori, l’epicondilisi omerale, la fascite plantare e la tendinopatia di Achille. Tuttavia, i risultati di questo trattamento sono stati contrastanti. Le onde d’urto sono onde acustiche associate a un improvviso aumento della pressione: possono essere generate da dispositivi elettroidraulici, piezoelettrici ed elettromagnetici. La quantità di energia rilasciata dall’impulso sonico per area quadrata è espressa come densità

del flusso di energia in mJ/mm. Lo scopo del suo utilizzo in clinica è la stimolazione della guarigione dei tessuti molli e l'inibizione dei recettori del dolore. La SWT è stata studiata a fondo dal punto di vista sperimentale negli ultimi anni. Nessuna prova definitiva supporta l'uso di SWT ripetitiva a bassa energia (che non richiede anestesia locale) o SWT ad alta energia (che richiede anestesia locale o regionale) (62). La SWT a bassa energia e gli esercizi eccentrici hanno mostrato risultati comparabili in un trial controllato randomizzato per quanto riguarda la gestione della tendinopatia di Achille ed entrambe le modalità di gestione hanno mostrato risultati superiori a una politica di attesa. Inoltre, si è visto che l'uso combinato della SWT a bassa energia e degli esercizi eccentrici è vantaggioso (66). Tuttavia, anche questo tipo di terapia ha un meccanismo d'azione non del tutto chiaro, per di più i protocolli per l'applicazione di queste metodiche non sono standardizzati.

4.3.2 Trattamenti chirurgici

Tra i trattamenti non conservativi si trova sicuramente la chirurgia. Generalmente questa opzione terapeutica è offerta a quei pazienti che sono risultati resistenti a un periodo prolungato di trattamento conservativo. La patologia può essere affrontata con percorsi in open, percutanei ed endoscopici. L'approccio open rimane il più comune dei tre, ma c'è stato un recente aumento delle evidenze anche sugli approcci percutanei ed endoscopici, con l'aumento a livello mondiale delle procedure ortopediche minimamente invasive. L'approccio open consente una buona visualizzazione del campo operatorio e consente al chirurgo di trattare concomitanti patologie articolari. La chirurgia mira ad eliminare le aderenze fibrotiche, rimuovere le aree di guarigione fallita e fare più incisioni longitudinali nel tendine per rilevare lesioni intratendinee, ripristinare la vascolarizzazione e possibilmente stimolare le rimanenti cellule vitali per favorire la risposta della matrice cellulare e la guarigione (62). Studi recenti mostrano che più tenotomie longitudinali innescano la neoangiogenesi a livello del tendine di Achille, con un aumento del flusso sanguigno (67). Ciò comporterebbe un miglioramento della nutrizione e un ambiente più favorevole per la guarigione. Tenotomie longitudinali percutanee multiple possono essere eseguite in caso di fallimento della gestione conservativa in pazienti con tendinopatia isolata senza coinvolgimento del paratenonio, possibilmente la procedura deve essere eco-guidata per confermare la posizione precisa dell'area della tendinopatia (68). È una manovra semplice, e può essere eseguita in clinica in anestesia locale. Ciò nonostante, bisogna comunque far attenzione poiché si tratta di una

procedura chirurgica e come tale, anche se miniminvasiva, non è scevra da rischi.

4.3.3 Infiltrazioni di corticosteroidi e PRP

Le iniezioni locali di corticosteroidi sono una delle opzioni terapeutiche più diffuse, anche se il meccanismo preciso non è ben compreso. I meccanismi terapeutici proposti includono effetti antinfiammatori, influenza del metabolismo dei tessuti locali, rilassamento dello spasmo muscolare riflesso, sollievo dal dolore, miglioramento meccanico ed effetto placebo. Studi sugli animali hanno suggerito che le iniezioni di corticosteroidi locali possono portare a una riduzione della forza del tendine (69), ma questa scoperta non è universale. Smidt e colleghi hanno condotto una meta-analisi che mostra che, per esiti a breve termine (circa 6 settimane), sono state riscontrate differenze statisticamente significative e clinicamente rilevanti sul dolore, sulla forza di presa e sul miglioramento globale per l'iniezione di corticosteroidi rispetto al placebo, anestetico locale e trattamenti conservativi. Per esiti intermedi (da 6 settimane a 6 mesi) e per quelli a lungo termine (più di 6 mesi), non sono stati raggiunti risultati statisticamente significativi o clinicamente rilevanti a favore delle iniezioni di corticosteroidi (70). Riassumendo quindi, anche se con le iniezioni di corticosteroidi si ottiene un sollievo dal dolore abbastanza rapido e un aumento delle funzionalità in un primo momento (e comunque i dati anche su questo sono contrastanti), in cronico in ogni caso non producono miglioramenti significativi nelle tendinopatie, anzi è stato studiato che ci potrebbe essere un rischio aumentato di rottura tendinea (71).

Tra le terapie che utilizzano fattori di crescita si annoverano le infiltrazioni con plasma ricco di piastrine (PRP), un componente bioattivo del sangue intero che è ora ampiamente testato in diversi campi della medicina. Gli elementi specifici del PRP non sono stati definiti in modo uniforme in letteratura. Il PRP, in generale, ha una maggiore concentrazione di piastrine rispetto al sangue di base: i preparati PRP valutabili clinicamente in genere contengono 1 milione di piastrine o più per microlitro (72). Le terapie a base di piastrine cercano di migliorare il processo di riparazione dei tessuti attraverso la liberazione di agenti bioattivi (come TGF β , PDGF) per fornire risposte chemiotattiche, proliferative e anaboliche cellulari. Esistono attualmente diversi sistemi disponibili in commercio per produrre un "plasma ricco di piastrine" o "gel piastrinico" da sangue autologo. Questi sistemi comportano la filatura di sangue autologo in una centrifuga per formare una matrice di fibrina densa e suturabile che può essere facilmente posizionata direttamente nel sito di riparazione del tendine (62). L'uso

del PRP nella chirurgia ortopedica è iniziato nel corso dell'ultimo decennio, in particolare per favorire la rigenerazione ossea nell'ambito degli innesti, quando questi ultimi vengono utilizzati a causa di una perdita di tessuto osseo. L'uso del PRP per favorire la guarigione dei tendini, invece, è cominciato solo relativamente di recente.

Studi in vitro hanno visto che il PRP può migliorare la proliferazione di cellule staminali stromali e mesenchimali umane (73). Al contrario, Woodall e colleghi hanno studiato che il PRP sopprime la proliferazione dei macrofagi e la produzione di IL-1 entro le prime 72 ore dall'esposizione (74,75). Questa induzione differenziale delle cellule ha importanti implicazioni per la guarigione dei tendini e dei muscoli. Il PRP può inizialmente inibire l'eccessiva infiammazione, mentre stimola la proliferazione e la maturazione. Ciò può essere particolarmente importante nel prevenire la guarigione del tessuto cicatriziale fibroso mediata dai macrofagi.

Tuttavia, attualmente, esistono prove limitate che le iniezioni di PRP migliorino il dolore e/o la funzione nelle tendinopatie croniche, senza contare che ci sono ancora molte domande senza risposta in questo campo. Infatti, sono state condotte poche ricerche sulla quantità di fattori di crescita prodotti utilizzando diversi sistemi di separazione cellulare e su quale sarebbe la miscela ottimale; inoltre non è chiaro quale sia il volume e la frequenza migliori delle iniezioni; infine quando si considerano più iniezioni, il periodo ideale che dovrebbe intercorrere non è noto. È anche incerto se sia necessaria l'attivazione piastrinica prima dell'iniezione, poiché il contatto con il collagene porterebbe anche alla degranulazione piastrinica (62).

4.3.4 Terapia genica

Oltre all'applicazione diretta, i fattori di crescita possono essere inviati al sito della lesione tramite terapia genica. Il gene è incorporato in cellule lese, che iniziano la produzione del fattore di crescita. Di conseguenza, l'esposizione al fattore di crescita non è più limitata dalla presenza del fattore di crescita stesso, ma piuttosto dipende dalla sopravvivenza delle cellule. La terapia genica è quindi in grado di fornire un'esposizione più prolungata ai fattori di crescita. La presenza genica è stata rilevata fino a 75 giorni dopo la trasfezione, il che è più vantaggioso vista la lunga scala temporale della guarigione del tendine (76).

Vettori come adenovirus, liposomi cationici, virus adeno-associato e virus emoagglutinante dei complessi liposomi-giapponesi sono stati usati per ottenere il trasferimento genico alle

cellule tendinee (77,78). I vettori non virali come i liposomi sono meno patogeni, in quanto non contengono proteine virali. Tuttavia, il trasferimento genico mediante liposomi è meno efficiente rispetto ai vettori virali (79). I vettori virali consentono l'inserimento di geni nelle cellule che hanno cessato di dividersi, e questa caratteristica è particolarmente utile per il tendine poiché i tenociti non si dividono attivamente.

Il trasferimento genico mediante vettori può essere ottenuto tramite una tecnica in vivo o ex vivo. Il trasferimento in vivo comporta l'applicazione diretta del gene al tessuto ricevente, mentre nella tecnica ex vivo le cellule bersaglio vengono rimosse dal corpo prima di eseguire il trasferimento genico in laboratorio: una volta raggiunta la trasfezione corretta, le cellule vengono trasferite nuovamente nel corpo. La trasfezione in vivo è meno invasiva e tecnicamente più semplice e il trattamento può essere iniziato durante la fase acuta della lesione; lo svantaggio del trasferimento in vivo è l'infezione non specifica delle cellule adiacenti al sito della lesione. Inoltre, il successo del trasferimento genico non può essere confermato e, in aree con relativa scarsità cellulare, solo alcune cellule possono essere trasfettate. Per la trasfezione ex vivo è necessario più tempo, ma si evita la complicità della trasfezione non specifica, inoltre si riesce a confermare se la trasfezione è riuscita e è possibile anche l'espansione in vitro delle cellule se necessario.

Numerosi studi sugli animali hanno indagato la fattibilità del trasferimento genico ai tendini. Wang e colleghi hanno dimostrato che il gene per il fattore base di crescita dei fibroblasti (bFGF) può essere trasferito in vitro ai tenociti intra-sinoviali del ratto (80). L'espressione del gene bFGF era aumentata in modo significativo per le tre settimane successive alla trasfezione. Il virus 2 adeno-associato è risultato essere un vettore più efficiente del plasmide, sebbene altri sierotipi del virus adeno-associato fossero inefficaci per la trasduzione genica verso i tenociti. La terapia genica può essere utilizzata per manipolare l'ambiente di guarigione per 8-10 settimane. In ogni caso, anche se molti geni possono rivelarsi utili per la guarigione dei tendini, sono necessarie ulteriori ricerche per stabilire i geni più vantaggiosi da trasferire. Anche il metodo e la tempistica ottimali del trasferimento genico devono essere chiariti (76).

Per concludere, è necessario sottolineare comunque che in generale le terapie conservative e anche la chirurgia non sono terapie rigenerative, per cui il tessuto che si forma durante il processo riparativo è spesso fibroso, e non conserva le caratteristiche di forza tensile e resistenza tipiche del tendine. Per quel che riguarda invece la terapia con i fattori di crescita e la terapia genica sono soluzioni sicuramente più costose e forse per questo meno applicabili.

CAPITOLO 5

Il ruolo della medicina rigenerativa nelle patologie muscoloscheletriche

Le malattie muscoloscheletriche sono una condizione abbastanza comune, e all'interno di questo gruppo distinguiamo oltre 150 diverse patologie. Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità, questi disturbi sono la causa più comune di dolore severo a lungo termine e disabilità fisica. Con l'invecchiamento della popolazione, l'incidenza della malattia muscoloscheletrica è in aumento e sarà sempre più un significativo onere economico per la società (81).

A causa della natura complessa di queste condizioni, generalmente le opzioni di trattamento sono limitate alla gestione dei sintomi, piuttosto che alla prevenzione e alla cura. Pertanto, è urgente la necessità di sviluppare approcci terapeutici nuovi ed efficaci per queste patologie disabilitanti legate all'età. In questo contesto, sono stati fatti passi da gigante nelle terapie rigenerative grazie alla tecnologia delle cellule staminali. Più in dettaglio, ricerche recenti hanno ampiamente dimostrato il potenziale delle cellule staminali mesenchimali (MSC), una classe di cellule staminali stromali multipotenti, per la medicina riparativa/rigenerativa anche nel sistema muscolo-scheletrico (82).

5.1 Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono cellule staminali multipotenti adulte in grado di differenziarsi in cellule appartenenti a tessuti di origine mesenchimale [FIG 13]. Inizialmente osservate nel midollo osseo dal patologo Cohnheim nel 1867, sono state successivamente trovate anche in altri tessuti: sangue periferico, muscolo scheletrico, polpa dentale, placenta, cordone ombelicale, liquido amniotico, membrana sinoviale, periostio e altri, compreso il tessuto adiposo. C'è molta confusione in letteratura riguardo alla loro definizione e alla loro caratterizzazione. Vengono definite Connective Tissue Progenitors (CTPs) l'insieme di cellule staminali adulte e cellule progenitrici nel tessuto nativo (83). Il termine CTP ammette che queste cellule presenti nel tessuto non siano una popolazione uniforme e fino a quando una dettagliata caratterizzazione non sarà ottenuta, i CTP possono essere rilevati solo dalla loro capacità di proliferare e formare una colonia su una superficie 2D o su un medium 3D (84,85).

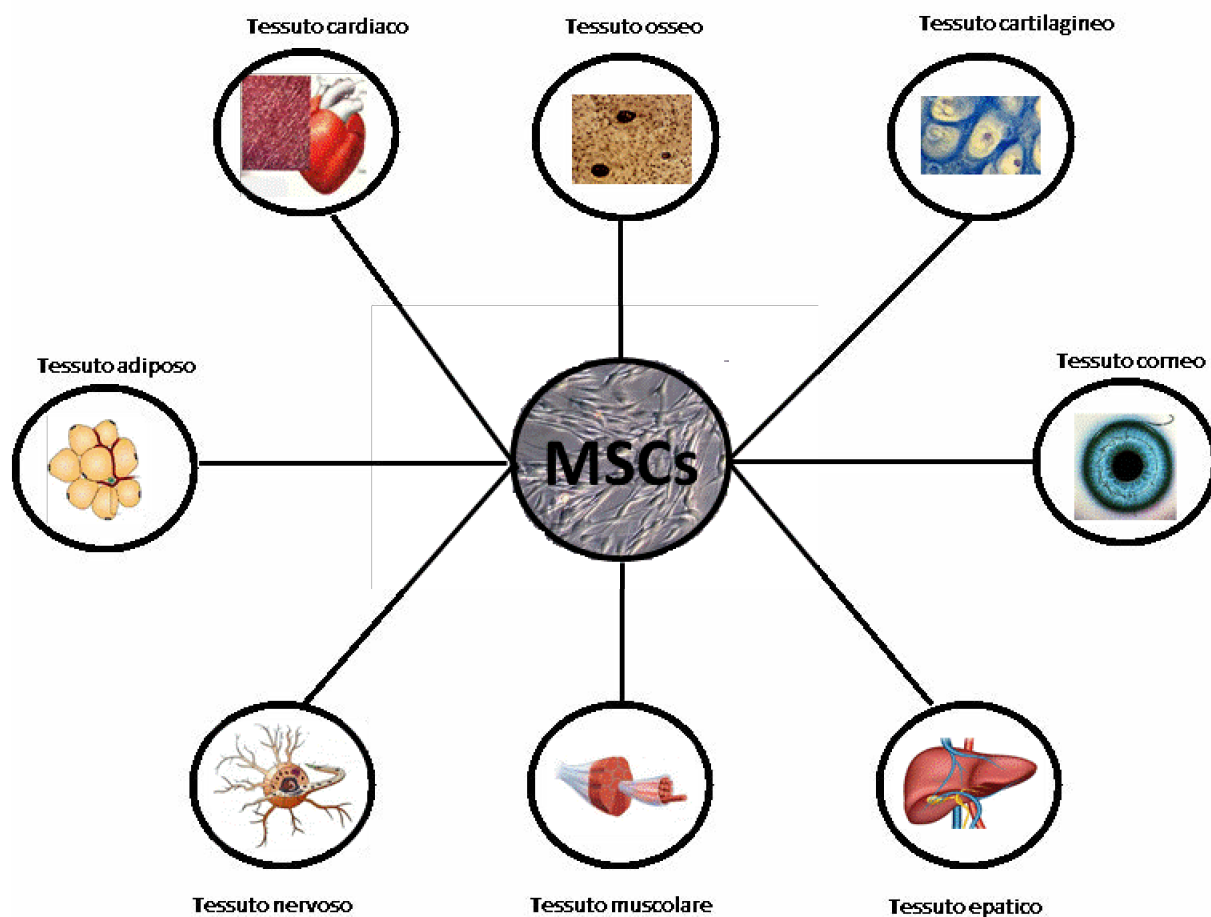


Figura 13 Differenziazione delle cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Invece le cellule espansive in coltura differiscono dalle cellule native. L'espansione colturale fornisce una popolazione cellulare più omogenea oltre che un maggior numero di cellule e solo queste ultime rientrano nella categoria delle cellule staminali mesenchimali (83). Per tentare di dare un'unica definizione di MSC la International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha definito dei criteri minimi di caratterizzazione di queste cellule.

Per essere considerate tali devono avere le seguenti tre caratteristiche:

1. Aderenza alla superficie di plastica in condizioni di coltura cellulare standard;
2. Espressione sulla superficie cellulare di markers come CD90, CD73, e CD105, e la mancanza di espressione di CD14, CD34, CD45, CD79, o CD19 e HLADR63. Questo permettere l'esclusione di cellule staminali ematopoietiche che potrebbero contaminare la coltura di MSC;
3. Capacità di differenziazione delle cellule nella linea mesenchimale.

Nonostante abbiano queste comuni caratteristiche le MSC provenienti dai vari tessuti differiscono

in termini di potenziale replicativo, potenziale differenziativo ed espressione di CD. Inoltre, i marcatori di superficie variano da donatore a donatore e vi è eterogeneità persino all'interno della stessa popolazione cellulare. Il profilo di superficie è alterato anche dal prelievo delle MSC dalla loro nicchia in vivo e dalla coltura stessa (86). Il loro isolamento, la loro capacità differenziativa e altre caratteristiche come la produzione di molecole immunomodulatorie ha reso possibile l'utilizzo di queste cellule in campi come la medicina rigenerativa, l'ingegneria tissutale e come terapia immunomodulante di patologie autoimmuni o immuno-correlate (87,88,89).

5.2 Cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo (ASCs)

Le cellule staminali mesenchimali più conosciute in campo scientifico sono ottenute da midollo osseo. Anche se sono state individuate ed isolate da molti tessuti, alcuni di questi sono nella pratica scarsamente utilizzabili per la loro limitata accessibilità (es. membrana sinoviale), per l'esiguità del campione che consentono di prelevare (es. periostio) e per la bassa percentuale di cellule staminali presenti nel tessuto. In questi termini il tessuto adiposo è, senza dubbio, una matrice d'elezione in quanto facilmente accessibile e quasi sempre sovrabbondante.

Il tessuto adiposo è popolato da una quantità di cellule staminali mesenchimali tutt'altro che irrilevante: in letteratura si parla di 3 cellule ogni 100 della frazione vasculo-stromale, a fronte di 1 cellula ogni 100.000 nel midollo osseo (90). In un primo lavoro di Zuk et al. (91) veniva dimostrato come cellule isolate dal tessuto adiposo di topo e poste in coltura mostrassero una spiccata attitudine ad aderire al substrato colturale proliferando in modo eccezionale e, se indotte a farlo con l'impiego di opportuni medium di crescita, andando incontro a differenziazione in cellule mature della linea mesodermica (differenziazione osteogenica, condrogenica, adipogenica, miogenica).

Il processo di differenziamento adipocitario, o adipogenesi, è il meccanismo di formazione del tessuto adiposo a partire da cellule mesenchimali indifferenziate. Per azione del fattore di trascrizione PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma, recettore gamma attivante la proliferazione dei perossisomi) diventano adipoblasti e poi pre-adipociti. Questi ultimi proliferano e si differenziano in adipociti, che iniziano ad accumulare goccioline lipidiche. Nel differenziamento, dedifferenziamento, transdifferenziamento e apoptosi/necrosi, il numero di preadipociti e adipociti all'interno del tessuto adiposo si trova in uno stato di equilibrio dinamico, in risposta allo stato nutrizionale, a modifiche ambientali, alla gravidanza e

all'allattamento, alle terapie farmacologiche e alla quantità di lipidi contenuta nelle cellule.

5.3 Applicazioni delle ASCs nella rigenerazione muscoloscheletrica

5.3.1 Rigenerazione del tessuto cartilagineo

La riparazione della cartilagine rappresenta una grande sfida a causa della limitata capacità intrinseca di riparo del tessuto stesso. Fino ad ora, l'unica terapia a base cellulare approvata per il ripristino della cartilagine si basa sull'impianto di condrociti autologhi dopo espansione in vitro (92). Nonostante i promettenti risultati iniziali, la limitata espansione dei condrociti ex vivo e la morbidità del sito donatore limitano gli effetti benefici di questa tecnica. Recentemente, le ASCs stanno emergendo come una fonte meno invasiva di progenitori che possono essere differenziati in condrociti in vitro, in presenza di fattori di crescita (superfamiglia TGF- β) (93) e quindi impiantati per ripristinare il tessuto cartilagineo (94). Questi dati suggeriscono, quindi, che una minima manipolazione ex vivo delle ASCs, grazie alla capacità intrinseca di queste cellule di adattarsi al loro ambiente in vivo, potrebbe consentire lo sviluppo di un trattamento clinico semplice ed efficace per ripristinare i difetti della cartilagine.

5.3.2 Ricostruzione del tessuto osseo

L'innesto osseo è ampiamente utilizzato in una vasta gamma di procedure chirurgiche ortopediche, orali, e dentali (95). Tuttavia, l'uso dell'autotrapianto osseo è spesso associato a comorbidità e scarse proprietà rigenerative. Sforzi di ricerca nel campo dell'ortopedia sono stati diretti a migliorare i trattamenti per la ricostruzione dei difetti ossei, tra cui traumi, tumori, infezioni. Queste ricerche hanno portato allo sviluppo di trattamenti migliorati con una forte potenza osteogenica, come le proteine morfogenetiche ossee ricombinanti (BMP). Le BMP inducono e promuovono fasi critiche della formazione ossea principalmente endocondrale e sono state approvate per l'uso clinico nelle fratture delle ossa lunghe gravemente compromesse. Tuttavia, la tecnologia BMP presenta alcune limitazioni terapeutiche quando il microambiente è inficiato da una vascolarizzazione scarsa o assente (79). Pertanto, per migliorare l'efficacia terapeutica di questo metodo, la somministrazione di BMP è stata applicata con successo insieme a biomateriali e cellule staminali (96). A questo proposito, le ASCs, grazie al loro potenziale osteogenico, si sono dimostrate buone candidate sia in vitro che in vivo (97). Inoltre, prove crescenti indicano che le sole ASCs, in assenza di fattori di crescita esogeni,

sono in grado di ripristinare i difetti ossei. In particolare, è stato dimostrato che il trapianto di ASCs potrebbe rappresentare una buona opzione terapeutica per il trattamento dei difetti craniofacciali (98).

In conclusione, i promettenti risultati ottenuti con le ASCs nelle ricostruzioni dei difetti ossei suggeriscono che la terapia cellulare rappresenta un'alternativa interessante ai trattamenti tradizionali come l'osteotomia e la sostituzione totale dell'articolazione e forniscono un metodo relativamente semplice di ricostruzione ossea autologa con scarsa morbidità del sito donatore.

5.3.3 Osteoartrosi e artriti

Le artriti, come ad esempio l'artrite reumatoide, sono patologie autoimmuni sistemiche e disabilitanti caratterizzate da infiammazione cronica delle articolazioni ed erosione ossea. Il processo cruciale che scatena l'artrite è l'attivazione anormale di cellule dendritiche, cellule T, cellule B, macrofagi e neutrofili. Gli attuali trattamenti per queste malattie sono principalmente indirizzati alla gestione dei sintomi e dell'infiammazione, non esiste invece un trattamento che risolva definitivamente l'artrite. Alcuni studi hanno focalizzato la loro attenzione su un approccio basato sulla terapia cellulare, tenendo conto che si tratta di un difetto sistemico, diversamente dai difetti articolari focali e dal processo patologico sottostante. In questo contesto, le MSC, come accennato in precedenza, possiedono una capacità immunoregolatoria e suscitano effetti immunosoppressori, che possono essere utilizzati per diverse malattie autoimmuni, tra cui le artriti (79). Studi in vitro su MSC derivanti dal cordone ombelicale hanno dimostrato un effetto antiproliferativo sui sinoviociti, attori chiave nell'infiammazione e distruzione articolare nell'artrite reumatoide. Questo effetto è stato mediato dal rilascio di IL-10, 1-metil-DLtriptofano, TGF- β 1 e dalla down-regolazione della metalloproteasi mista 9 (99). Questi risultati sono in linea con gli studi in vivo su un modello di roditori per artrite, in cui l'iniezione sistemica di ASCs ha ridotto i livelli di citochine e chemochine infiammatorie e il rapporto tra le cellule Th1/Th17. Inoltre, il trapianto ADSC è stato in grado di aumentare la produzione dell'IL-10 antinfiammatoria nei linfonodi e nelle articolazioni e la generazione de novo di cellule Treg specifiche per l'antigene (100).

Pertanto, la raccolta di questi dati suggerisce che le ASCs potrebbero migliorare la patogenesi dell'artrite, diminuendo la produzione di citochine infiammatorie e attivando le cellule Treg. Tuttavia, sono stati riportati dati contraddittori nel modello di artrite spontanea indotta da

adiuvante, in cui le MSC erano efficaci solo quando iniettate prima dell'insorgenza della malattia (101). Pertanto, la funzione antinfiammatoria delle cellule staminali può essere efficace nel prevenire o ritardare l'artrite se somministrata nelle prime fasi del processo patologico. Sono necessarie indagini più convincenti per migliorare il targeting specifico e la conservazione delle MSC sulla superficie della cartilagine al fine di massimizzare il loro potenziale effetto (79).

5.3.4 Malattie muscolari

Le distrofie muscolari sono un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di disturbi caratterizzati da degenerazione progressiva e perdita di muscoli scheletrici. Il muscolo scheletrico adulto ha il potenziale per rigenerare nuove fibre muscolari attivando una popolazione di precursori mononucleati, che altrimenti rimarrebbero in uno stato quiescente e non proliferativo (102). Tuttavia, la degenerazione muscolare continua e graduale nelle distrofie muscolari progressive porta all'esaurimento delle cellule satelliti e, di conseguenza, si perde la capacità di ripristinare il muscolo scheletrico (103). La distrofia muscolare di Duchenne (DMD), una malattia letale legata all'X che colpisce 1 su 3-4000 nascite maschili, è la forma più diffusa di distrofia muscolare. In caso di lesione muscolare, le cellule satelliti muscolari vengono attivate per diventare cellule precursori miogeniche, che poi si dividono e si fondono per riparare il muscolo danneggiato (104). Tuttavia, le cellule satellite muscolari mature rappresentano l'1-5% delle cellule muscolari totali e il loro potenziale di auto-rinnovamento diminuisce con l'età (105). Nella DMD, l'intensa degenerazione che si verifica nella fibra muscolare esaurisce la capacità delle cellule satelliti di proliferare e sostituire le fibre danneggiate.

I primi sforzi con il trasferimento di mioblasti hanno dimostrato benefici a breve termine, ma alla fine sono stati limitati da una scarsa sopravvivenza cellulare, rigetto immunitario e scarsa migrazione delle cellule trapiantate. È stata poi sviluppata una strategia per il trattamento delle malattie muscolari ripristinando i livelli di distrofina nei pazienti con DMD mediante terapie cellulari. Quelle terapie a base cellulare che possono reintegrare l'offerta esaurita di cellule satelliti possono essere particolarmente adatte per prevenire questo declino. Numerosi gruppi hanno dimostrato che le ASCs sono in grado di differenziarsi in più linee cellulari, compresi i miociti, in presenza di un mezzo di induzione linea-specifico (106).

Esistono due ipotesi sul contributo delle ASCs alla rigenerazione muscolare: generazione

de novo di cellule specifiche del muscolo da ASCs, e modifica nell'espressione genica dopo fusione diretta delle ASCs con cellule ospiti. Nel primo studio in vivo riportato da Bacou (107), le ASCs sono state iniettate nel muscolo tibiale anteriore dei conigli a seguito di una lesione indotta da cardiotossina. Sebbene questo studio avesse dato risultati statisticamente significativi, i miglioramenti clinicamente evidenti erano incerti. Si è visto anche che le ASCs allogeniche iniettate per via endovenosa o direttamente nel muscolo interessato potrebbero ripristinare la funzione muscolare in un modello di distrofia muscolare murina senza segni di rigetto immunitario (108). Sebbene la dimostrazione che le ASCs abbiano un potenziale miogenico sia in vitro che in vivo è promettente, non è ancora chiaro se le ASCs si differenziano direttamente in cellule miogeniche o se vengono incorporate nelle fibre muscolari attraverso la fusione cellulare (109). Tuttavia, sono necessari ulteriori lavori per stabilire i metodi necessari per trattare queste malattie progressivamente degenerative.

5.3.5 Tendinopatie

Le lesioni a carico dei tendini sono spesso associate a disfunzione e disabilità significative, a causa della limitata capacità di autoriparazione e della propensione alla formazione di cicatrici da parte del tessuto tendineo. Nonostante i miglioramenti nel trattamento convenzionale, come il trapianto, i risultati clinici nel trattamento del tendine sono ancora variabili. Inoltre, l'uso di allotrapianto può portare a risposta immunitaria e rigetto (110) e l'uso di autotrapianti è correlato alla morbidità del sito donatore (111). Pertanto, sono state ideate nuove strategie, come le tecniche di ingegneria dei tessuti. Considerando il fatto che i fibroblasti sono coinvolti nella guarigione dei tendini producendo collagene, in uno studio pilota sull'uomo, i fibroblasti cutanei autologhi espansi ex vivo sono stati usati con successo per l'epicondilite del gomito laterale refrattaria (112). Recentemente, con la progressione nell'identificazione delle caratteristiche delle MSC, è stata proposta una tecnica di ingegneria tissutale basata su queste cellule per migliorare la guarigione dei tendini. In un modello sperimentale di ratto con difetti del tendine rotuleo, l'iniezione di cellule stromali del midollo osseo in una matrice di fibrina liquida ha stimolato dal punto di vista istologico, ultrastrutturale, molecolare e biomeccanico la guarigione del tendine rotuleo, mentre l'iniezione di fibroblasti nella matrice di fibrina ha avuto effetti minori (113). In un altro studio su un modello murino di tendine di Achille danneggiato, in cui è stata distrutta l'entesi (giunzione tendine-osso), l'effetto dei condrociti o delle MSC del midollo osseo è stato confrontato con i ratti non trattati: il gruppo

trattato con MSC del midollo osseo ha mostrato un'entesi molto simile allo stato premorboso (114). Risultati simili sono stati ottenuti nei conigli sottoposti a riparazione del legamento crociato anteriore (115). Questi studi supportano l'applicazione di terapie a base cellulare per la rigenerazione dei tessuti tendinei. Tuttavia, queste strategie sono state studiate solo in ambito preclinici e il ruolo delle cellule staminali deve ancora essere confermato.

5.4 Tecniche di processazione del lipoaspirato e tecniche di isolamento delle ASCs

Le ASCs vennero isolate per la prima volta nel 1964 da Rodbell (116) da un cuscinetto di grasso epididimale prelevato da ratto. Il metodo prevedeva un iniziale partizionamento del grasso in piccoli pezzetti e una sua successiva digestione con collagenasi di tipo I a 37°C separando successivamente i componenti cellulari tramite diverse centrifughe. Il supernatante conteneva gli adipociti maturi, mentre il pellet conteneva le componenti della SVF tra cui vi erano le ASCs.

La SVF è una miscela eterogenea di cellule isolate per dissociazione enzimatica o non enzimatica del tessuto adiposo seguita da centrifugazione per rimuovere gli adipociti differenziati, che galleggiano sullo strato acquoso. La popolazione eterogenea della SVF comprende cellule endoteliali, eritrociti, fibroblasti, linfociti, monociti / macrofagi e periciti tra gli altri, ma soprattutto ASCs. Il numero di cellule della SVF che può essere isolato da un lipoaspirato varia da 500.000 a 2 milioni di cellule per grammo di tessuto adiposo. Dal momento che la percentuale di cellule mesenchimali all'interno della SVF vanno dall' 1 al 10%, si può quindi affermare che da 1 ml di lipoaspirato è possibile isolare da 50.000 fino a 500.000 cellule mesenchimali.

Alcuni studi hanno riportato che il tessuto adiposo aspirato contiene un numero inferiore di ASCs rispetto al tessuto adiposo intatto (117), e molti più adipociti e cellule non vitali (118). Il ridotto numero di ASCs nel tessuto adiposo aspirato potrebbe principalmente dipendere da due motivi:

- a) la quantità prevalente delle ASCs non è aspirata durante la procedura chirurgica poiché le cellule sono localizzate attorno ai vasi nella tonaca avventizia;
- b) alcune ASCs sono rilasciate nella porzione fluida del lipoaspirato (119).

I vasi sanguigni sono presenti nella parte fibrosa del tessuto intatto e non in quello aspirato, pertanto il tessuto adiposo aspirato confrontato con il tessuto intatto è considerato una fonte di ASCs meno ricca di progenitori multipotenti. Il materiale ottenuto mediante aspirazione

contiene cellule vitali e può essere utilizzato direttamente per l'applicazione terapeutica o per l'isolamento cellulare (120), mentre il tessuto prelevato mediante dissezione chirurgica deve essere sottoposto a microdissezione in pezzi della grandezza di 0,5-1 cm³. La tecnica chirurgica utilizzata per il prelievo gioca un ruolo importante anche sulla frequenza della proliferazione e il tempo di duplicazione cellulare. Gentile e collaboratori (121) hanno dimostrato, infatti, come migliori siano i risultati quando il prelievo viene effettuato con resezione piuttosto che con aspirazione ecoguidata.

Per quanto concerne i metodi di processazione del lipoaspirato, nel corso degli anni ne sono stati proposti diversi che possono essere per comodità differenziati in due grandi linee: le tecniche di processazione enzimatica e non-enzimatica. Le prime utilizzano enzimi quali la collagenasi, la tripsina o la dispasi per digerire il tessuto adiposo, con una certa variabilità per quanto riguarda il numero di lavaggi, la concentrazione degli enzimi, i parametri di centrifugazione e di filtrazione ed i metodi di lisi eritrocitaria. È importante sottolineare che i lotti differenti di collagenasi e la velocità di centrifugazione possono anche influenzare la qualità delle cellule isolate (122). Ancora, importante è la densità con cui le cellule vengono messe in coltura e il medium utilizzato. Lee e coworkers nel 2004 e successivamente Smith e collaboratori nel 2006 dimostrarono come una bassa densità di coltura accompagnata dall'utilizzo di Dulbecco's Modified Medium (DMEM) quale terreno di coltura faciliti la proliferazione e la differenziazione delle ASCs.

Per ridurre al minimo il rischio di infezioni ed evitare la trasmissione di malattie all'atto del trapianto di tessuti e cellule umane, le attività di prelievo, processazione, conservazione e distribuzione devono essere soggette alla normativa di cui alla Direttiva Europea 2004/23/CE7 e relativi allegati, recepita in Italia con Decreto Legislativo 6.11.2007 n. 1918.

Tale direttiva impone ai paesi dell'UE di garantire che:

- siano designate le autorità competenti che applicano e supervisionano l'attuazione della normativa;
- l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule siano effettuati da personale che abbia una formazione e un'esperienza adeguate;
- tutti gli Istituti dei tessuti siano adeguatamente accreditati, designati, autorizzati e titolari di una licenza, la quale può essere sospesa o ritirata qualora l'ispezione riveli il mancato adempimento della normativa;
- tutti i tessuti e le cellule usati nell'UE siano rintracciabili nel percorso dal donatore al

ricevente e viceversa. I dati richiesti devono essere conservati per un periodo minimo di 30 anni successivamente all'uso clinico;

- tutte le importazioni di tessuti e cellule da paesi terzi rispettino norme di sicurezza e di qualità simili;
- esistano dei sistemi atti a notificare, controllare, registrare e trasmettere le informazioni riguardanti qualsiasi evento o reazione avversa grave;
- i tessuti e le cellule siano sempre più forniti per donazione volontaria e gratuita (anche se alcune spese possono essere coperte), dopo aver espresso obbligatoriamente il consenso;
- tutti i dati siano resi anonimi in modo tale che né il donatore né il ricevente siano identificabili.

Inoltre, le cellule mesenchimali non devono essere espanse, fatte proliferare o modificate geneticamente ma possono essere sottoposte a una semplice attività di concentrazione tramite mezzi fisico-meccanici semplici (centrifugazione, filtrazione, separazione) in quanto, nella diversa ipotesi, diventerebbero farmaco e come tale assoggettate a rigorose procedure per la manipolazione e l'utilizzo clinico (Regolamento Europeo 1394/2007).

Tutto ciò ha impedito l'utilizzo di enzimi per la processazione del tessuto adiposo nella pratica clinica, al contrario di quello che accade routinariamente al di fuori della Comunità Europea. La SVF del tessuto adiposo, in quanto parte dello stesso, è dunque assimilabile sotto un profilo giuridico e regolatorio ad un tessuto di banca, ed il relativo utilizzo sarà gestito attraverso il sistema degli Istituti o Banche dei Tessuti nell'utilizzo omologo. Nell'ipotesi, invece, di utilizzo di trapianto autologo intraoperatorio, la Direttiva 2004/23/CE non trova applicazione. Questa legislazione ha altresì permesso la creazione di metodiche non-enzimatiche di separazione cellulare che sfruttano processi meccanici, quali la centrifugazione, la pressione e la filtrazione per disgregare cellule dal tessuto adiposo. I sistemi più conosciuti in commercio sono Lipogems®, Rigenera® e Fast Kit®.

Successivamente alla processazione del tessuto adiposo, sia essa enzimatica o meno, è necessario caratterizzare la popolazione cellulare mediante marcatori selettivi. Le cellule staminali mesenchimali isolate dal tessuto adiposo esprimono antigeni di superficie come CD 34+, CD 73+, CD 31-, CD 45- (123,124).

In letteratura sono descritte varie metodiche per l'isolamento di cellule vasculo-stromali adipose. Il metodo di isolamento più tradizionale sfrutta la caratteristica delle ASCs di aderire

alle plastiche, mentre le altre cellule galleggiano (125): in questo modo quando il medium di coltura viene sostituito, le cellule contaminanti vengono eliminate, progressivamente l'eterogeneità della coltura della SVF si riduce e dopo un certo numero di passaggi restano solamente le ASCs. L'identificazione delle ASCs viene effettuata infine con la citometria a flusso (FACS). Un altro protocollo di isolamento, utilizzato principalmente per midollo osseo e sangue, prevede la centrifugazione su gradiente di Percoll o Ficoll: in questo modo le cellule vengono separate in base alla loro densità e vengono in tal modo isolate (126). Entrambi questi metodi non sono però altamente specifici e per questo devono essere affiancati dalla separazione con FACS (citometria a flusso con separatore cellulare) basata sulla reattività delle cellule a specifici anticorpi fluorescenti. Gli anticorpi utilizzati per identificare le cellule staminali mesenchimali sono numerosi e talvolta differiscono tra i vari gruppi di lavoro rendendo difficoltoso il confronto tra i risultati ottenuti. Questa tecnica, inoltre, presenta alcune importanti limitazioni che comprendono fondamentalmente la semi-sterilità del campione e la necessità della camera bianca che si traducono in un difficile impiego nella pratica clinica. In aggiunta si ha anche la generazione di popolazioni cellulari sofferenti e alti costi di gestione e manutenzione dell'apparecchiatura. Come alternativa alla selezione basata sull'espressione di bande "fluorescenti", le cellule staminali possono essere selezionate ed isolate con anticorpi coniugati a microscopiche biglie magnetiche (magnetic-activated cell sorting, MACs, selezione cellulare mediata da magneti). Le cellule legate dagli anticorpi sono trattenute da apposite colonnine magnetiche mentre tutte le altre sono raccolte separatamente. Questa tecnica è stata classificata come "clinical grade" e quindi di uso per la pratica clinica. Anche in questo caso, i limiti "clinici" di questa metodica sono caratterizzati dall'uso degli anticorpi e dall'alto costo dell'apparecchiatura utilizzata.

Le ASCs sono poi solitamente coltivate in monostrato in medium di coltura composto generalmente da glucosio, amminoacidi, ioni (calcio, magnesio, potassio, sodio e fosfati), solitamente addizionato con 10% di siero fetale bovino, a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ (127).

5.5 ASCs: differenze tra VAT e SAT

Le localizzazioni anatomiche di tessuto adiposo hanno proprie caratteristiche metaboliche, attività lipolitica, composizione in acidi grassi ed espressione genica. Queste possono influenzare le caratteristiche a lungo termine del campione espuntato.

Vi sono delle differenze tra le ASCs prelevate nei diversi distretti di tessuto adiposo, principalmente sono state dimostrate differenze tra il VAT (tessuto adiposo viscerale) e il SAT (tessuto adiposo sottocutaneo). Le ASCs provenienti dal VAT sono più simili alle MSC e meno committed nella differenziazione degli adipociti rispetto a quelle del SAT (128), infatti le prime possiedono più marker della linea staminale mesenchimale ed esprimono geni che bloccano la differenziazione in adipociti. Al contrario Marcotela e collaboratori⁶⁹ hanno dimostrato che i due tipi di deposito possiedono diverse prerogative di differenziazione riguardanti l'adipogenesi ma non vi è la conferma che il SAT possiede migliore capacità differenziativa rispetto al VAT (129,130). Riassumendo le ASCs del VAT e del SAT differiscono in termini di capacità di differenziazione in adipociti, espressione genica, utilizzo di fattori di crescita e capacità di espandersi su stimoli genetici e ambientali.

5.6 Capacità differenziativa delle ASCs

Le staminali derivate dal tessuto adiposo, essendo un tessuto che origina dal mesoderma embrionale, possono, ugualmente alle altre MSC, differenziarsi in osso, cartilagine, muscolo e ovviamente in tessuto adiposo.

La capacità differenziativa e il tasso di proliferazione delle ASCs possono essere influenzati da fattori come l'età del donatore, il tipo di tessuto, la localizzazione (tessuto adiposo sottocutaneo o viscerale), il tipo di procedura chirurgica utilizzata, le condizioni di coltura, l'esposizione alla plastica, la densità di coltura e la formulazione dei media.

Per quanto riguarda l'età, è stato dimostrato che la capacità di adesione alle piastre e di proliferazione sono maggiori in campioni prelevati da donatori giovani, ma la capacità di differenziazione si mantiene anche con l'aumentare dell'età (131).

Nel 2002 Zuk ed il suo gruppo di ricerca hanno eseguito un'analisi molecolare per valutare la capacità differenziativa delle ASCs in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico (91). I dati ottenuti sono stati confermati da una serie di lavori successivi i quali hanno descritto l'utilizzo di diversi fattori induttivi come agenti promotori del differenziamento, come desametasone, fattori di crescita, ormoni, condizioni di ipossia, cicli di pressione idrostatica, campi elettrici a bassa intensità e diversi biomateriali (132,133,134). Il differenziamento condrogenico è stato ottenuto combinando fattori di crescita della famiglia dei TGF- β s con colture in mono strato ad alta densità o pellet cellulari ma, come per l'osteogenesi, anche tramite coltivazione in matrici 3D a base di agarosio, alginato, gelatina, scaffold di acido

ialuronico ed elastina i quali hanno mostrato una capacità nell'indurre un aumento delle espressioni di collagene di tipo II, aggrecano e proteoglicani solforati, markers specifici della cartilagine (135,136,137). Lo stesso risultato è stato ottenuto con materiali funzionalizzati in grado di rilasciare TGF- β s ed insulina (138,139).

Il potenziale condrogenico delle cellule ASCs umane è stato, nel corso degli anni, chiaramente dimostrato da diversi lavori. Nel 2002, dopo un processo di differenziazione in vitro, Erickson e collaboratori (140) hanno mostrato che le ASCs umane mantengono il fenotipo dei condrociti e formano il tessuto cartilagineo quando impiantate per via sottocutanea in vivo in topi immunodeficienti per un massimo di 12 settimane. In numerosi altri studi (141,142) è stato dimostrato che, in determinate condizioni, le ASCs possono esprimere i geni e le proteine di diverse molecole specifiche della cartilagine, tra cui il collagene di tipo II e l'aggrecano, senza espressione dei marcatori dei condrociti ipertrofici, quali il collagene di tipo X.

Uno dei maggiori problemi riguardanti le ASCs, tuttavia, è la mancanza di standardizzazione dei metodi per l'isolamento e la coltura.

CAPITOLO 6

Introduzione e scopo dello studio

Per tendinopatia si intende genericamente qualsiasi tipo di lesione a carico della struttura tendinea.

Il termine tendinopatia non fu però dal punto di vista storico il primo ad essere utilizzato, infatti in passato le lesioni tendinee andavano sotto il nome di “tendiniti”. Questo termine suggeriva che l’aspetto infiammatorio fosse quello maggiormente implicato nella patogenesi delle lesioni, ma le tradizionali modalità di trattamento volte a modulare l’infiammazione hanno avuto scarso successo (1) e gli studi istologici su campioni chirurgici mostrano costantemente la presenza di lesioni degenerative, con un’infiammazione assente o minima (2,3).

Ad oggi, quindi, anche se i meccanismi patogenetici intrinseci delle tendinopatie sono ancora largamente sconosciuti, viene per lo più favorita l’ipotesi che l’infiammazione e i cambiamenti degenerativi coesistano spesso nel corso dei disturbi del tendine e che i loro contributi relativi siano difficili da analizzare (4). Per queste motivazioni, il termine “tendinite” è stato sostituito con quello più generico di tendinopatia.

Dal punto di vista epidemiologico, le tendinopatie rappresentano sicuramente un problema sempre di maggior rilievo nel mondo dello sport. Infatti, fino al recente passato, le attività sportive e fisiche riguardavano principalmente i giovani e le persone di mezza età mentre oggi, con un aumento del tempo libero, un numero sempre maggiore di persone trascorre il tempo praticando sport a scopo ricreativo o competitivo (5).

Oltre agli sportivi, dato che l’età media della popolazione è in continuo aumento grazie al miglioramento della qualità della vita degli ultimi decenni, lo sviluppo di tendinopatie è un problema che in generale affligge un numero sempre maggiore di individui poiché uno dei principali fattori di rischio intrinseci è l’età. Infatti, se da una parte la guarigione incompleta e le caratteristiche tendinopatiche sono state associate al sovraccarico cronico (come ad esempio appunto negli sportivi), dall’altra le stesse caratteristiche istopatologiche sono state descritte anche quando un tendine è privo di carico (situazione frequente nei soggetti più anziani). Quindi, lo scarico del tendine induce cambiamenti delle cellule e della matrice simili a quelli osservati in uno stato di sovraccarico e diminuisce l’integrità meccanica del

tendine stesso (7).

Anche se il problema delle tendinopatie coinvolge un numero sempre maggiore di persone, non esiste ancora un trattamento che porti definitivamente e in tutti i casi alla guarigione della patologia. I trattamenti che sono stati studiati includono farmaci antinfiammatori non steroidei, esercizio eccentrico, cerotti al gliceril trinitrato, iniezioni sclerosanti, ultrasuoni e trattamento con le onde d'urto come già discusso in precedenza. Ciò che può apparire clinicamente come una tendinopatia acuta è in realtà un fallimento ben avanzato di una risposta di guarigione cronica in cui non vi sono prove istologiche né biochimiche di infiammazione. La letteratura disponibile suggerisce che, in assenza di un evidente processo infiammatorio, non esiste una base razionale per l'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei nella tendinopatia cronica (8).

Un altro concetto da sottolineare è che le terapie nominate in precedenza per la maggior parte non sono dei trattamenti rigenerativi, ma solo sintomatici e cosa più importante non si riscontra un risultato omogeneo nei pazienti trattati. L'ideale sarebbe mettere a punto una terapia che sia rigenerativa, efficace su un numero elevato di pazienti e possibilmente dai costi non troppo elevati. Visti quindi i limiti di tutte le opzioni terapeutiche precedentemente descritte, ci si concentrerà ora sul trattamento di una nuova tecnica terapeutica, oggetto del nostro studio, basata sull'utilizzo di iniezioni di frazione vascolo-stromale (SVF) nella porzione di tendine affetta da tendinopatia. A questo proposito, lo scopo di questo studio prospettico in vitro e in vivo è quello di valutare l'effetto rigenerativo di micro-innesti adiposi (SVF) ottenuti mediante disaggregazione meccanica su lesioni tendinee indotte sperimentalmente in un modello animale, rispetto al gruppo di controllo.

Per realizzare lo studio sono stati selezionati dodici ovini con specifici criteri di inclusione, nei quali è stata indotta una lesione mediante l'utilizzo di collagenasi a livello del tendine calcaneare comune. In ogni ovino poi è stato trattato con SVF processato con sistema rigenera solo uno dei due tendini mentre l'altro è stato utilizzato come controllo. Sono seguiti una serie di controlli ecografici ed elastosonografici fino al prelievo biotico, sul quale è stato eseguito l'esame istologico.

CAPITOLO 7

Materiali e metodi

7.1 Criteri di inclusione dello studio

Per effettuare lo studio sono stati scelti dodici soggetti di specie ovina, di sesso femminile, tra i 50 e i 60 kg di peso. Ogni soggetto è stato sottoposto ad esame obiettivo generale e particolare ortopedico e neurologico, ed esame ecografico, al fine di escludere patologie ortopediche o neurologiche pregresse e lesioni tendinee. Inoltre, sono stati effettuati esami emocromocitometrici e biochimici, al fine di escludere gli esemplari che presentavano alterazioni. Tutti i soggetti selezionati dovevano rispettare quindi i seguenti criteri di inclusione:

- tra i 2 e i 5 anni di età;
- stato di buona salute, appartenenti alla classe di rischio anestesilogico ASA1;
- esenzione da patologie ortopediche o neurologiche rilevate alla visita clinica;
- accertato stato di non gravidanza.

Gli ovini che non rispettavano tali criteri sono stati esclusi dallo studio.

7.2 Sistema Rigenera®

Il sistema di disgregazione meccanica Rigenera® è un dispositivo medico, che permette di ottenere in maniera standardizzata, con elevata riproducibilità e minima manipolazione, micro-innesti a partire da differenti tessuti prontamente disponibili per la pratica clinica (143, 144). I microinnesti ottenuti sono caratterizzati da dimensioni di circa 50-70 micron, il che consente loro un'elevata vitalità cellulare e una nutrizione delle cellule per semplice diffusione interstiziale. Il sistema Rigenera consta di un apparato motorizzato che permette ad una capsula sterile e monouso (Rigeneracons®) di disgregare meccanicamente il tessuto posto al suo interno.

Ogni Rigeneracons® è costituito all'interno da una lama elicoidale gestita da un motore elettrico che la fa ruotare ad 80 giri al minuto, consentendo così un taglio preciso, uniforme e costante. Inoltre, all'estremità di ogni elica è presente un filtro metallico contenete 100 fori, di circa 50µ, ognuno dei quali presenta 6 micro-bisturi. Il tessuto così disgregato e filtrato viene raccolto al fondo della capsula, e grazie ad un raccordo per siringa è possibile aspirare

il preparato ed utilizzarlo. Il tessuto che viene inserito all'interno della capsula deve essere precedentemente sezionato manualmente dal chirurgo al fine di ottenere una dimensione di circa 2 mm, oppure deve essere aspirato, come avviene per il tessuto adiposo, attraverso liposuzione con cannula e successivamente trattato con il sistema Rigenera®

È stato dimostrato che il tessuto adiposo lipoaspirato umano microframmentato non modifica assolutamente il contenuto delle strutture stromali così come delle cellule ma riesce ad attivare una serie di cambiamenti molecolari che aumentano le proprietà rigenerative naturali del tessuto ricevente. La principale unità strutturale e morfologica, la nicchia adiposa, viene mantenuta dopo la disaggregazione e protegge le ASCs attivate, rafforzando la loro efficacia nell'ambiente ricevente. Questa è la principale differenza tra questo sistema e gli altri, perché la conservazione delle nicchie strutturali adipose aumenta l'efficacia delle ASCs. Inoltre, l'eliminazione della centrifugazione e il trattamento enzimatico minimizzano i traumi dei tessuti preservando l'integrità cellulare, così come la riduzione della dimensione dei cluster adiposi favorisce il suo attecchimento a causa di una rivascularizzazione del microinnesto più facile, efficace e veloce grazie alla sua interazione con il microambiente vascolare ricevente.



Figura 14 Device Rigenera® costituito dal motore e dalla capsula monouso insieme alla frusta che funge da connessione tra il motore e la capsula stessa; inoltre è presente anche la cannula utilizzata per la liposuzione.

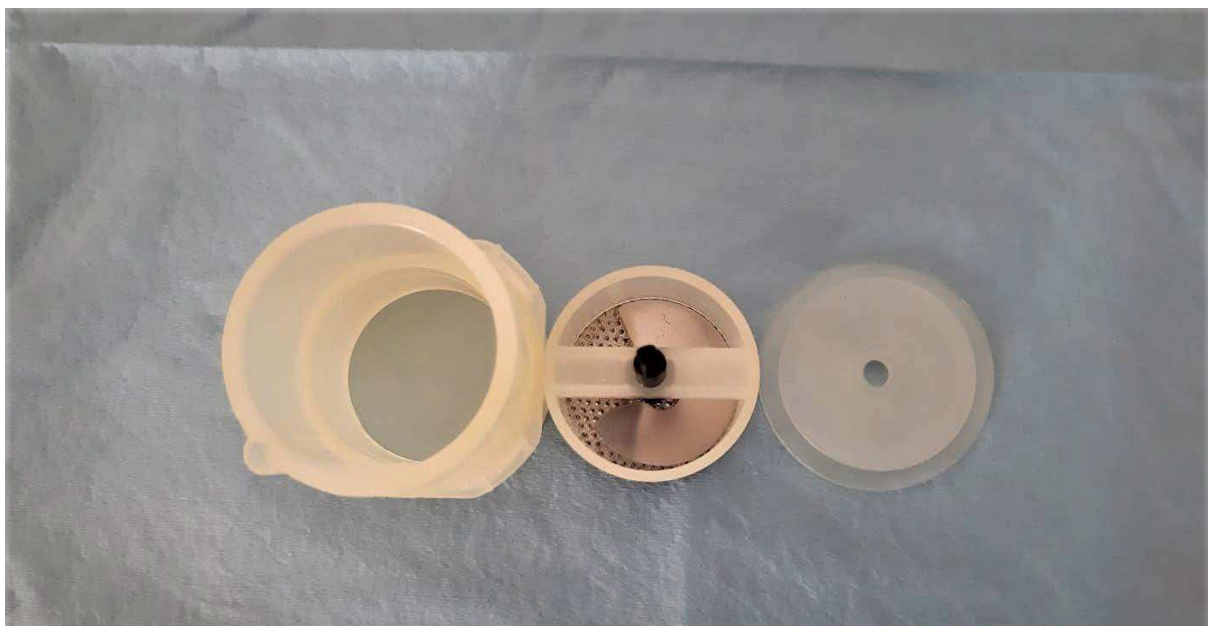


Figura 15 Dispositivo monouso (Rigeneracons® o capsula) costituito all'interno da una lama elicoidale, al di sotto di questa si osserva un filtro metallico contenente 100 fori, ognuno dei quali presenta 6 micro-lame.

7.3 Progettazione dello studio

Lo studio è stato strutturato in quattro parti. Al tempo zero (T0), dopo aver valutato macroscopicamente ed ecograficamente le dimensioni e lo stato dei tendini degli ovini, è stata indotta enzimaticamente la lesione. Nella seconda fase (T1) i tendini calcaneali comuni dei due arti pelvici di ciascun soggetto sono stati divisi in maniera randomizzata tra il gruppo trattato (12 tendini) e il gruppo controllo (12 tendini). Successivamente è stata prelevata, processata e iniettata la SVF. Sono seguiti poi dei controlli periodici (T2) fino all'ultima fase in cui è stato eseguito il prelievo biotico (T3).

Su tutti e dodici gli ovini sono state eseguite le seguenti analisi:

- valutazione della dimensione del tendine trattato rispetto al controllo;
- valutazione ecografica ed elastosonografica del gruppo dei tendini trattati rispetto al gruppo controllo (% hardness);
- valutazione istologica dei tendini (FOS, FES, FIS, NEC);
- immunoistochimica (ancora in corso di svolgimento).

7.3.1 T₀ - Induzione enzimatica della lesione

Gli animali sono stati inizialmente sottoposti a sedazione utilizzando un'associazione di sedativo e analgesico per via intramuscolare, affinché raggiungessero un adeguato stato di

tranquillità. A questo punto è stata eseguita una valutazione macroscopica ed ecografica dello stato dei tendini dell'ovino, e successivamente è avvenuta l'induzione enzimatica della lesione tramite iniezione di 500 UI di collagenasi tipo 1/a sul tendine calcaneare comune sotto guida ecografica, utilizzando un ago da 22 G. Per simulare la tendinopatia in forma standardizzata, l'iniezione è stata fatta circa alla stessa distanza dall'inserzione del tendine [tabella 1] e sempre iniettando prima la destra e poi la sinistra, dal momento che la lesione è stata indotta bilateralmente per avere il controllo.

Ovino	Altezza a cui è stata indotta la lesione
Ovino n° 1	6,5 cm
Ovino n° 2	5,5 cm
Ovino n° 3	6,0 cm
Ovino n° 4	6,0 cm
Ovino n° 5	6,5 cm
Ovino n° 6	6,0 cm
Ovino n° 7	6,5 cm
Ovino n° 8	6,0 cm
Ovino n° 9	6,0 cm
Ovino n° 10	5,5 cm
Ovino n° 11	5,5 cm
Ovino n° 12	6,0 cm

Tabella 1 Localizzazione della lesione in ogni ovino.



Figura 16 Uno degli esemplari selezionati per lo studio



Figura 17 Mediante utilizzo di bilancia atomica sono state pesate 500 UI di collagenasi 1°, poi disciolte in soluzione salina e preparate sterilmente per l'inoculazione.



Figura 18 Preparazione dell'iniezione di collagenasi 1°



Figura 19 Siringa contenente la collagenasi 1°

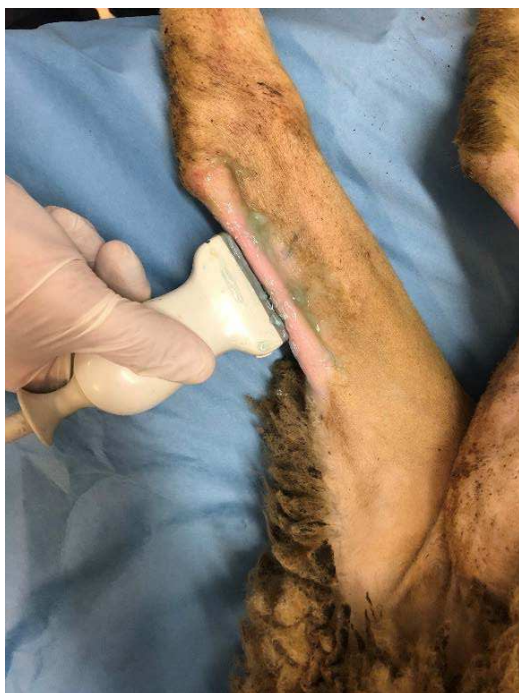


Figura 20 T_0 : controllo ecografico prima del trattamento con collagenasi



Figura 21 T_0 : induzione enzimatica della lesione tramite 500 UI di collagenasi 1°

7.3.2 T_1 – Prelievo di grasso, processazione e somministrazione di SVF

Quindici giorni dopo T_0 , i tendini sono stati divisi casualmente in due gruppi: quelli trattati (TR) e quelli di controllo (CTRL). I 12 animali sono stati sottoposti nuovamente a sedazione, al fine di prelevare da ciascun animale tramite aspirazione (liposuzione), mediante apposita siringa fornita con il sistema Rigenera© (certificato CE I Classe, Human Brain Wave, Torino, Italia), dopo accurata disinfezione chirurgica, circa 4 gr di tessuto adiposo dalla regione prescapolare.

Il tessuto adiposo ottenuto è stato immediatamente suddiviso e disgregato meccanicamente e sterilmente attraverso il sistema.

I frammenti derivanti sono stati posizionati in una capsula monouso, al di sotto del sistema rotante di lame elicoidali appoggiate sul filtro sul fondo della capsula. La capsula è stata poi richiusa e sono stati inseriti al suo interno 3 ml di soluzione fisiologica. Mediante il motore chirurgico precedentemente sterilizzato e collegato al controllo remoto con frusta altrettanto sterile, è stato impostato un ciclo di lavoro pari a 80 giri/minuto ed è stata eseguita la procedura di disgregazione meccanica per 2 minuti di rotazione assiale per ogni capsula. Al termine dei 2 minuti di disgregazione il contenuto di ogni capsula è stato aspirato mediante siringa sterile da 2,5 ml.

La frazione stromale vascolare (microinnesti adiposi autologhi) così ottenuta (2,5 ml) è stata inoculata, previa accurata disinfezione e mediante una siringa sterile con innestato un ago di 22 G, tramite guida ecografica, al centro della lesione tendinea di ogni arto pelvico assegnato al gruppo trattamento.

Non sono stati trattati i tendini appartenenti al gruppo controllo.



Figura 22 T₁: prelievo SVF



Figura 23 T₁: prelievo SVF

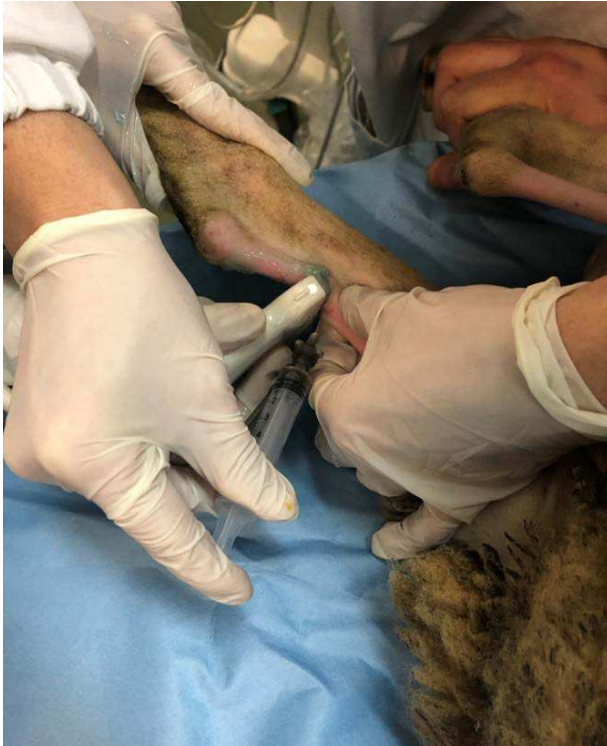


Figura 24 T₁: iniezione paratendinea di SVF previa processazione tramite sistema Rigenera

7.3.3 T₂ - Controlli di cut off a un mese

Trascorsi trenta giorni dal T₁ è stato fatto un follow up della lesione tendinea dal punto di vista macroscopico, ecografico ed elastosonografico.

L'esame in real-time B-mode è stato effettuato utilizzando un apparecchio ultrasonografico (Mylab Class C, Esaote, Genova, Italia) equipaggiato con una sonda da 3 a 11 MHz a trasduzione lineare multifrequenza (LA533). Le lesioni sono state valutate anche utilizzando il B-Mode e l'elastosonografia (ElaXto sowfter, Esaote) alla frequenza di 6.7 MHz.

La valutazione ecografica è stata eseguita a livello del tendine nella sua parte intermedia (6 cm dalla tuberosità calcaneare) e nella lesione per oggettivare il tutto. Sono poi state calcolate le dimensioni del tendine sano e delle lesioni: larghezza e spessore (mm) nella proiezione trasversale.

Sono state effettuate scansioni longitudinali e trasversali. L'elastosonografia è stata condotta con il tarso in flessione a 90 gradi e il ginocchio in posizione neutra. La valutazione è stata effettuata a 6 cm dalla tuberosità calcaneare prossimale.

La valutazione elastosonografica è avvenuta secondo la gradazione di colore ove:

- Grado 1: dal Blu (il tessuto più resistente) al verde (tessuto resistente);

- Grado 2: Giallo (tessuto intermedio);
- Grado 3: Rosso (tessuto molle).

Le immagini sono state analizzate attraverso il software ELAXTO My Lab™ Desk (Esaote S.p.A., Genova, Italia). Attraverso questo software è stato possibile eseguire elaborazioni quantitative su regioni di interesse (ROI), per effettuare le successive indagini statistiche.

Per ogni campione sono stati così misurati due valori, disegnando la ROI su tutta l'area del tendine compresa:

1. Elax-t%SFT: indica la percentuale di tessuto morbido ed elastico in una ROI
2. Elax-t%HRD: indica la percentuale di tessuto rigido in una ROI

Sono poi state calcolate le dimensioni del tendine sano e delle lesioni: larghezza e spessore (mm) nella proiezione trasversale. L'indagine è stata condotta sempre dallo stesso operatore, un ecografista esperto.

7.3.4 T₃ - Controlli prima e dopo sacrificio degli animali

Trascorsi sessanta giorni dal T₁ è stato fatto il follow up finale, successivamente gli animali sono stati sottoposti a eutanasia mediante overdose di barbiturico, previa induzione dell'anestesia generale. A questo punto è stata effettuata una exeresi chirurgica del tendine calcaneale comune: la procedura chirurgica è stata eseguita in sterilità, si è provveduto alla asportazione di tutto il tendine ed al successivo prelievo di un campione tendineo di 1,5 cm² circa.

Per l'esame istologico le strutture tendinee sono state asportate tramite un taglio netto operato ai livelli inserzionali con le rispettive basi ossee, suture ad una estremità con una targhetta recante il numero identificativo del soggetto e specificato se si trattasse di tendine calcaneale comune destro o sinistro, quindi posti in formalina tamponata al 10%. La fissazione è avvenuta per un tempo limitato, massimo 72 ore, poiché i campioni di tendine non erano particolarmente spessi, e soprattutto perché si è voluto evitare l'over-fixing operato dalla formalina sulle proteine delle strutture tendinee, che avrebbe causato sia un eccessivo indurimento dei tendini, sia una alterazione della struttura terziaria e quaternaria delle proteine, compresi i determinanti antigenici esposti dalle fibre collagene e dalle cellule infiammatorie, che avrebbero inficiato le successive valutazioni di isto- ed immunoistochimica.

Partendo dalla massima zona di lesione, i tendini sono stati divisi in sezioni longitudinali di 3 cm includenti la zona massima di lesione, ottenendo un totale di 2 blocchetti da ciascun

tendine campionato. I tendini sono stati sezionati secondo l'asse longitudinale, seguendo l'orientamento delle fibre di collagene e posizionati in gabbiette da processazione istologica, quindi inclusi in paraffina e tagliati con microtomo Leica in sezioni istologiche sottili, di 4µm di spessore. Le sezioni poi sono state fatte aderire su vetrini elettrostatati (Histoline, Milano, Italia) per averne la massima adesione, ed una volta asciutte, colorate con colorazione Ematossilina – Eosina.

La valutazione istologica e immunoistochimica è stata eseguita in maniera “blind” ovvero in cieco da un singolo patologo operatore. L'esame istologico delle porzioni tendinee ha valutato le aree di allineamento delle fibre di collagene in un modello longitudinale, utilizzando un punteggio di orientamento delle fibre (FOS). In questa tipologia di punteggio a score, i valori FOS alti indicano un pattern non longitudinale o maggiormente perturbato, mentre i punteggi più bassi descrivono un normale pattern longitudinale delle fibre secondo il modello: 3 (> 75%), 2 (50% -75%), 1 (25% -49%), 0 (<25%), dove le percentuali si riferiscono al rapporto tra l'area danneggiata e l'intera area della sezione trasversale del tendine calcaneale comune, come valutato con un ingrandimento di 10×. Per ogni parametro considerato (vale a dire, percentuale predominante di fibre organizzate allineate o non allineate o con andamento a vortice o “finger print”), sono stati osservati cinque campi selezionati casualmente e il punteggio è stato valutato come percentuale media dei campi esaminati. Sono stati inoltre considerati altri criteri valutativi strettamente morfologici:

- la presenza di edema/aspetto mixoide dell'area tendinea esaminata (FES) (score 0 -3);
- la presenza di necrosi (NEC) (score 0 - 3);
- la presenza di un processo infiltrativo-infiammatorio (FIS), valutato secondo il seguente score: da 0 a 2 -3 cellule infiammatorie per campo a 40x (score 0); da 3 a 5 cellule per campo (score 1); da 5 a 15 cellule per campo (score 2); oltre 15 cellule per campo (score 3).

Lo score finale istologico veniva quindi espresso come la somma dei tre score (FOS+FES+FIS+NEC).

7.4 Analisi statistica

7.4.1 Statistica parte ecografica

I valori di Elax-t%HRD e Elax-t%SFT e le dimensioni dei tendini e delle lesioni non sono risultati distribuiti normalmente mediante il test di Shapiro-Wilk. I valori Elax-t%HRD e Elax-t%SFT sono stati confrontati con il test dei segni per ranghi di Wilcoxon tra i seguenti gruppi:

- tendini sani e tendini lesionati (primo controllo pretrattamento).
- controllo post-induzione (T_1) e il secondo controllo post-trattamento (T_3) sia nei tendini trattati che non trattati.
- tendini trattati e non trattati al T_2+T_3

Le dimensioni dei tendini in mm ottenute in sezione trasversale sono state confrontate mediante il test dei segni per ranghi di Wilcoxon tra i seguenti gruppi:

- tendini sani e tendini lesionati prima del trattamento (T_0)
- tendini trattati e non trattati tra T_1 e T_3
- tendini trattati tra T_2 e T_3

Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

7.4.2 Statistica parte istologica

La valutazione della normalità dei parametri è stata eseguita con metodo di Shapiro-Wilk. Per la comparazione dei dati non distribuiti normalmente è stato utilizzato il Mann-Whitney Test. La comparazione è considerata statisticamente significativa in caso di $p < 0,05$. L'analisi statistica dei dati (FOS, FES, FIS e NEC), tra il gruppo trattato e il gruppo controllo è stata condotta utilizzando il software MedCalc versione 15.8© 1993-2015.

CAPITOLO 8

Risultati

Sono stati oggetto dello studio 24 tendini calcanei comuni di 12 ovini.

8.1 Valutazione Clinica

Nei quattro tempi di ricerca (T_0 , T_1 , T_2 , T_3) lo spessore medio del tendine calcaneale comune, misurato 6 cm prossimalmente alla tuberosità calcaneale prossimale, è variato notevolmente.

- A T_0 (tendini sani) lo spessore medio è stato di 8.6 mm nel gruppo che poi è stato trattato (TR), mentre di 8.5mm nel gruppo che è stato poi assegnato al controllo (CTRL);
- A T_1 (5 giorni post lesione) lo spessore dei tendini del gruppo TR è stato in media 11mm, mentre nel gruppo CTRL è stato 11.5mm;
- A T_2 (30 giorni post trattamento gruppo SVF) lo spessore dei tendini del gruppo trattato è stato in media 10.3 mm, mentre nel gruppo controllo è stato 10.7mm;
- A T_3 , (60 giorni post trattamento), lo spessore dei tendini del gruppo TR è stato in media 9.3mm e 9.5 nel gruppo CTRL.

Come riportato nella Tabella 2, si è avuto un lieve miglioramento clinico, in quanto c'è stato una riduzione maggiore dello spessore dei tendini trattati rispetto a quelli non trattati, sia a 30 giorni dall'inoculazione della terapia (T_2) sia a 60 giorni dopo (T_3), anche se la differenza di spessore non è stata statisticamente significativa secondo il test Mann-Whitney.

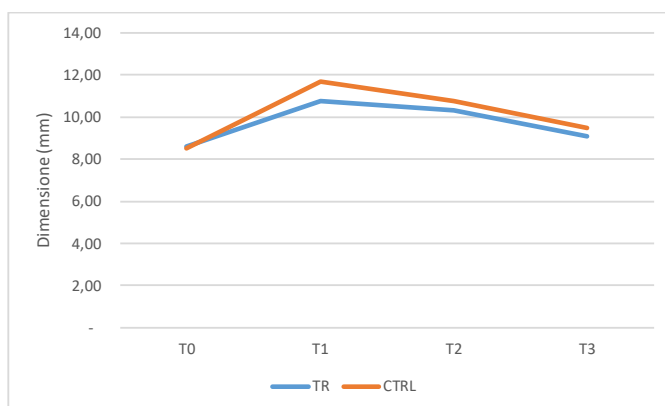


Figura 25 Test Mann-Whitney che mostra la variazione di spessore dei tendini che non è risultata statisticamente significativa

OVINI	T ₀		T ₁ (15 gg post)		T ₂ (30 gg post)		T ₃ (60 gg post)	
GRUPPO A TRATTATO A DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX
40173	10	10	11	12	11	12	9	11
49356	6	8	7	10	7	10	6	9
49357	7	7	13	9	10	7	10	6
76382	8	9	10	11	10	11	8	10
76351	8	9	12	9	11	10	9	8
84735	10	10	11	11	11	10	10	9
GRUPPO B TRATTATO A SN								
66776	7	8	10	12	8	11	8	9
60027	8	8	11	12	10	10	10	11
70137	10	10	12	17	12	15	11	13
76357	8	9	11	12	11	12	9	10
66766	8	9	12	12	12	10	9	9
76352	9	9	11	11	11	11	9	10
MEDIA	Tratt: 8.6 Non tratt: 8.5		Tratt: 11 Non tratt: 11.5		Tratt: 10.3 Non tratt: 10.7		Tratt: 9.3 Non tratt: 9.5	

Tabella 2 Spessore dei tendini a T₀, T₁, T₂ e T₃ espresso in millimetri. Misurazione mediante calibro manuale

8.2 Valutazione Ecografica

8.2.1 Ecografia B-mode

L'esame ecografico B-Mode condotto a T₀, T₁, T₂ e T₃ ha evidenziato le lesioni indotte e monitorato il processo di riparazione. Le aree lesionate a T₂ e T₃ sono apparse lievemente meno ipoecogene, sebbene l'esame non abbia consentito di valutare in maniera oggettiva e quantitativa la progressione del processo riparativo. I risultati della misurazione dello spessore dei tendini, presi in sezione trasversale nella sede della lesione (6 cm dalla tuberosità calcaneale prossimale), sono riportati in tabella 3. Le lievi differenze dello spessore dei tendini del gruppo trattato rispetto al controllo nei due tempi (T₂ e T₃) non sono risultate statisticamente significative.

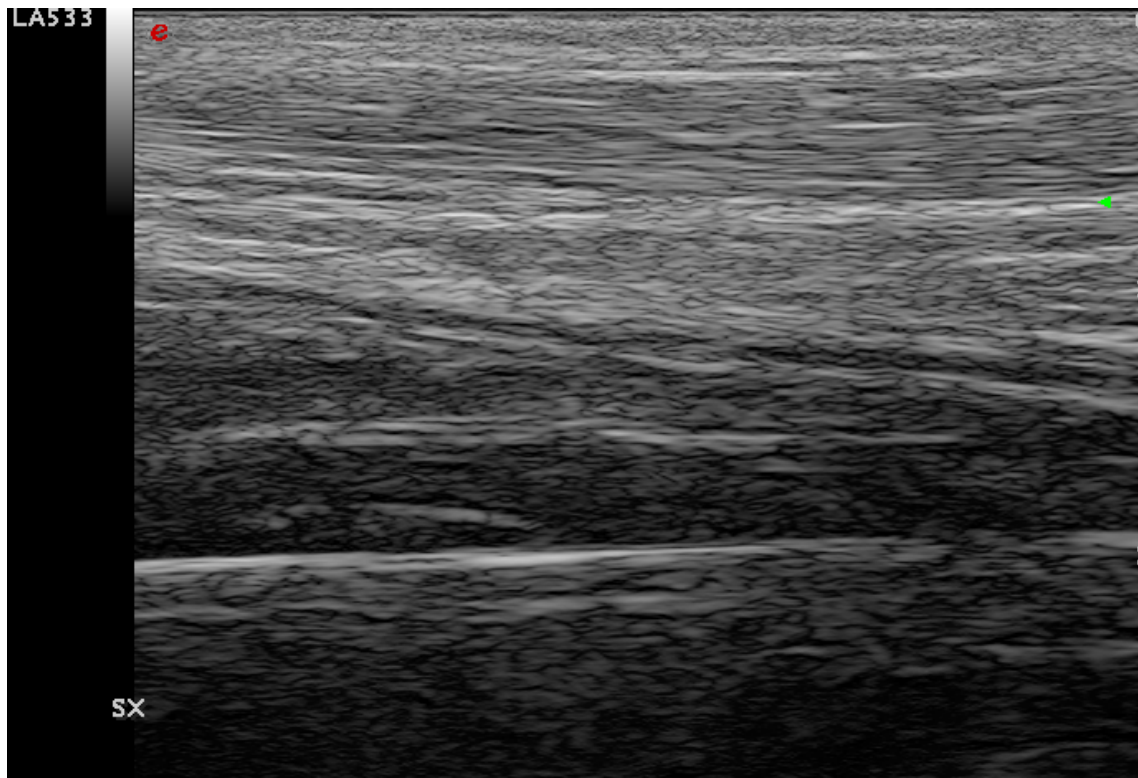


Figura 26 Scansione longitudinale all'ecografia B-mode del tendine d'Achille sinistro, prima dell'induzione della lesione: il tendine appare di normale spessore, con fibre isotropiche.

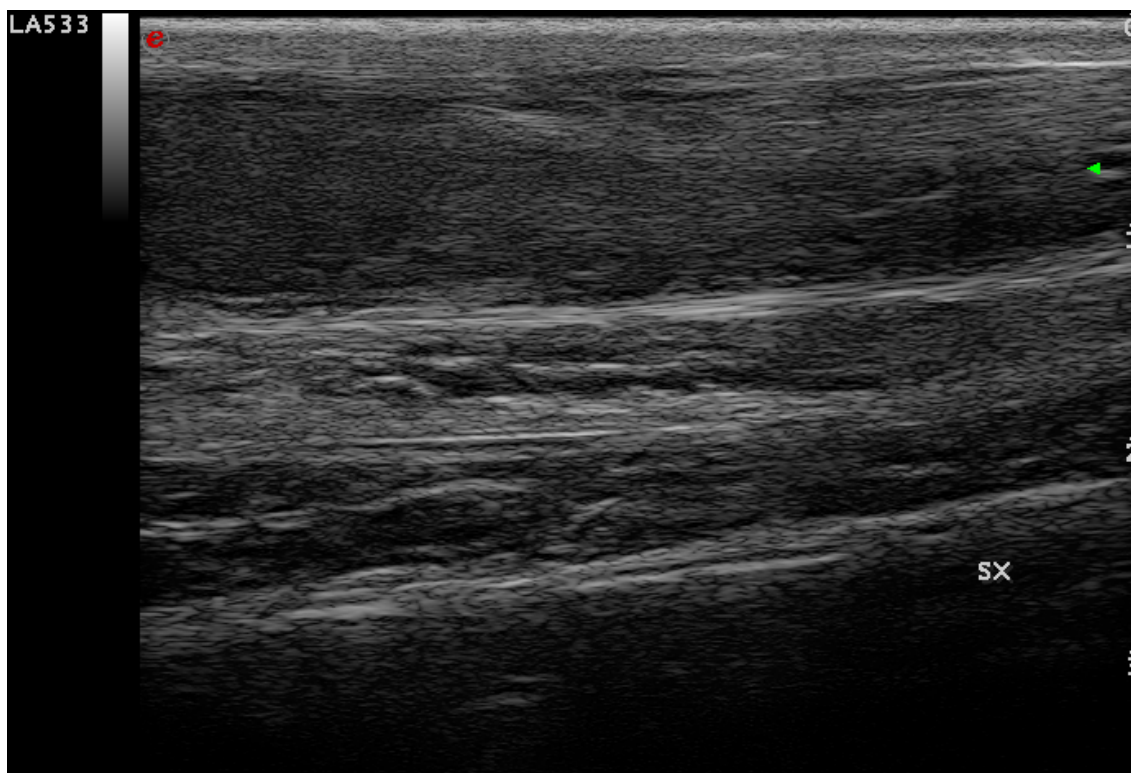


Figura 27 Scansione longitudinale all'ecografia B-mode del tendine d'Achille al primo controllo dopo l'induzione della lesione: il tendine appare ispessito, con marcata anisotropia delle fibre.

OVINI	T ₀		T ₁ (15 gg post)		T ₂ (30 gg post)		T ₃ (60 gg post)	
GRUPPO A TRATTATO A DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX
40173	13.5	11.9	19.4	18.8	14.1	20	9.1	11.1
49356	8	9.2	16.5	17	18.6	16.1	9.4	9.3
49357	8.3	7.8	13.9	12.3	14.3	15.5	9.4	9.5
76382	6.6	8.4	12.9	13.5	18.8	18.4	6.8	12.2
76351	8.1	5.9	13.6	11.6	14.8	13.1	9.5	9.5
84735	8.2	8.7	14.5	16.9	15.5	14.3	6	7.6
GRUPPO B TRATTATO A SN								
66776	8.2	8.4	14.7	14.4	19.1	14.6	10.8	8.7
60027	10	7.1	13.5	14.8	17.2	15.7	7.9	8.8
70137	9.7	8.8	15.7	15.7	13	15.1	8.2	7.6
76357	6.5	7.6	12.5	13.7	16.3	16.5	8.7	9.4
66766	6.6	7.4	12.3	16.2	15.7	15.5	7.8	7.9
76352	8.2	7.1	18	15.3	12.8	12.6	8.2	7.1
MEDIA	Tratt: 8.4 Non tratt: 8.2		Tratt: 14.7 Non tratt: 15		Tratt: 15.9 Non tratt: 15.5		Tratt: 9.2 Non tratt: 8.3	

Tabella 3 Spessore dei tendini a T₀, T₁, T₂ e T₃ espresso in millimetri. Misurazione eseguita tramite ecografia in B-mode.

8.2.2 Elastosonografia

Tramite esame elastosonografico è stata valutata la percentuale di elasticità dei tendini, definita in termini di rigidità (hardness) e sofficietà (softness). Le percentuali di rigidità dei diversi tendini a T₀, T₁, T₂ e T₃ sono riportate nella Tabella 4. L'elastosonografia del tendine calcaneale comune, condotta con il tarso posto a 90 gradi e il ginocchio in posizione neutra, ha evidenziato come il tendine sano fosse molto rigido. A T₁ il tendine si presentava marcatamente soffice (soft).

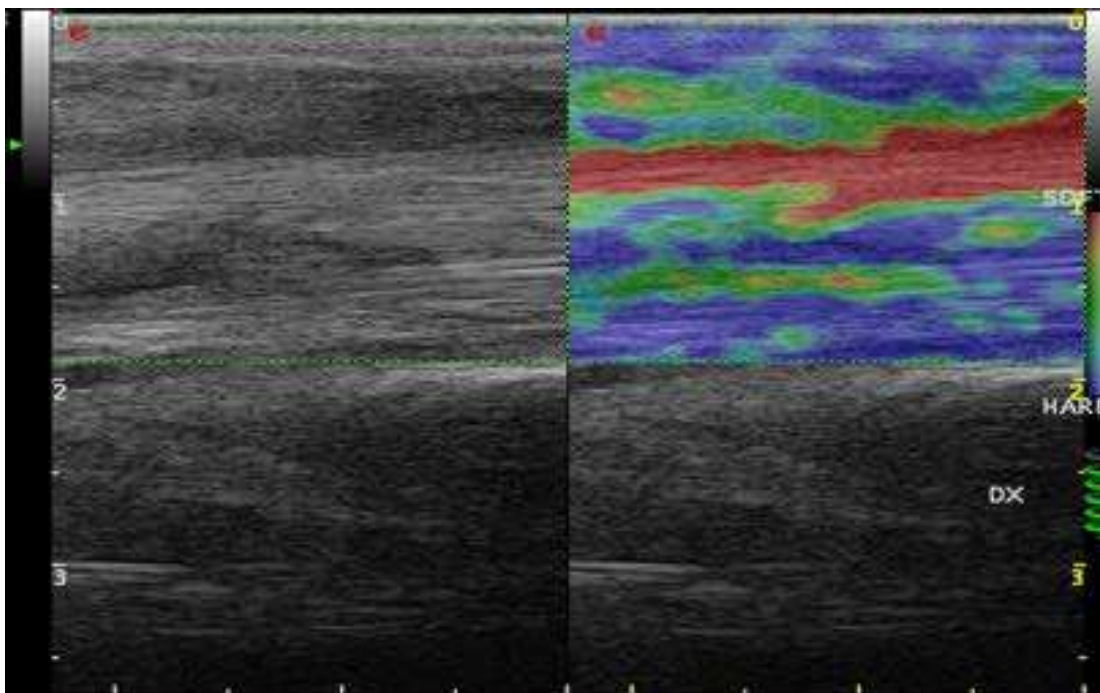


Figura 28 Elastogramma in scansione longitudinale del tendine di Achille normale, prima dell'induzione della lesione(T_0): a sinistra la scansione in B mode, a destra la stessa scansione con sovrapposta la mappa di colore elastografica, che indica una spiccata rigidità (colore blu) del tendine.

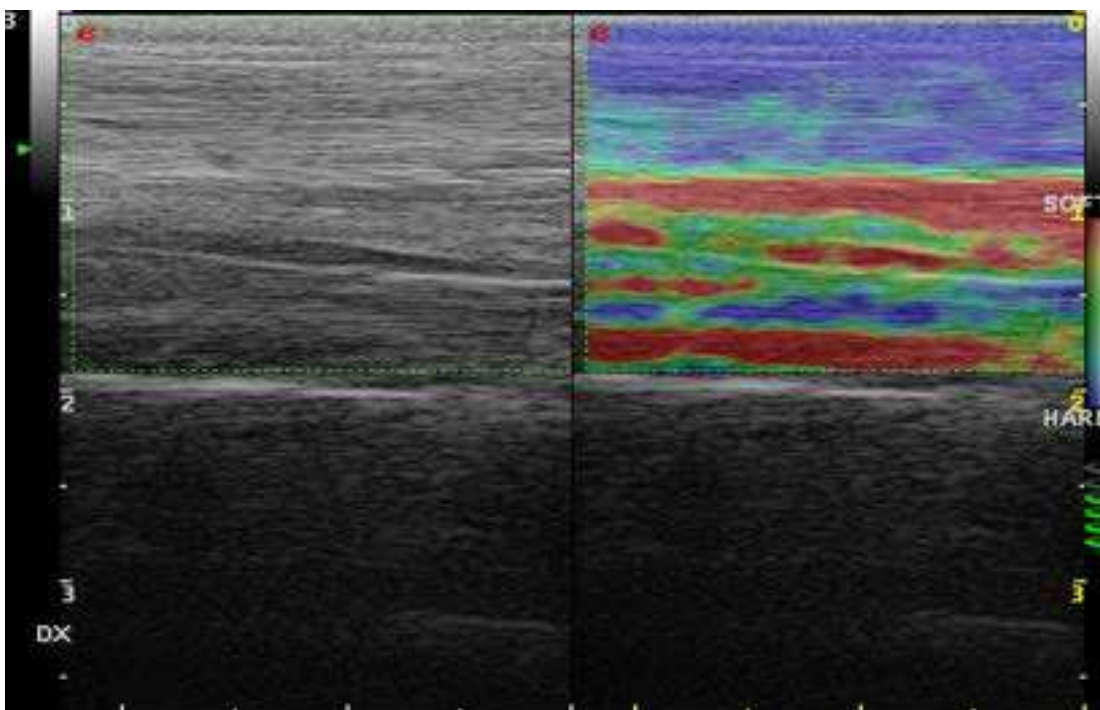


Figura 29 Elastogramma in scansione longitudinale del tendine di Achille al primo controllo, dopo l'induzione della lesione (T_1): a sinistra la scansione in B mode, in cui è visibile marcato ispessimento ed anisotropia delle fibre, a destra la mappa elastografica mostra una marcata elasticità-sofficità del tendine lesionato (colore rosso).

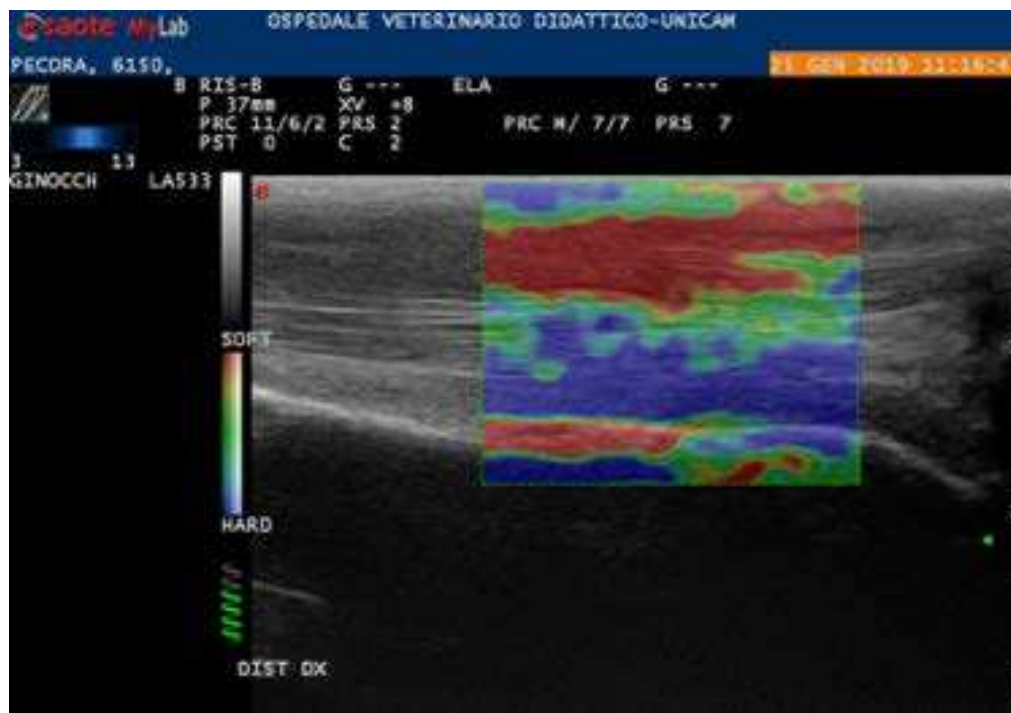


Figura 30 Elastosonogramma in scansione longitudinale del tendine di Achille trattato a 60 giorni dall'induzione della lesione (T_3), follow up finale. Si nota che il tendine ha riacquisito una certa rigidità (colore blu).

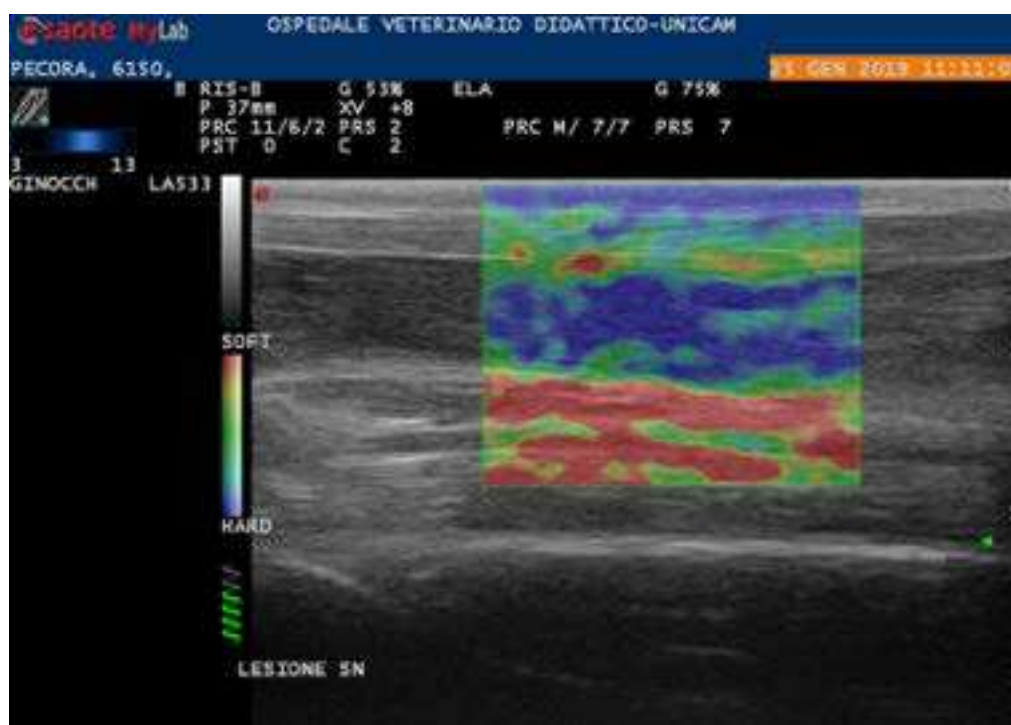


Figura 31 Figura 36 Elastosonogramma in scansione longitudinale del tendine di Achille del gruppo controllo a 60 giorni dall'induzione della lesione (T_3), follow up finale. Il tendine non ha riacquisito la rigidità iniziale (colore rosso).

A T_2 , il gruppo trattato ha mostrato una riduzione della soffici   e un aumento della rigidit  , e a T_3 questa progressione    apparsa pi   evidente, tanto che rispetto al gruppo controllo il gruppo trattato mostra delle differenze statisticamente significative tra il momento del trattamento e il T_3 . C'   stato, quindi, un recupero della durezza statisticamente significativo nel gruppo trattato rispetto al controllo ($p=0.03$), come si vede dal test per ranghi Wilcoxon.

OVINI	T_0		T_1 (15 gg post)		T_2 (30 gg post)		T_3 (60 gg post)	
GRUPPO A	SN	DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX
TRATTATO A DX	HARDNESS %		HARDNESS %		HARDNESS %		HARDNESS %	
40173	99.15	99.33	14.77	53.40	76.24	40.54	56.51	8.58
49356	99.02	99.25	21.86	55.27	41.89	54.42	22.84	91.99
49357	98.46	87.36	25.82	46.78	91.13	68.29	3.22	14.88
76382	73.34	90.73	99.76	96.06	78.24	30.33	32.11	83.03
76351	97.47	100	18.78	40.48	28.44	38.49	55.07	36.77
84735	96.26	100	26.20	23.62	85.38	49.12	19.82	74.58
GRUPPO B								
TRATTATO A SN								
66776	98.02	43.16	39.41	49.11	54.56	28.83	48.53	32.91
60027	95.31	100	51.28	37.20	75.75	36.06	65.12	16.43
70137	100	91.66	31.74	52.56	51.18	39.12	82.42	65.08
76357	87.84	83.30	26	40.01	56.11	11.18	77.10	37.18
66766	94.14	92.77	22.01	22.92	58.38	47.10	47.62	29.62
76352	47.17	80.69	43.61	72.03	65.51	3.29	64.88	11.05
MEDIA	Tratt: 91.60		Tratt: 44.14		Tratt: 53.55		Tratt: 59.63	
	Non tratt: 88.35		Non tratt: 40.085		Non tratt: 47.24		Non tratt: 31.82	

Tabella 4 Rigidit   dei tendini a T_0 , T_1 , T_2 e T_3 valutata tramite elastosonografia.

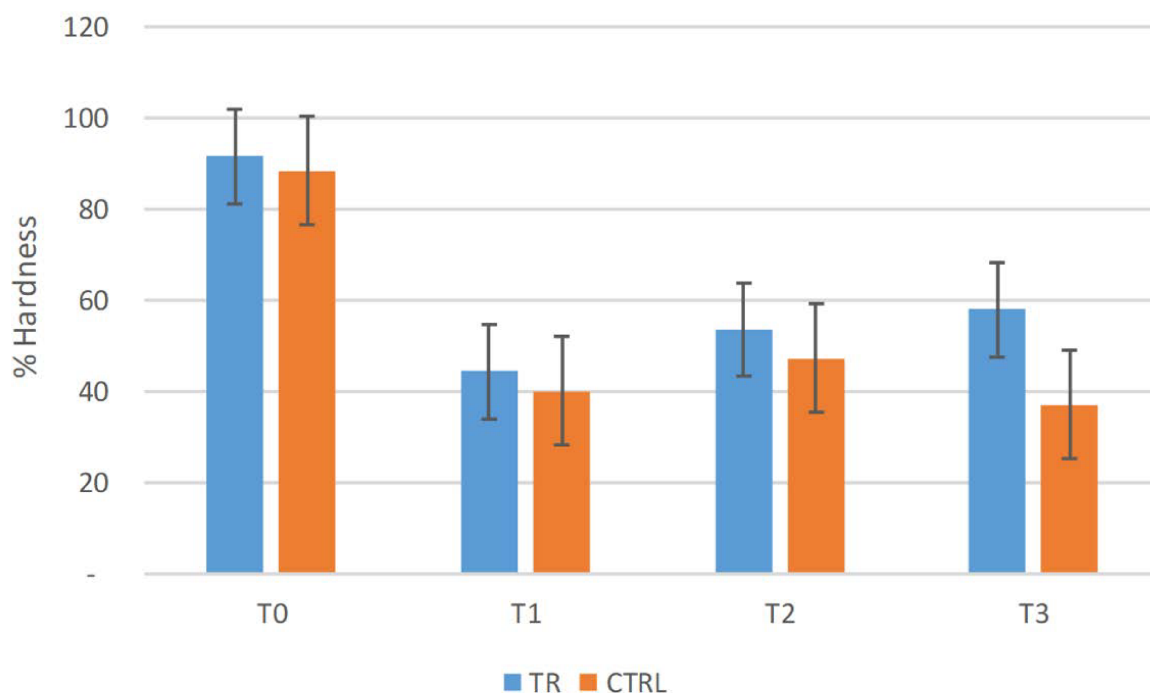


Figura 32 Test ranghi WILCOX che mostra aumento delle percentuali di Hardness statisticamente significativo nel gruppo trattato a T₃ rispetto al controllo

8.3 Valutazione istologica

I risultati riguardo l'orientamento delle fibre (FOS) e i criteri valutativi strettamente morfologici (FES, FOS e NEC) sono riportati nella Tabella 5. Nel gruppo trattato il punteggio medio di FOS, FES, FIS e NEC è stato 4.3, mentre nel gruppo non trattato è stato 8.8.

L'analisi statistica ha permesso di dimostrare una differenza statisticamente significativa tra il grado di riparazione tissutale del gruppo trattato rispetto al gruppo non trattato.

Nel gruppo trattato il pattern longitudinale delle fibre si è dimostrato essere più allineato e meno danneggiato ($p=0.005$), così come migliori sono stati i parametri inerenti alla presenza di necrosi ($p=0.005$), il processo infiltrativo infiammatorio ($p=0.03$) e la presenza di edema/ aspetto mixoide ($p=0.03$) dell'area tendinea esaminata. I risultati, quindi, hanno mostrato delle differenze significative tra i tendini appartenenti al gruppo trattato e quelli del gruppo controllo. Il confronto a livello microscopico è osservabile nell'immagine sottostante.



Figura 33 T₃: prelievo biotico

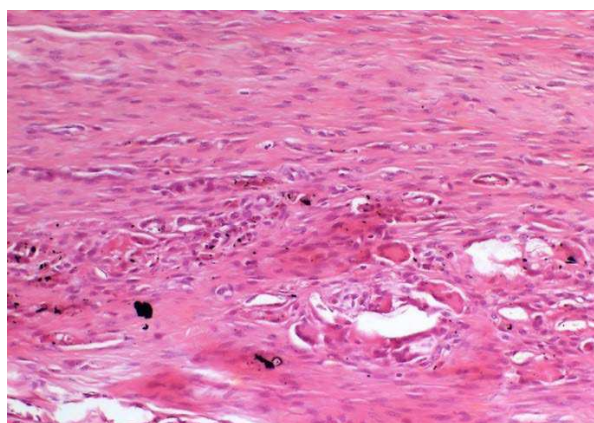


Figura 34 Tendine appartenente al gruppo controllo. Si evidenzia una lesione centrale di tipo microgranulomatoso con alcune cellule giganti tipo Langherans associate a infiltrato linfomonocitario (freccia). Si nota anche la presenza di fenomeni necrotici e una ipernucleosi reattiva delle fibre connettivali intorno all'area di lesione.

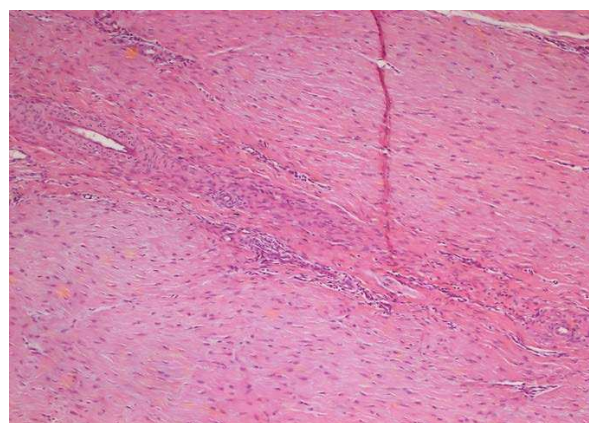


Figura 35 Tendine appartenente al gruppo trattato. Si nota una corretta disposizione delle nuove fibre collagene deposte nell'area di lesione caratterizzate da tipico andamento parallelo e da assenza di aree di vortice delle fibre

OVINI	FOS		FES		FIS		NEC		SOMMA	
GRUPPO A TRATTATO A DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX	SN	DX
40173	2	1	1	1	1	0	2	0	5	2
49356	3	1	3	2	3	3	3	0	12	6
49357	2	2	3	1	3	2	2	0	10	5
76382	3	1	3	1	3	1	2	0	11	3
76351	2	1	1	0	1	1	1	0	5	2
84735	1	0	1	0	1	0	1	0	4	0
GRUPPO A TRATTATO A DX										
66776	1	3	2	2	1	3	0	2	4	10
60027	3	3	2	2	2	2	3	3	10	10
70137	0	3	1	2	0	2	0	2	1	9
76357	3	3	1	2	2	3	3	3	9	11
66766	2	3	2	3	2	3	2	3	8	12
76352	0	2	1	1	1	1	0	1	2	5
MEDIA	Tratt: 1.25		Tratt: 1.17		Tratt: 1.25		Tratt: 0.67		Tratt: 4.3	
	Non tratt: 2.50		Non tratt: 1.84		Non tratt: 2.17		Non tratt: 2.08		Non tratt: 8.8	

Tabella 5 Valutazioni istologiche dei parametri FOS, FES, FIS e NEC con uno score compreso tra 0-3 (i valori più bassi sono associati ad una migliore guarigione tendinea).

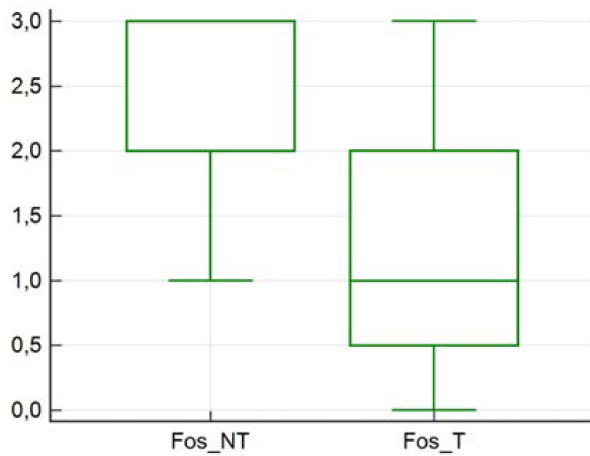


Figura 36 Il grafico mostra i valori di FOS nei tendini trattati (T) e in quelli non trattati (NT).

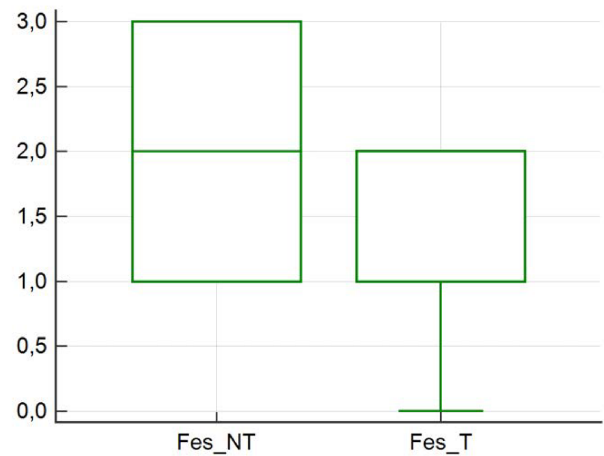


Figura 37 Il grafico mostra i valori di FES nei tendini trattati (T) e in quelli non trattati (NT).

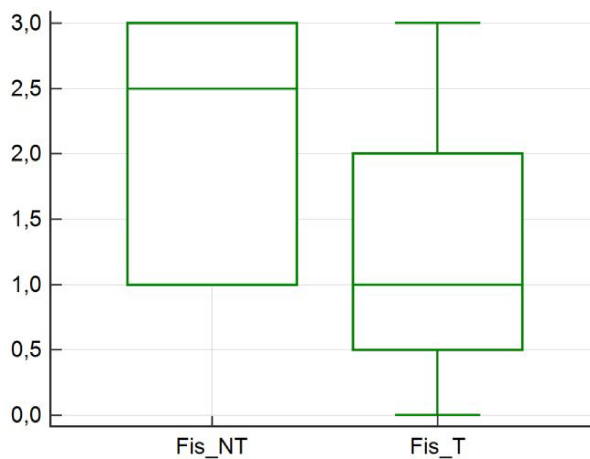


Figura 38 Il grafico mostra i valori di FIS nei tendini trattati (T) e in quelli non trattati (NT).

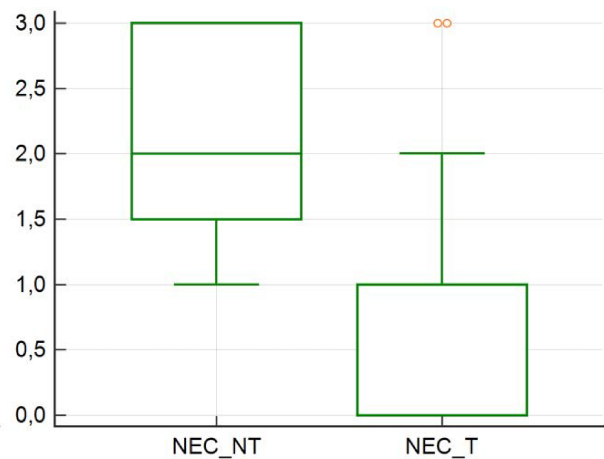


Figura 39 Il grafico mostra i valori di NEC nei tendini trattati (T) e in quelli non trattati (NT).

CAPITOLO 9

Discussione dei risultati e conclusioni

Come già affermato in precedenza, il trattamento delle tendinopatie rappresenta ancora ad oggi una sfida complessa per la medicina. Sebbene questo tipo di patologia sia abbastanza frequente nella popolazione, attualmente, non si annovera ancora tra le numerose terapie disponibili una soluzione che, nella maggior parte dei pazienti, abbia dato risultati soddisfacenti e omogenei a lungo termine.

Nel 2008 Andres e Murrell (1) hanno effettuato una revisione approfondita della letteratura dove sono stati inclusi 177 lavori al fine di fornire un quadro completo delle varie opzioni di trattamento con raccomandazioni basate sul miglior livello di evidenza disponibile. I risultati di questa review suggerivano che i metodi di trattamento tradizionali, incluso un breve ciclo di FANS e terapia fisica (esercizi di rafforzamento eccentrico), costituissero un trattamento di prima linea accettabile ma non sempre efficace visto che, come è noto, la terapia fisica raramente è del tutto risolutiva e i corticosteroidi forniscono un temporaneo sollievo dal dolore ma non sembrano avere particolari benefici a lungo termine. Anche le altre opzioni di trattamento analizzate non avevano dato alcun risultato degno di nota, tranne un promettente accenno alla terapia basata sull'utilizzo delle cellule staminali, sulle quali ancora le conoscenze erano relativamente scarse.

Negli ultimi due decenni le cellule staminali mesenchimali (MSC) hanno assunto un'importanza sempre maggiore nell'ambito degli innesti e della riparazione del tessuto tendineo. Juncosa-Melvin et al. in uno studio sui conigli (145) hanno dimostrato che l'introduzione di MSC autologhe a livello del tendine patellare lesionato migliorava notevolmente il processo riparativo, inoltre l'allineamento delle fibrille si presentava molto simile alla struttura del tendine sano.

Soon et al. (146) affermano che l'applicazione di MSC sull'interfaccia tendine-osso durante l'allotrapianto per la ricostruzione del legamento crociato anteriore nei conigli, migliora l'osteointegrazione, ponendo le basi per una precoce e più fisiologica guarigione.

Anche Chong et al. (147) hanno utilizzato cellule staminali derivate dal midollo osseo su un modello di riparazione del tendine di Achille di coniglio, e hanno riferito che l'aggiunta delle cellule staminali in un vettore di fibrina ha comportato un aumento del modulo e una

migliore organizzazione del collagene rispetto ai tendini che fungevano da controllo a 3 settimane. Come si può notare, un importante limite di questi studi è il fatto che tutti si basano su un modello animale perciò, anche se i risultati sono stati positivi, è necessario che essi vengano ulteriormente confermati anche su pazienti umani. Inoltre, non bisogna dimenticare il fatto che in generale esiste un numero ristretto di studi che si concentra sugli effetti delle MSC sul tessuto tendineo rispetto a quelli che prendono in considerazione il tessuto osseo o cartilagineo.

Più recentemente, in uno studio su 43 pazienti, Albano e colleghi (148) hanno visto che le iniezioni di SVF di origine adiposa sembrano consentire benefici clinici nei pazienti con tendinopatia Achillea, così come le iniezioni di PRP.

Dello stesso parere sono anche Uselli e collaboratori (149), che hanno confrontato l'efficacia delle iniezioni di SVF rispetto a quelle di PRP nel trattamento della tendinopatia Achillea, in uno studio in cui sono stati inclusi 44 pazienti. Anche se entrambe le opzioni si sono dimostrate sicure ed efficaci, lo studio mostra come la terapia con SVF abbia dato risultati migliori in meno tempo: già dopo 15 giorni si evidenziava infatti un notevole sollievo dal dolore e di conseguenza una buona ripresa della funzionalità. È bene sottolineare la grande importanza di questi studi, in quanto sono tra i pochi che si sono concentrati sull'utilizzo di SVF sul tessuto tendineo prendendo in considerazione pazienti e non animali.

Anche Maffulli et al (150) in un recentissimo studio hanno affermato che il trattamento con MSC sotto forma di SVF si è dimostrato sicuro e promettente, ponendo però l'accento sulla disponibilità estremamente ridotta di queste terapie in quanto si tratta per ora di procedure solo sperimentali e comunque molto costose.

In questo scenario si colloca il nostro studio sperimentale in vitro e in vivo.

I risultati di questo studio hanno messo in evidenza innanzitutto un'importante differenza tra il processo riparativo e rigenerativo che si è instaurato nei tendini trattati rispetto a quelli non trattati, facendo ipotizzare un'effettiva capacità rigenerativa indotta dall'utilizzo della frazione vascolo stromale da grasso nel trattamento delle tendinopatie.

Il tendine calcaneale comune è stato facilmente esplorabile all'esame ultrasonografico ed elastosonografico, in tutte le sue porzioni, grazie alla sua posizione superficiale. Così come riportato in letteratura, l'ecografia condotta in B-Mode non ha consentito di valutare quantitativamente la gravità della lesione tendinea e di intercettare la progressione della guarigione, pertanto ha permesso soltanto di avere una visione qualitativa (sano/malato) del

tendine calcaneale comune (151). Nell'immagine in B-Mode non si sono rilevate differenze nello spessore tra i tendini trattati e quelli del gruppo controllo, né tantomeno riguardo all'evoluzione del processo di guarigione tendinea. Tale reperto era abbastanza prevedibile, a fronte delle conoscenze riportate in letteratura, ed è stato probabilmente esacerbato dal fatto che a T1 i tendini trattati hanno ricevuto SVF veicolata in 2,5 ml di liquido che hanno creato, rispetto ai tendini controllo, una sovradistensione delle fibre tendinee.

L'elastosonografia, invece, ci ha permesso di valutare quantitativamente il processo di riparazione tissutale e misurare la ripresa funzionale del tendine in termini di rigidità (hardness), in accordo con quanto affermato da Coombes et al (152).

Dopo l'inoculazione della collagenasi, il tendine è divenuto significativamente soffice (soft) e progressivamente si è avuto un recupero parziale della rigidità (hardness). Questo progressivo miglioramento è stato appunto evidenziato a T3 da un aumento della percentuale di rigidità (hardness) nel gruppo trattato rispetto al controllo, analogamente a quanto riportato da Dirrichs T. et al (153), in uno studio condotto sui tendini di 112 pazienti. Nel nostro studio, inoltre, abbiamo riscontrato difficoltà nell'acquisizione di immagini elastosonografiche in scansione trasversale, in quanto non eravamo in possesso di una sonda di dimensione tali da indagare una struttura anatomica esile quale è il tendine calcaneale comune della pecora, pertanto sono state prese in considerazione solamente le immagini elastosonografiche condotte in scansione longitudinale.

A livello istologico un dato che emerge è, come già riportato nei risultati, la minore incidenza di necrosi, presenza di edema/aspetto mixoide, infiltrato infiammatorio e un miglior allineamento delle fibre di collagene nei tendini trattati, analogamente a quanto descritto da Carvalho AM. et al (154), in uno studio sperimentale condotto sul tendine del flessore digitale superficiale del cavallo.

In accordo con Uselli et al (149), l'effetto principale delle iniezioni di SVF è stato quello di innescare un importante processo antinfiammatorio nei soggetti trattati con microinnesti adiposi e un miglioramento significativo nell'organizzazione della struttura tendinea danneggiata. Esistono diversi meccanismi che modulano gli effetti antinfiammatori delle cellule staminali presenti nella SVF, i quali favoriscono la riparazione del tendine. Questi includono un aumento delle chemochine, la soppressione della secrezione di citochine da parte delle cellule dendritiche e una riduzione degli effetti dei linfociti T e delle cellule natural killer. Questi dati evidenziano i potenti effetti antinfiammatori ed immunosoppressivi

di queste cellule.

I risultati ottenuti ci permettono di rafforzare la teoria che date le ampie proprietà antinfiammatorie e immunomodulatrici delle molecole rilasciate dalle cellule presenti nella SVF, queste possano fornire delle alternative concrete nel trattamento delle tendinopatie, sostituendo le tradizionali terapie antinfiammatorie (149).

Riassumendo, questo studio ha evidenziato un accordo totale tra l'elastosonografia e i risultati istologici, mentre l'ultrasonografia in B-Mode ha presentato una precisione diagnostica molto inferiore.

Sarebbe stato molto interessante analizzare ulteriormente gli animali a 6 mesi post-trattamento per valutare se la guarigione indotta dalla frazione vascolo stromale da grasso potesse progressivamente scemare o sarebbe ulteriormente progredita verso una restitutio ad integrum, ma non è stato possibile effettuare questa valutazione in quanto il nostro studio è terminato dopo 60 giorni post-trattamento, per non indurre eccessiva sofferenza negli animali usati a fini sperimentali.

In conclusione, possiamo affermare con certezza che, a 2 mesi post inoculazione, il processo di riparazione dei tendini trattati con terapia basata sull'impianto di cellule derivanti dalla frazione vascolo-stromale è stato sicuramente migliore rispetto a quello osservabile nei tendini non trattati, sia in termini di rigidità tendinea, valutata tramite elastosonografia, sia dal punto di vista istologico.

Nonostante i risultati del nostro studio sembrino essere incoraggianti, non bisogna dimenticare, come già discusso precedentemente, che si tratta pur sempre di una procedura effettuata sugli animali, e che gli studi che si concentrano sulla terapia con SVF su soggetti umani sono estremamente limitati.

Nondimeno, questa tecnica ha sicuramente costi superiori rispetto ai classici trattamenti che si sta cercando di sostituire. Tuttavia, i trattamenti tradizionali sono spesso solo palliativi; teoricamente, i prodotti biologici offrono una soluzione più duratura e l'opportunità di rigenerare i tessuti.

Questo studio ha mostrato ulteriormente l'efficacia e la sicurezza dell'utilizzo dell'SVF nelle tendinopatie, dunque apre certamente un nuovo scenario nell'utilizzo dell'SVF nella comune pratica clinica anche nell'uomo.

Ulteriori studi sono sicuramente necessari per una comprensione più chiara dei meccanismi d'azione sottostanti, e per la comprensione delle caratteristiche cruciali della patologia da

trattare. Ciò consentirà, da un lato, il miglioramento dei prodotti biologici e delle procedure di applicazione, e dall'altro, la stratificazione dei pazienti secondo criteri biologici e clinici. Questi aspetti, messi insieme, aumenteranno l'efficacia dei trattamenti biologici e aiuteranno a far avanzare il campo della gestione delle lesioni muscoloscheletriche sportive e non.

Take home message

I punti principali del nostro studio sperimentale sono:

- sono stati ottenuti ottimi risultati clinici che correlano con quelli ecografici ed istologici;
- la somministrazione di SVF ottenuto mediante sistema Rigenera può essere un valido strumento nella gestione delle tendinopatie;
- la SVF ha azione omeostatica, immuno-modulatoria ed antinfiammatoria a livello tendineo;
- la capacità rigenerativa del tendine rimane da verificare, a causa della durata limitata dello studio.

Ringraziamenti

Tantissime volte dall'inizio di questo percorso ho immaginato il giorno in cui mi sarei seduta a scrivere le righe conclusive sull'ultima pagina della mia tesi, e oggi la situazione mi sembra quasi surreale.

Sono stati sei lunghi anni, fatti di alti e bassi, ricchi di esperienze, qualche soddisfazione, e anche molte lacrime (forse troppe). Quello che so per certo, è che se sono arrivata fin qui è stato grazie a tanta forza di volontà, ma sicuramente anche il contributo di alcune persone a me vicine è stato fondamentale.

Al professor Gigante e al professor Riccio, per avermi dato la possibilità di partecipare a questo progetto

Alla dott.ssa Letizia, per i suoi preziosi consigli, per le rassicurazioni e per gli incoraggiamenti dati durante la stesura di questo lavoro

A Debora, Alessandro, Mattia e Marco, che fin dall'inizio sono stati i miei più grandi sostenitori

Ai miei genitori, per avermi sempre dato tutto, e soprattutto per avermi fatto sentire a casa anche quando ero lontano

A Federica, che inconsapevolmente è da sempre la mia più grande ricchezza

A Luca, per tutto quello che abbiamo condiviso, e solo noi sappiamo

Grazie.

Bibliografia

- (1) Andres BM, Murrell GA. Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:1539-1554
- (2) Alfredson H, Ljung BO, Thorsen K, Lorentzon R: In VIVO investigation of ECRB tendons with microdialysis technique - no signs of inflammation but high amounts of glutamate in tennis elbow. *Acta Orthop Scand* 2000;71:475-479
- (3) Alfredson H., Forsgren S., Thorsen K., Lorentzon R. In VIVO micro- dialysis and immunohistochemical analyses of tendon tissue demonstrated high amounts of free glutamate and glutamate NMDAR1 receptors, but no signs of inflammation, in Jumper's knee. *J Orthop Res* 2001; 19: 881-886
- (4) Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, Werner S, Paganelli R. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):235
- (5) Sandelin J, Santarvirta S. Occurrence and epidemiology of sports injuries in Finland. *Ann Chir Gynaecol* 1991;80:95–99
- (6) Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med.* 2003 Oct; 22(4):675-692
- (7) Cook JL, Purdam CR. Is tendon pathology a continuum? A pathology model to explain the clinical presentation of load-induced tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2009;43:409-416
- (8) Maffulli N, Longo UG, Denaro V. Novel Approaches for the Management of Tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92:2604-2613
- (9) Bisciotti GN. I tendini biologia, patologia aspetti clinici Vol 1 Ed. Calzetti Mariucci, Perugia 2013
- (10) Fredberg U, Stengaard-Pedersen K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation. *Scand J Med Sci Sports* 2008;18:3–15
- (11) Nourissat G, Berenbaum F, Duprez D. Tendon injury: from biology to tendon repair. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:223–233
- (12) Magnan B., Bondi M., Pierantoni S., Samaila E. The pathogenesis of Achilles tendinopathy: a systematic review. *Foot Ankle Surg.* 2014;20:154–159

- (13) Wong J, Barrass V, Maffulli N. Quantitative review of operative and nonoperative management of achilles tendon ruptures. *Am J Sports Med* 2002;30(4):565 – 575
- (14) Ribbans WJ, Collins M. Pathology of the tendo Achillis: do our genes contribute? *Bone Joint J.* 2013;95B:305–313
- (15) Crass JR, Genovese RL, Render JA, Bellon EM. Magnetic resonance, ultrasound and histopathologic correlation of acute and healing equine tendon injuries. *Vet Radiol Ultrasound* 1992;33(4):206-216
- (16) Khaliq Y, Zhanel GG. Fluoroquinolone-Associated Tendinopathy: A Critical Review of the Literature. *Clin Infect Dis.* 2003June;36(11):1404–1410
- (17) Jagose JT, McGregor DR, Nind GR, Bailey RR. Achilles tendon rupture due to ciprofloxacin. *N Z Med J* 1996;109:471–472
- (18) Casparian JM, Luchi M, Moffat RE, Hinthorn D. Quinolones and tendon ruptures. *South Med J* 2000;93(5):488–491
- (19) Alfredson H, Forsgren S, Thorsen K, Lorentzon R. High intratendinous lactate levels in painful chronic Achilles tendinosis. An investigation using microdialysis technique. *J Orthop Res* 2002;20:934–938.
- (20) Kannus P. Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7:78–85
- (21) Khan KM, Cook JL, Bonar F, et al. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med* 1999;27(6):393 – 408
- (22) Archambault JM, Wiley JP, Bray RC. Exercise loading of tendons and the development of overuse injuries. A review of current literature. *Sports Med* 1995;20:77–89
- (23) Kujala UM, Sarna S, Kaprio J. Cumulative incidence of achilles tendon rupture and tendinopathy in male former elite athletes. *Clin J Sport Med* 2005;15:133–135
- (24) Pedersen BK, Hoffmann-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000;80:1055–1079
- (25) Hashimoto T, Nobuhara K, Hamada T. Pathologic evidence of degeneration as a primary cause of rotator cuff tear. *Clin Orthop Relat Res.* 2003 Oct; (415): 111-120
- (26) Tallon C, Maffulli N, Even SW. Ruptured Achilles tendons are significantly more degenerated than tendinopathic tendons. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Dec;33(12):1983-1990
- (27) Yang G, Im HJ, Wang JH. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1beta

- induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts. *Gene*. 2005 Dec 19;363: 166-172
- (28) Shadwick RE. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J. Appl. Physiol.* 1990; 68, 1033 -1040
 - (29) Nagakawa Y., Hayashi K., Yamamoto N., Nagashima K. Age-related changes in biomechanical properties of the Achilles tendon in rabbits. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1996; 73, 7-10.
 - (30) Flahiff CM., Brooks AT., Hollis JM., van der Schilden JL., Nicholas RW. Biomechanical analysis of patellar tendon allografts as a function of donor age. *Am J Sports Med.* 1995; 23, 354-358.
 - (31) Narici MV., Maganaris CN. Adaptability of elderly human muscles and tendons to increased loading. *J. Anat.* 2006; 208: 433-443.
 - (32) James SL, Bates BT, Osternig LR. Injuries to runners. *Am J Sports Med* 1978;6(2):40 – 50
 - (33) Kannus P, Niittymäki S, Jarvinen M, et al. Sports injuries in elderly athletes: a three year prospective, controlled study. *Age Ageing* 1989;18:263 – 70.
 - (34) Kvist M. Achilles tendon injuries in athletes. *Ann Chir Gynaecol* 1991;80:188 – 201
 - (35) Maffulli N, Kader D. Tendinopathy of tendo achillis. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84(1):1 – 8
 - (36) Kvist M. Achilles tendon overuse injuries: a clinical and pathophysiological study in athletes [dissertation]. Finland: Turku University; 1991
 - (37) Rolf C, Movin T. Etiology, histopathology, and outcome of surgery in achillodynia. *Foot Ankle Int* 1997;18:565 – 9
 - (38) Kvist H, Kvist M. The operative treatment of chronic calcaneal paratenonitis. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62:353 – 7
 - (39) Paavola M, Orava S, Leppilahti J, et al. Chronic Achilles tendon overuse injury: complications after surgical treatment. An analysis of 432 consecutive patients. *Am J Sports Med* 2000;28(1):77 – 82
 - (40) Paavola M, Kannus P, Paakkala T, et al. Long-term prognosis of patients with Achilles tendinopathy. *Am J Sports Med* 2000;28(5):634 – 42.
 - (41) Campbell R, Grainger AJ. Current Concepts in Imaging of Tendinopathy. *Clin Radiol.* 2001;5:253–267

- (42) Docking SI, Ooi CC, Connel D. Tendinopathy: Is Imaging Telling Us the Entire Story? *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* Nov 2015;45(11):842-854
- (43) Archambault JM, Wiley JP, Bray RC, Verhoef M, Wiseman DA, Elliot PD. Can sonography predict the outcome in patients with Achillodynia? *J Clin Ultrasound* Sep 1998;26(7):335-339
- (44) Malliaras P, Purdam C, Maffulli N, Cook J. Temporal sequence of greyscale ultrasound changes and their relationship with neovascularity and pain in the patellar tendon. *Br J Sports Med.* 2010;44:944-947
- (45) Rasmussen OS. Sonography of tendons. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10:360-364
- (46) Weinberg EP, Adams MJ, Hollenberg GM. Color Doppler sonography of patellar tendinosis. *Am J Roentgenol.* 1998;171:743-744
- (47) Ooi CC, Schneider M, Malliaras P, Chadwick M, Connell DA. Diagnostic Performance of Axial-Strain Sonoelastography in Confirming Clinically Diagnosed Achilles Tendinopathy: Comparison with B-Mode Ultrasound and Color Doppler Imaging. *Ultrasound Med Biol.* Jan 2015;41(1):15-25
- (48) Weinreb JH, Sheth C, Apostolakis J, McCarthy MB, Barden B, Cote MP, Mazzocca AD. Tendon structure, disease, and imaging. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4:66-73
- (49) Grosse U, Syha R, Martirosian P, et al. Ultrashort echo time MR imaging with off-resonance saturation for characterization of pathologically altered Achilles tendons at 3 T. *Magn Reson Med.* 2013;70:184-192
- (50) Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse Tendon Conditions: Time to Change a Confusing Terminology. *Arthroscopy* 1998 Nov-Dec; 14(8): 840-843
- (51) Selvanetti A, Cipolla M, Puddu G. Overuse tendon injuries: basic science and classification. *Oper Tech Sports Med* 1997 Jul; 5(3):110-117
- (52) Bréchet N, Gomez E, Bignon M, Khallou-Laschet J, Dussiot M, Cazes A, Alanio-Bréchet C, Durand M, Philippe J, Silvestre JS, Van Rooijen N, Corvol P, Nicoletti A, Chazaud B, Germain S, modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. *PLoS One.* 2008;3(12):e3950
- (53) Hays PL, Kawamura S, Deng XH, Dagher E, Mithoefer K, Ying L, Rodeo SA. The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel. *J Bone Joint*

- Surg Am 2008 Mar;90(3):565-579.
- (54) Molloy T, Wang Y, Murrell G.A.C. The Roles of Growth Factors in Tendon and Ligament Healing. Sports Med 2003;33(5): 381-394
 - (55) Tsubone T, Moran S.L, Subramaniam M, Amadio P.C., Spelsberg T.C, An K.N. Effect of TGF-b Inducible Early Gene Deficiency on Flexor Tendon Healing. J Orthop Res 2006 Mar;24:569-575
 - (56) Anitua E., Sanchez M., Nurden AT., Zalduendo M., De La Fuente M., Azofra J., Andia I. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. Plast Reconstr Surg. 2007 Mar;119(3):950-959
 - (57) Ferrara N., Gerber HP., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003 Jun;9(6):669-676
 - (58) Chan BP., Chan KM., Maffulli N., Webb S., Lee KK. Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. Clin Orthop Relat Res. 1997 Sep;(342):239-247
 - (59) Chan BP., Fu S., Qin L., Lee K., Rolf CG., Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. Acta Orthop Scand. 2000;71(5):513-518
 - (60) Maffulli N, Longo UG. Conservative management for tendinopathy: is there enough scientific evidence? Rheumatology (Oxford). 2008;47:390-391
 - (61) Stasinopoulos D., Manias P. Comparing two eccentric exercise programmes for the management of Achilles tendinopathy. A pilot trial. J. Of Bodywork and movement ther. 2013;17:309-315
 - (62) Maffulli N., Longo UG., Loppini M., Denaro V. Current treatment options for tendinopathy. Expert Opin Pharmacoter. 2010;11 (13):2177-2186
 - (63) Maffulli N, Longo UG. How do eccentric exercises work in tendinopathy? Rheumatology (Oxford) 2008;47(10):1444-5
 - (64) De Bie R A, Verhagen A P, Lenssen A F, de Vet H C, van den Wildenberg F A, Kootstra G, Knipschild P G. Efficacy of 904 nm laser therapy in musculoskeletal disorders. Physical Therapy Reviews. 1998;3(2):59-72.
 - (65) Bjordal J, Couppé C, Ljunggreen A. Low level laser therapy for tendinopathy. Evidence of a dose-response pattern. Physical Therapy Reviews. 2001;6(2):91-99
 - (66) Rompe JD, Nafe B, Furia JP, Maffulli N. Eccentric loading, shock-wave treatment,

- or a wait-and-see policy for tendinopathy of the main body of tendo Achillis: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med* 2007;35(3):374-83
- (67) Maffulli N. Re: Etiologic factors associated with symptomatic Achilles tendinopathy. *Foot Ankle Int* 2007;28-5:660; author reply 1
- (68) Maffulli N, Testa V, Capasso G, Bifulco G, Binfield PM. Results of percutaneous longitudinal tenotomy for Achilles tendinopathy in middle- and long-distance runners. *Am J Sports Med* 1997;25(6):835-840
- (69) Kapetanios G. The effect of the local corticosteroids on the healing and biomechanical properties of the partially injured tendon. *Clin Orthop Relat Res.* 1982;163:170-179
- (70) Smidt N, Assendelft WJ, van der Windt DA, Hay EM, Buchbinder R, Bouter LM. Corticosteroid injections for lateral epicondylitis: a systematic review. *Pain* 2002;96(1-2):23-40
- (71) Newnham DM, Douglas JG, Legge JS, Friend JAR. Achilles tendon rupture: an underrated complication of corticosteroid treatment. *Thorax* 1991;46:853-854
- (72) Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med* 2009;28(1):113-25
- (73) Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Zambon Bertoja A, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003;24(18): 3095–3100.
- (74) Woodall JR, Tucci M, Mishra A, Benghuzzi H. Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells. *Biomed Sci Instrum* 2007;43:266–271.
- (75) Woodall J Jr, Mishra A, Tucci M, Benghuzzi H. Cellular Effects of Platelet Rich Plasma: Interleukin-1 release from PRP treated macrophage cells. *Biomed Sci Instrum* 2008;44:489–94.
- (76) Sharma P, Maffulli N. Tendinopathy and tendon injury: The future *Disabil Rehabil* 2008;30(20–22):1733–1745
- (77) Nakamura N, Timmermann SA, Hart DA, Kaneda Y, Shrive NG, Shino K, Ochi T, Frank CB. A comparison of in vivo gene delivery methods for antisense therapy in ligament healing. *Gene Ther* 1998;5(11):1455 – 1461
- (78) Dai Q, Manfield L, Wang Y, Murrell GA. Adenovirus- mediated gene transfer to

- healing tendon: Enhanced efficiency using a gelatin sponge. *J Orthop Res* 2003;21:604 – 609
- (79) Jayankura M, Boggione C, Frisen C, Boyer O, Fouret P, Saillant G, Klatzmann D. In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J Gene Med* 2003;5:618 – 624
 - (80) Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizukami H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. *Plast Reconstr Surg* 2007;119(1):227 – 234
 - (81) Tremolada C, Beltrami G, Magri A, Bianchi F, Ventura C, Di Vito C, Campanella R, Navone SE, Marfia G. Adipose mesenchymal stem cells and “regenerative adipose tissue graft” (Lipogems™) for musculoskeletal regeneration. *Eur J Musculoskeletal Dis* 2014;3:57–67.
 - (82) Noth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:765-83
 - (83) Rodriguez-Fontan F, Piuze NS, Chahla J, et al. Stem and Progenitor Cells for Cartilage Repair: Source, Safety, Evidence, and Efficacy. *Oper Tech Sports Med*. 2017;25(1):25-33
 - (84) Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C. Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. *J Biomed Biotechnol*. 2003;2003(3):170-193
 - (85) Muschler C G, Griffith LG. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *J Bone Jt Surg Am*. 2004;86:1541-1558
 - (86) Le Blanc K, Davies LC. MSCs—cells with many sides. *Cytotherapy*. 2018;20(3):273-278
 - (87) Gao F, Chiu SM, Motan DAL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7(1):e2062.
 - (88) Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother*. 2016;2(1):3-20
 - (89) De Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, et al. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells*. 2018;36(4):602-615

- (90) Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *Methods*. 20008;45(2):115-120
- (91) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(December):4279-4295
- (92) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, and Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95
- (93) Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP- 6. *J Cell Physiol* 2007;211:682-91.
- (94) Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tianet W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005;9:929-39.
- (95) Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; 36(S):20-7.
- (96) Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: A review of current status. *Stem Cells* 2003;21:610-619
- (97) Cowan CM, Shi YY, Aalami OO Yu-Fen Chou, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose- derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; 22:560-567
- (98) Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, Mannerström B, Miettinen S, Suuronen R, Öhman J. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery* 2011;68:1535-1540
- (99) Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, Sun J, Guo J, Zhang X, Guo J, Yu P, Li C, Liu X, Huang Z, Wang D, Li H, Gu Z, Liu B, Li Z. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R210.
- (100) Zhou B, Yuan J, Zhou Y, Ghawji M, Deng YP, Lee AJ, Lee AJ, Nair U, Kang AH, Brand DD, Yoo TJ. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. *Clin Immunol* 2011;141:328-337

- (101) Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, Zogas N, Kaloyannidis P, Batsis I, Fassas A, Anagnostopoulos A, Yannaki E. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in preclinical models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1733-1740.
- (102) Schultz E, McCormic KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1994;123:213–257
- (103) Heslop L, Morgan JE, Partridge TA. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci.* 2000;113:2299–2308.
- (104) Somasundaram Indumathi S, Mishra R, Harikrishnan R, Dhanasekaran M. Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Advancement and Applications in Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine* ed. Springer, London 2015;91-112
- (105) Schultz E, Lipton BH. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1982;20:377–83.
- (106) Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(1):199–209; discussion 210–191
- (107) Bacou F, El Andalousi RB, Daussin PA, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant.* 2004;13(2): 103–111.
- (108) Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A. Myogenic potential of adipose tissue derived cells. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 14):2945–2952.
- (109) Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, et al. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol Cell.* 2008;100:231–241.
- (110) Crossett LS, Sinha RK, Sechriest VF, Rubash HE. Reconstruction of a ruptured patellar tendon with Achilles tendon allograft following total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:1354-1361.
- (111) Chiou HM, Chang MC, Lo WH. One-stage reconstruction of skin defect and patellar tendon rupture after total knee arthroplasty. A new technique. *J Arthroplasty* 1997;12:575-579
- (112) Connell D, Datir A, Alyas F et al. Treatment of lateral epicondylitis using skin-derived tenocyte-like cells. *Br J Sports Med* 2009;43:293-298
- (113) Hankemeier S, Hurschler C, Zeichen J et al. Bone marrow stromal cells in a liquid

- fibrin matrix improve the healing process of patellar tendon window defects. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:1019- 1030
- (114) Nourissat G, Diop A, Maurel N et al. Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model. *PLoS One* 2010; 5:e12248
 - (115) Lim JK, Hui J, Li L et al. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2004; 20:899-910
 - (116) Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells. *J Biol Chem*. 1964;239(2):375-380
 - (117) Semon JA, Maness C, Zhang X, et al. Comparison of human adult stem cells from adipose tissue and bone marrow in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):2
 - (118) Eto H, Suga H, Matsumoto D, et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(4):1087-1097
 - (119) Van Dongen JA, Tuin AJ, Spiekman M, Jansma J, van der Lei B, Harmsen MC. Comparison of intraoperative procedures for isolation of clinical grade stromal vascular fraction for regenerative purposes: a systematic review. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(1):e261-e274
 - (120) Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. Adipose-derived stem cells for clinical applications: A review. *Cell Prolif*. 2011;44(1):86-98
 - (121) Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(3):230-236
 - (122) Carswell KA, Lee M, Fried SK. *Human Cell Culture Protocols*. 2012;806(6):1-11
 - (123) Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A*. 2013;83(1):134-140
 - (124) Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, et al. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol*. 2014;29(7):831-870

- (125) Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, Cifone M, Cinque B, Giuliani M. Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1897
- (126) Menck K, Behme D, Pantke M, et al. Isolation of Human Monocytes by Double Gradient Centrifugation and Their Differentiation to Macrophages in Teflon-coated Cell Culture Bags. *J Vis Exp.* 2014;(91):1-10
- (127) Estes BT, Diekman BO, Guilak F. Monolayer cell expansion conditions affect the chondrogenic potential of adipose-derived stem cells. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99(4):986-995
- (128) Macotella Y, Emanuelli B, Mori MA, et al. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes.* 2012;61(7):1691-1699
- (129) Tchkonina T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, et al. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes.* 2006;55(9):2571-2578
- (130) Adams M, Montague CT, Prins JB, et al. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 1997;100(12):3149-3153
- (131) Alt EU, Senst C, Murthy SN, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res.* 2012;8(2):215-225
- (132) Yoon IS, Chung CW, Sung JH, et al. Proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in porous hyaluronic acid scaffold. *J Biosci Bioeng.* 2011;112(4):402-408
- (133) Yu D-A, Han J, Kim B-S. Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J stem cells.* 2012;5(1):16-22
- (134) Bradley T. Estes and Farshid Guilak. Three-dimensional Culture Systems to Induce Chondrogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2011;702(919):201-217
- (135) Sarker B, Zehnder T, Rath SN, et al. Oxidized Alginate-Gelatin Hydrogel: A Favorable Matrix for Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells in 3D. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017;3(8):1730-1737
- (136) You F, Eames BF, Chen X. Application of extrusion-based hydrogel bioprinting for cartilage tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):8-14

- (137) Debnath T, Shalini U, Kona LK, JVS V, GaddamL SRKS, Chelluri LK. Development of 3D Alginate Encapsulation for Better Chondrogenic Differentiation Potential than the 2D Pellet System. *J Stem Cell Res Ther.* 2015;05(04)
- (138) Madry H, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Johnstone B, Cucchiari M. Transforming Growth Factor Beta-Releasing Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(2):106-125
- (139) Moulisová V, Poveda-Reyes S, Sanmartín-Masiá E, Quintanilla-Sierra L, Salmerón-Sánchez M, Gallego Ferrer G. Hybrid Protein-Glycosaminoglycan Hydrogels Promote Chondrogenic Stem Cell Differentiation. *ACS Omega.* 2017;2(11):7609-7620
- (140) Erickson GR, Rice HE, Awad H, et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(2):763-769
- (141) Wu L, Cai X, Zhang S, Karperien M, Lin Y. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: Perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J Cell Physiol.* 2013;228(5):938-944
- (142) Chen X, Zhang F, He X, et al. Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type i collagen-hydrogel for cartilage engineering. *Injury.* 2013;44(4):540-549
- (143) Trovato L, Monti M, Del Fante C, Cervio M, Lampinen M, Ambrosio L, Redi CA, Perotti C, Kankuri E, Ambrosio G, Rodriguez Y Baena R, Pirozzi G, Graziano A. A New medical device rigeneracons allows to obtain viable micrografts from mechanical disaggregation of human tissues. *J Cell Physiol* 2015; 230:2299-2303
- (144) Purpura V, Bondioli E, Graziano A, Trovato L, Melandri D, Ghetti M, Marchesini A, Cusella De Angelis MG, Benedetti L, Ceccarelli G, Riccio M. Tissue Characterization after a new disaggregation method for skin micro-grafts generation. *J Vis Exp* 2016; 4:e53579
- (145) Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, Dunn MG, Butler DL. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel- collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng.* 2006;12:369–379
- (146) Soon MY, Hassan A, Hui JH, Goh JC, Lee EH. An analysis of soft tissue allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model: a short-term study of

- the use of mesenchymal stem cells to enhance tendon osteointegration. *Am J Sports Med.* 2007;35:962–971
- (147) Chong AK, Ang AD, Goh JC, Hui JH, Lim AY, Lee EH, Lim BH. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:74–81
 - (148) Albano D, Messina C, Uselli FG, De Girolamo L, Grassi M, Maccario C, Bignotti B, Tagliafico A, Sconfienza LM. Magnetic resonance and ultrasound in achilles tendinopathy: Predictive role and response assessment to platelet-rich plasma and adipose-derived stromal vascular fraction injection. *Eur J Radiol* 2017;95:130-135
 - (149) Uselli FG, Grassi M, Maccario C, Viganò M, Lanfranchi L, Montrasio UA, De Girolamo L. Intratendineous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) injection provides a safe, efficacious treatment for Achilles tendinopathy: results of a randomized controlled clinical trial at a 6-month follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2018;26:2000-2010
 - (150) Maffulli N, Andia I. New biotechnologies for musculoskeletal injuries. *Surgeon* 2019;17(4):244-255
 - (151) Klauser AS., Miyamoto H., Tamegger M., Faschingbauer R., Moriggl B., Klima G., Feuchtner GM., Kastlunger M., Jaschke WR.: Achilles tendon assessed with sonoelastography: histologic agreement. *Radiology.* 2013;267(3):837-842
 - (152) Coombes BK., Tucker K., Vicenzino B., Vuvan V., Mellor R., Heales L., Nordez A., Hug F.: Achilles and patellar tendinopathy display opposite changes in elastic properties: A shear wave elastography study. *Scand J Med Sci Sports.* 2018; 28(3):1201-1208
 - (153) Dirrichs T., Quack V., Gatz M., Tingart M., Kuhl CK., Schradling S.: Shear Wave Elastography (SWE) for the Evaluation of Patients with Tendinopathies. *Acad Radiol.* 2016;23(10):1204-1213
 - (154) Carvalho AM, Garcia Alves AL, Galvão Gomesde Oliveira Luis P, Cisneros Álvarez E, Amorim RL, Hussni CA, Deffune E. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J Equine Vet Sci* 2011;31(1):26-34