



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"MEDICINA MOLECOLARE"**

CICLO XXXVII

COORDINATORE Prof. PINTON PAOLO

**VEVICOLE EXTRACELLULARI CONTENUTE NEL TESSUTO ADIPOSO
MICROFRAMMENTATO: UN NUOVO APPROCCIO PER LA TERAPIA DEGLI STADI
PRIMO E SECONDO DELL'ARTRITE DELL'ARTICOLAZIONE BASALE DEL POLLICE**

Settore Scientifico Disciplinare MED/26a

Dottorando

Dott. Francesco De Francesco

Tutore

Prof. Barbara Zavan

Anni 2021/2024

A Tiziana, Rachele e Marilù...

Grazie per essere la mia roccia nei momenti difficili

Grazie per la vostra forza inesauribile che mi ispira ogni giorno.

Il vostro supporto incondizionato è il motore che mi spinge avanti, e la vostra capacità di sopportare le sfide con un sorriso è un esempio che porto nel cuore.

ABSTRACT

L'Ingegneria Tissutale è stata riconosciuta da molti anni come uno dei temi più rilevanti nella medicina del ventunesimo secolo. Sebbene i primi sforzi clinicamente significativi nel campo dell'ingegneria tissutale si siano concentrati principalmente sulla bioingegneria di sostituti dermici, le applicazioni si sono successivamente ampliate a un'ampia gamma di tessuti e organi. L'emergere di cellule staminali adulte ha agevolato la transizione dall'ingegneria tissutale alla medicina rigenerativa. La medicina rigenerativa è un campo interdisciplinare emergente focalizzato sulla riparazione o rigenerazione di tessuti e organi al fine di ripristinare funzioni alterate causate da vari fattori, tra cui difetti congeniti, malattie e lesioni. Il tessuto adiposo rappresenta una fonte abbondante di cellule staminali utilizzabili per varie strategie rigenerative. Oltre alle applicazioni ricostruttive, rigenerative o di riprogrammazione, le cellule staminali derivate dal tessuto adiposo possono essere impiegate anche in patologie in cui sono implicate, come l'osteoartrite.

L'uso estensivo e la manipolazione delle cellule staminali in ambiente clinico sono stati ostacolati dalle norme delle Buone Pratiche di Fabbricazione relative alla "produzione di cellule" (Agostini F, Stem Cell Res, 2018; Raposio E and Ciliberti G, Ann Med Surg, 2017), che non sono applicabili secondo il Parlamento Europeo (Regolamento CE n. 1394/2007) per quanto riguarda la manipolazione minima. Tuttavia, in Europa, questi protocolli dovranno soddisfare i requisiti recentemente stabiliti dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA). L'EMA è una sezione decentralizzata dell'Unione Europea (UE) che opera a Londra dal 1995. L'Agenzia è tenuta a valutare le procedure scientifiche e a garantire le misure di sicurezza dei trattamenti e della terapia cellulare nell'Unione Europea. Sono quindi necessarie procedure adeguate e accessibili per ottenere hASC autologhi con una manipolazione minima per l'uso in ambito clinico. Come detto in precedenza, alcuni dispositivi medici rientrano tra le procedure di manipolazione minima e pertanto sono autorizzate per la processazione del tessuto adiposo e l'estrazione della frazione vasculostromale in ambito clinico. Numerosi studi hanno suggerito che tali sistemi sono in grado di ridurre la fibrosi, migliorare l'angiogenesi e avere effetti anti-infiammatori (De Francesco F, IJMS, 2018; Senesi L, Front Cell DevBiol, 2019; Malanga GA, J ClinOrthop Trauma, 2018; Desando G, IJMS, 2019). Per queste ragioni, l'uso di tali dispositivi medici può essere utile nel trattamento di numerose patologie in campo plastico ricostruttivo ma anche in campo degenerativo come l'artrosi trapezio-metacarpale. Per quanto di nostra conoscenza attualmente nessuno studio presente in letteratura valuta gli effetti dell'applicazione del tessuto adiposo proveniente da questi dispositivi disponibili in commercio nell'artrosi trapezio-metacarpale, soprattutto rispetto a procedure infiltrative classiche quali applicazione di acido ialuronico intrarticolare. L'osteoartrosi (OA) della trapeziometacarpale (TMC) del pollice è una delle principali cause di dolore cronico e disabilità funzionale della mano, compromettendo significativamente la qualità della vita.

La presente tesi si focalizza sull'analisi comparativa di diverse tecniche di isolamento e processazione della frazione vascolare stromale (SVF) e delle cellule staminali derivate da tessuto adiposo (ASCs) per applicazioni rigenerative, con particolare attenzione ai metodi enzimatici e meccanici. Lo studio ha valutato l'efficienza, la vitalità cellulare, la capacità di proliferazione e differenziazione, nonché l'immunofenotipo delle cellule ottenute. I risultati mostrano che il metodo enzimatico garantisce una resa cellulare superiore, tempi di confluenza e di raddoppiamento più rapidi, e un'elevata espressione di marcatori di staminalità (CD90, CD73, CD235a). Tuttavia, i metodi meccanici, in particolare Rigenera e Hy-Tissue SVF, si distinguono per la capacità di preservare una popolazione cellulare più eterogenea e marcatori specifici, offrendo un equilibrio tra efficienza e praticità.

L'analisi in vitro ha confermato la multipotenza delle ASCs isolate, dimostrando capacità di differenziazione in adipociti, condrociti e osteociti comparabile tra i metodi. Gli esperimenti in modelli animali hanno evidenziato il potenziale terapeutico della SVF nel trattamento della tendinopatia e dell'osteoartrite, mostrando miglioramenti significativi in termini di riparazione tissutale, neoangiogenesi e riduzione dell'infiammazione. In particolare, nel modello di osteoartrite canina, il trattamento con SVF ha determinato un miglioramento clinico e funzionale superiore rispetto all'acido ialuronico, con riduzione del dolore e della zoppia a breve e lungo termine.

L'analisi istologica e immunoistochimica ha ulteriormente confermato l'efficacia del trattamento con SVF, evidenziando un aumento del collagene di tipo I, una riduzione del collagene di tipo III e una migliore organizzazione delle fibre tissutali. I risultati indicano che i metodi meccanici, pur essendo meno efficienti in termini di resa cellulare, offrono una valida alternativa per applicazioni cliniche grazie alla semplicità d'uso e alla minore dipendenza da strumenti specializzati. Questa ricerca contribuisce allo sviluppo di approcci rigenerativi innovativi, aprendo nuove prospettive per l'applicazione della medicina rigenerativa in ambito clinico e veterinario.

Successivamente, il nostro studio clinico prospettico monocentrico ha valutato la sicurezza, l'efficacia clinica e la fattibilità di un approccio innovativo basato sull'uso di micro-innesti adiposi autologhi (mFAT), ottenuti attraverso un metodo non enzimatico che preserva l'integrità biologica del tessuto adiposo. Venticinque pazienti, di età compresa tra 45 e 70 anni, affetti da OA TMC di grado II secondo la classificazione di Eaton-Littler e refrattari ai trattamenti conservativi tradizionali, sono stati sottoposti a una singola infiltrazione intra-articolare di mFAT.

I risultati hanno mostrato una significativa riduzione del dolore, sia a riposo che durante l'attività, misurata tramite la scala NRS. A sei e dodici mesi dall'intervento, i pazienti hanno riportato un miglioramento significativo della funzionalità della mano, valutata tramite il Michigan Hand Outcomes Questionnaire (MHQ), il punteggio di opposizione del pollice (Kapandji) e test di forza

specifici (Tripod, Key e Tip pinch). I risultati radiografici non hanno evidenziato peggioramenti strutturali, suggerendo un effetto stabile nel tempo.

Parallelamente, analisi in vitro hanno caratterizzato le vescicole extracellulari (EVs) derivate da mFAT, evidenziando marcatori specifici come CD63 e CD81, che ne confermano l'origine mesenchimale. Le EVs hanno mostrato la capacità di modulare il dolore attivando selettivamente i recettori oppioidi KOP, come dimostrato da esperimenti condotti su linee cellulari CHO con trasfezione di aequorina mitocondriale. Questi risultati suggeriscono che le EVs contribuiscano all'effetto terapeutico attraverso un'azione combinata di modulazione del dolore e riduzione dell'infiammazione.

In conclusione, l'uso di mFAT rappresenta un'opzione terapeutica promettente e sicura per l'osteoartrite trapezio-metacarpale, con un significativo potenziale rigenerativo. Questo approccio minimamente invasivo non solo riduce il dolore e migliora la funzionalità articolare, ma apre anche nuove prospettive nella medicina rigenerativa per il trattamento delle artropatie degenerative. Studi futuri randomizzati e controllati sono necessari per confermare e standardizzare l'utilizzo di questa tecnologia nel trattamento dell'OA.

Questi studi hanno sicuramente contribuito a colmare una lacuna significativa nella letteratura esistente e a promuovere un approccio innovativo nel trattamento di condizioni degenerative come l'artrosi trapezio-metacarpale.

ABSTRACT

Tissue Engineering represents one of the central themes of 21st-century medicine. Initially focused on the bioengineering of dermal substitutes, it has broadened its scope with the advent of adult stem cells, facilitating the transition to regenerative medicine. The latter aims to repair or regenerate damaged tissues and organs by utilizing adipose tissue as an accessible and abundant source of mesenchymal stem cells (ASCs). These cells are applied in conditions such as osteoarthritis, thanks to their anti-inflammatory, pro-angiogenic, and regenerative capabilities.

Despite their therapeutic potential, the clinical use of stem cells has been limited by stringent regulations governing cellular manipulation. However, devices that process adipose tissue with minimal manipulation, such as Rigenera and Hy-Tissue SVF, are approved for the extraction of stromal vascular fraction (SVF), offering a feasible clinical solution. These systems, besides enhancing angiogenesis and reducing inflammation, are promising for treating degenerative conditions, including trapezio-metacarpal (TMC) osteoarthritis.

This thesis compares enzymatic and mechanical methods for isolating SVF and ASCs. The results show that the enzymatic method provides higher cell yield, faster proliferation times, and greater expression of stemness markers (CD90, CD73). However, mechanical methods preserve greater cellular heterogeneity, representing a viable alternative due to their simplicity of use.

In vitro experiments confirmed the multipotency of ASCs, with differentiation capacity into adipocytes, chondrocytes, and osteocytes. Preclinical studies on animal models demonstrated the effectiveness of SVF in treating tendinopathy and osteoarthritis, improving tissue repair and reducing inflammation and pain. In a canine osteoarthritis model, SVF treatment showed superior benefits compared to hyaluronic acid.

In parallel, a clinical study on patients with trapezio-metacarpal osteoarthritis evaluated the use of autologous micro-fat grafts (mFAT), obtained through a non-enzymatic method. Results showed a significant reduction in pain and improved joint functionality at 6 and 12 months. Radiographic analyses indicated structural stability, while in vitro studies characterized extracellular vesicles derived from mFAT, demonstrating their ability to modulate pain and reduce inflammation.

In conclusion, the use of SVF and mFAT represents an innovative and safe approach for degenerative conditions, opening new perspectives in regenerative medicine. This work helps bridge gaps in the literature and supports the development of minimally invasive treatments for osteoarthritis and other degenerative conditions.

1. CAPITOLO 1: OSTEOARTRITE

1.1 INTRODUZIONE

1.2 FISIOPATOLOGIA DELL'OSTEOARTRITE E MODIFICAZIONI ISTOLOGICHE

1.2.1 Cartilagine Articolare (AC)

1.2.2 Osso Subcondrale (SB)

1.2.3 Sinovia e Fluido Sinoviale

1.2.4 Il Tessuto adipose intra-articolare

1.2.5 L'origine multipla degli adipociti: Linee cellulari adipose e origine embrionaria

1.2.6 Osteoartrite: fisiopatologia e classificazione istologica

1.3 DIAGNOSI

1.3.1 Clinica

1.3.2 Imaging

1.3.3 Test di Laboratorio

1.4 TRATTAMENTO

1.4.1 Gestione del dolore nell'osteoartrite

1.4.2 Somministrazione intra-articolare di farmaci

1.4.3 Somministrazione intra-articolare di Corticosteroidi

1.4.4 Somministrazione intra-articolare di Acido Ialuronico

1.4.5 Somministrazione intra-articolare di Farmaci Analgesici/Antiinfiammatori

1.4.6 Somministrazione intra-articolare di Plasma Ricco di Piastrine

1.4.7 Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

1.4.8 Somministrazione intra-articolare di Tessuto adiposo microframmentato con frazione vasculo stromale

1.4.9 Trattamenti chirurgici

2. CAPITOLO 2: ANATOMIA E BIOMECCANICA DELL'ARTICOLAZIONE CARPO-METACARPALE DEL POLLICE

2.1 INTRODUZIONE

2.2 ANATOMIA

2.2.1 Il complesso dei legamenti dorsali

2.2.2 Il complesso dei legamenti volari (beak ligament)

2.2.3 Il legamento intermetacarpale (IML)

2.2.4 Muscoli che attraversano l'articolazione

2.2.5 Vascolarizzazione ed Innervazione

2.3 BIOMECCANICA

2.3.1 Pollice in posizione di Riposo

2.3.2 Movimenti dinamici del Pollice

2.3.3 Stabilità dell'articolazione CMC

2.3.4 Conseguenze del carico sull'articolazione

3. CAPITOLO 3: OSTEOARTRITE CARPOMETACARPALE DEL POLLICE

3.1 INTRODUZIONE

3.2 DIAGNOSI CLINICA

3.2.1 Ispezione

3.2.2 Palpazione

3.2.3 Manovre provocative

3.2.4 Forza e Range di Movimento

3.2.5 Valutazione Sensoriale

3.3 DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

3.3.1 Radiografie standard

3.3.2 Classificazione Radiografica

3.3.3 Altre modalità di imaging

3.4 MANAGEMENT NON OPERATORIO

3.4.1 Istruzione e Modificazione delle attività

3.4.2 Farmaci Orali e Topici

3.4.3 Splinting

3.4.4 Trattamento Conservativo

3.4.5 Iniezione intra-articolare di corticosteroidi

3.4.6 Iniezione intra-articolare di acido ialuronico

3.4.7 Terapie autologhe

3.4.8 Raccomandazioni

3.5 TRATTAMENTI CHIRURGICI

3.5.1 Tecniche di preservazione articolare

3.5.2 Artrodesi

3.5.3 Trapeziectomia isolata

3.5.4 Trapeziectomia con artroplastica in sospensione

3.5.5 Trapeziectomia con artroplastica di impianto

4 CAPITOLO 4: TESSUTO ADIPOSO

4.1 TESSUTO ADIPOSO

4.1.1 Morfologia e Fisiologia cellulare

4.1.2 Anatomia del Tessuto Adiposo

4.1.3 Il Tessuto Adiposo come fonte di cellule staminali mesenchimali

4.1.4 Potenzialità delle cellule staminali adipose (ASCs)

5 CAPITOLO 5: OBIETTIVI DELLA RICERCA

6 CAPITOLO 6: MATERIALI E METODI

6.1 IN VITRO

6.1.1 Procedura di raccolta del tessuto adiposo

6.1.2 Digestione Enzimatica del tessuto adiposo

6.1.3 Digestione Non-Enzimatica del tessuto adiposo

6.1.4 Conta cellulare e vitalità cellulare

6.1.5 Capacità di proliferazione cellulare

6.1.6 Unità formanti colonie

6.1.7 Immunofenotipo

6.1.8 Differenziamento in vitro

6.1.9 Microscopia ottica

6.1.10 Analisi SEM

6.1.11 Modello Animale in vitro: Guarigione della tendinopatia in modelli ovini

6.1.11.1 Animali

6.1.11.2 Disegno dello studio

6.1.11.3 Induzione della lesione tendinea

6.1.11.4 Raccolta ed applicazione del microinnesto adiposo

6.1.11.5 Valutazione clinica

6.1.11.6 Valutazione ultrasonografica ed elastosonografica

6.1.11.7 Biopsia tendinea

6.1.11.8 Valutazione immunoistochimica

6.1.11.9 Analisi rt-PCR

6.1.11.10 Analisi biomeccanica

6.1.12 Modello Animale in vitro: Trattamento dell'osteoartrite nei cani

6.1.12.1 Criteri di idoneità e reclutamento dei cani

6.1.12.2 Procedure del trial clinico

6.1.12.3 Terapia del Gruppo di Controllo (Acido Ialuronico)

- 6.1.12.4 **Terapia del Gruppo di Studio (mFAT)**
- 6.1.12.5 **Canine Brief Pain Inventory**
- 6.1.12.6 **Esame clinico**
- 6.1.12.7 **Esame radiografico**
- 6.1.12.8 **Esame del liquido sinoviale**
- 6.1.12.9 **Dosaggio delle citochine sinoviali**
- 6.1.13 **Isolamento di Esosomi derivati da ASCs**
- 6.1.14 **Analisi di marcatori di superficie esosomiali tramite citometria a flusso**
- 6.1.15 **Distribuzione della dimensione delle particelle e concentrazione**
- 6.1.16 **Incorporazione e rilascio degli hMSC-EXOs**
- 6.1.17 **Misurazioni di Ca²⁺**
- 6.1.18 **Saggio di proliferazione cellulare**
- 6.1.19 **Analisi dell'espressione genica**

6.2 IN VIVO

- 6.2.1 **Design dello studio, popolazione e valutazione**
- 6.2.2 **Procedura chirurgica per il prelievo dei microinnesti adiposi**
- 6.2.3 **Procedura chirurgica per l'iniezione del tessuto adiposo micro-frammentato**
- 6.2.4 **Valutazione ecografica**
- 6.2.5 **Protocollo post-operatorio**
- 6.2.6 **Misure di esito**
- 6.2.7 **Analisi statistica**

7 CAPITOLO 7 RISULTATI

7.1 IN VITRO

- 7.1.1 **Saggio di vitalità cellulare**
- 7.1.2 **Capacità di proliferazione cellulare**
- 7.1.3 **Immunofenotipo**
- 7.1.4 **Unità formanti colonie**
- 7.1.5 **Differenziamento**
- 7.1.6 **Analisi microscopica della SVF**
- 7.1.7 **Modello Animale in vitro: Guarigione della tendinopatia in modelli ovini**
 - 7.1.7.1 **Valutazione clinica mostra un miglioramento della zoppia e dello spessore tendineo nei gruppi trattati**

7.1.7.2 Valutazione ecografica in modalità B mostra una diminuzione dello spessore tendineo nel gruppo trattato, nonostante l'assenza di misurazioni temporali valide sulla progressione.

7.1.7.3 Valutazione con elastosonografia mostra cambiamenti nella durezza tendinea nel gruppo trattato con misurazione della progressione temporale.

7.1.7.4 L'analisi istologica mostra un miglioramento dei parametri FOS, FES, FIIS e NS nei gruppi trattati.

7.1.7.5 L'analisi immunoistochimica mostra un'alta espressione di COL1, FVIII e un'espressione significativamente bassa di COL3 nei gruppi trattati.

7.1.7.6 L'espressione genica mostra un'alta espressione di COL1, VEGF e una significativa diminuzione dei geni MMP1, COL3 e sclerodermina.

7.1.7.7 Analisi biomeccanica

7.1.8 Modello Animale in vitro: Trattamento dell'osteoartrite nei cani

7.1.8.1 Animali arruolati

7.1.8.2 Esame clinico: esito a breve termine

7.1.8.3 Canine Brief Pain Inventory Index (CBPI): esito a breve termine

7.1.8.4 Valutazione radiografica

7.1.8.5 Valutazione sinoviale

7.1.8.6 Esame clinico: esito a lungo termine

7.1.8.7 Analisi sulle differenze tra breve e lungo termine

7.1.8.8 Canine Brief Pain Inventory Index: esito a lungo termine

7.1.8.9 Analisi sulle differenze tra breve e lungo termine

7.1.8.10 Animali esclusi

7.1.9 Isolamento e Caratterizzazione degli ASC-Esosomi

7.1.10 Misurazioni di Aequorin

7.2 IN VIVO

7.2.1 Risultati clinici

7.2.2 Forza

7.2.3 NRS (Riposo/Attività)

7.2.4 Opposizione del pollice (punteggio di Kapandji)

7.2.5 MHQ

7.2.6 Radiografie postoperatorie

7.2.7 Complicanze, Peggioramenti, Recidive

7.2.8 Correlazione tra i parametri biologici ed i parametri clinici

8 CAPITOLO 8 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

9 CAPITOLO 9 REFERENZE

CAPITOLO 1

OSTEOARTRITE

1.1 Introduzione

L'osteoartrite e l'osteoartrosi sono termini che spesso vengono utilizzati in modo intercambiabile, ma presentano differenze significative nella loro definizione e nel focus patologico. L'osteoartrite è vista principalmente come una malattia infiammatoria delle articolazioni, in cui l'infiammazione gioca un ruolo chiave nel danneggiamento e nella degenerazione del tessuto articolare. Al contrario, l'osteoartrosi enfatizza l'aspetto degenerativo e meccanico del danno articolare, attribuendo meno rilevanza ai processi infiammatori. Nella ricerca e nella terminologia anglosassone, il termine "osteoarthritis" è preferito proprio per sottolineare l'importanza delle componenti infiammatorie che caratterizzano questa condizione complessa, che prevengono l'usura cartilaginea. L'osteoartrite è una malattia degenerativa delle articolazioni caratterizzata dalla progressiva degradazione della matrice cartilaginea articolare. Questa degradazione è causata da stress cellulare e degenerazione della matrice extracellulare, risultanti da lesioni e meccanismi di riparazione disfunzionali, che attivano processi pro-infiammatori dell'immunità innata (Aigner T et al., *Arthritis Rheum* 2006; Roach HI et al., *Curr Drug Targ* 2007). Questa malattia è caratterizzata dal progressivo deterioramento della cartilagine protettiva tra le articolazioni, il quale causa dolore cronico, riduzione della mobilità e compromissione funzionale. La patofisiologia dell'osteoartrite coinvolge un complesso gioco di fattori biomeccanici, biochimici e infiammatori che contribuiscono alla distruzione progressiva della struttura e della funzionalità delle articolazioni (Swales C, Athanasou NA, *Orthopaedics and Trauma* 2010). Questi fattori includono stress meccanico sull'articolazione, rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie, e la disregolazione dei processi catabolici e anabolici all'interno della matrice extracellulare (Mukherjee A, Das B, *Biomaterials and Biosystems* 2024). Questa complessa interazione porta alla graduale degenerazione della cartilagine articolare, all'ispessimento dell'osso subcondrale e alla formazione di osteofiti, tutti fattori che contribuiscono al deterioramento complessivo della struttura e della funzionalità articolare (Guilak et al., *Matrix Biol* 2018). Tale patologia è una delle principali cause di disabilità a livello mondiale, specialmente tra la popolazione anziana, ed è associata a dolore significativo e mobilità limitata (Steinmetz JD et al, *The Lancet Rheumatol*, 2023). Circa il 10% degli uomini e il 18% delle donne sopra i 65 anni presentano osteoartrite sintomatica, ed è stimato che circa 250 milioni di persone in tutto il mondo siano affette da osteoartrite asintomatica (Zhang Y and Jordan JM, *clin Geriatr Med* 2010; O'Neill TW et al, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018) Questa ampia prevalenza di osteoartrite, in particolare tra la popolazione anziana, mette in evidenza l'importante impatto sulla salute pubblica associata a questa malattia degenerativa. Fattori

di rischio (**Figura 1**) come l'obesità, l'età avanzata, lesioni traumatiche pregresse, disallineamento osseo o instabilità articolare hanno tutti contribuito ad un aumento della frequenza e prevalenza dell'osteoartrite negli ultimi decenni.

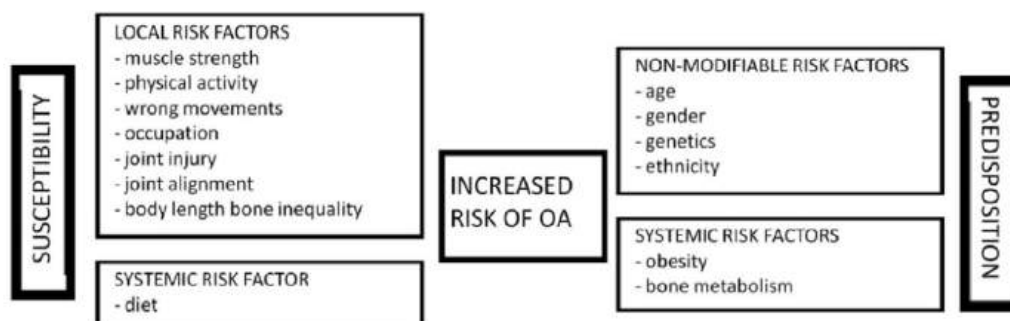


Fig. 1. Fattori di rischio che portano allo sviluppo dell'osteoartrite (OA).

Questi fattori possono portare ad un aumento dello stress meccanico sulle articolazioni, innescando così la graduale degradazione della cartilagine protettiva e promuovendo lo sviluppo e la progressione di questa malattia degenerativa (Breedveld FC, *Rheumatology* 2004). Questo graduale deterioramento della cartilagine articolare provoca successivamente dolore cronico, riduzione della mobilità e ulteriore compromissione funzionale man mano che la struttura articolare e la funzionalità complessiva delle articolazioni si deteriorano nel tempo (Loeser RF et al, *Arthritis Rheum* 2012). L'osteoartrite costituisce anche un carico sostanziale sull'economia annuale, imponendo costi finanziari significativi ai sistemi sanitari e contribuendo alla perdita di produttività e alla ridotta qualità della vita per gli individui affetti (Steinmetz JD et al, *The Lancet Rheumatol*, 2023; Chen A et al., *Arthritis* 2012). Il dolore è il problema centrale nell'osteoartrite, ma le strategie di gestione del dolore e le modifiche dello stile di vita si sono spesso dimostrate insoddisfacenti, rendendo questa condizione degenerativa difficile da trattare in maniera efficace (Neogi T, *Osteoarthritis Cartilage* 2013). Sebbene l'artroplastica, ovvero la rimozione della superficie articolare danneggiata e la sua sostituzione con una protesi artificiale, sia stata finora l'unico mezzo per migliorare la qualità della vita dei pazienti sintomatici durante lo stadio avanzato della malattia, questo approccio è limitato solo ai casi più gravi. Le attuali strategie terapeutiche per l'osteoartrite si concentrano principalmente sulla gestione dei sintomi attraverso farmaci e, in casi gravi, con la chirurgia di sostituzione articolare. Tuttavia, questi approcci sono spesso inefficaci nel prevenire la progressione della malattia o nel promuovere la rigenerazione della cartilagine (Maqbool M et al, *Ann Med Surg (Lond)*, 2021). Purtroppo, prevenire la progressione dell'osteoartrite è rimasta una sfida enigmatica (Im G and Henrotin Y, *Ther*

Adv Musculoskelet Dis 2023). Negli ultimi anni, c'è stata una crescente esplorazione di nuove terapie biologiche come mezzo per rallentare la progressione dell'osteoartrite durante le sue fasi precoci e asintomatiche (Zhang C et al., Clin Rehabil 2016). L'obiettivo finale di questi nuovi approcci terapeutici biologici è di alterare in modo fondamentale la traiettoria e la progressione di questa debilitante malattia degenerativa. Intervendo nelle prime fasi asintomatiche, l'intento è di rallentare o addirittura arrestare il deterioramento graduale della cartilagine articolare e prevenire il peggioramento dei sintomi clinici e della compromissione funzionale associata all'osteoartrite (Pelletier JP et al., Arthritis Res Ther 2006). Gli studi hanno valutato l'efficacia di nuove opzioni di trattamento per l'osteoartrite, tra cui applicazioni intra-articolari di iniezioni di corticosteroidi (Juni P et al, Cochrane Database Syst Rev 2015), iniezioni di acido ialuronico (Bowman S et al., Clin Transl Med 2018), plasma ricco di piastrine (Szwedowski D et al, Int J Mol Sci 2021), o tessuto adiposo micro-frammentato autologo con frazione vascolare stromale (Onorato F et al, Arch Orthop Trauma Surg, 2024). Questi approcci sono stati esplorati come potenziali strategie di prevenzione secondaria (Arden NK et al, Nat Rev Rheumatol 2021), miranti a rallentare la progressione della malattia e potenzialmente a rigenerare la cartilagine danneggiata durante le prime fasi asintomatiche dell'osteoartrite (Richards MM et al., Phys Sportsmed 2016). Tuttavia, gli esiti clinici di questi interventi sono stati eterogenei, con alcuni studi che riportano miglioramenti modesti nel dolore e nella funzione, mentre altri non hanno dimostrato effetti significativi di modifica della malattia (Kennedy S et al, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2022). Mentre alcuni studi hanno mostrato risultati promettenti, come riduzione del dolore e miglioramento della funzione articolare, l'efficacia complessiva di questi approcci rimane poco chiara, dato che altre indagini non hanno dimostrato significative capacità di modifica della malattia. L'eterogeneità degli esiti clinici sottolinea la necessità di ulteriori ricerche e ottimizzazione di queste nuove terapie biologiche per comprendere meglio il loro potenziale nel rallentare la progressione dell'osteoartrite durante le sue prime fasi asintomatiche.

1.2 FISIOPATOLOGIA DELL'OSTEOARTRITE E MODIFICAZIONI ISTOLOGICHE

L'osteoartrite è una malattia complessa e multifattoriale che coinvolge l'interazione di vari processi patologici che influenzano l'intera struttura articolare, tra cui la cartilagine articolare, l'osso subcondrale e il tessuto sinoviale (Lories RJU and Luyten FP, Bonekey Rep 2012; Ji X and Zhang H, Front Mech Eng 2019; Williams C and Wright LJ, J Pharma Pract 1999). Le alterazioni patologiche nell'osteoartrite sono caratterizzate dal graduale

deterioramento della cartilagine articolare, accompagnato dal rimodellamento e dalla sclerosi dell'osso subcondrale, nonché dalla formazione di osteofiti, tutto ciò contribuisce alla disfunzione complessiva dell'articolazione (Lories RJU and Luyten FP, Bonekey Rep 2012; Williams C and Wright LJ, J Pharma Pract 1999). Inizialmente descritta come una malattia della cartilagine e successivamente come un disturbo dell'osso subcondrale, l'osteoartrite è oggi considerata un disturbo dell'intera articolazione, coinvolgendo tutti i tessuti circostanti un'articolazione (cartilagine articolare, osso subcondrale, sinovia, cuscinetto adiposo infrapatellare, legamenti e tendini). Le modifiche iniziali nell'osteoartrite si verificano prevalentemente nella cartilagine articolare, dove la degradazione della matrice extracellulare, composta principalmente da collagene e proteoglicani, porta alla perdita dell'integrità strutturale della cartilagine e della sua capacità di resistere allo stress meccanico (Williams C and Wright LJ, J Pharma Pract 1999; Man GS and Mologhianu G, J Med Life 2014; Lories RJU and Luyten FP, Bonekey Rep 2012). Questa alterata composizione e integrità della matrice cartilaginea compromette le proprietà biomeccaniche dell'articolazione, rendendola più suscettibile a ulteriori danni e usura.

1.2.1 Cartilagine Articolare (AC)

La cartilagine articolare è un tessuto connettivo altamente specializzato, avascolare e privo di innervazione, che riveste le estremità delle ossa all'interno di un'articolazione sinoviale. Essa funge da superficie liscia e lubrificata, facilitando lo scivolamento agevole delle superfici articolari in opposizione durante il movimento, oltre ad assorbire e distribuire i carichi meccanici (Alford JW and Cole BJ, Am J Sports Med 2005). I condrociti, di tipo ialino, l'unica componente cellulare della cartilagine articolare, mantengono l'integrità strutturale e funzionale del tessuto attraverso la sintesi e il rinnovo continui della matrice extracellulare. Questi condrociti si trovano all'interno della matrice extracellulare (ECM) (Man GS and Mologhianu G, J Med Life 2014) e sono ospitati in compartimenti specializzati chiamati "lacune" (Fox S et al, Sports Health 2009). I condrociti possono anche essere organizzati in piccoli gruppi di cellule singole, noti come "gruppi isogenici", derivanti dalla divisione e proliferazione di condrociti individuali (Archer CW and Francis-West P, Int J Biochem Cell Biol 2003) (**Figura 2A**). La matrice extracellulare è composta principalmente da fibrille di collagene di tipo II (ma anche di tipi III, VI, IX, XI) e da grandi proteoglicani aggreganti, come l'aggrecan, che conferiscono alla cartilagine la sua caratteristica resistenza alla compressione e resilienza, permettendole di sopportare gli elevati carichi meccanici presenti all'interno dell'articolazione e contiene

glicosaminoglicani, prevalentemente priva di fibre elastiche (Dang M et al, J Mater Chem B 2017). Gli aggregati di proteoglicani sono composti da solfato di cheratan e solfato di condroitina, che sono legati alla proteina core dell'aggreco connessa alla spina dorsale dell'acido ialuronico. Questi aggregati di proteoglicani sono integrati all'interno di una rete di fibrille di collagene di tipo II reticolate che costituiscono la matrice extracellulare della cartilagine articolare (Kuettner KE et al, J Rheumatol 1991). L'ambiente cartilagineo è consolidato dai condrociti che coalescono i componenti della cartilagine, come il collagene e i proteoglicani, e stabilizzano la produzione sia dei componenti della matrice extracellulare che degli enzimi degradanti. Questo equilibrio dinamico tra processi anabolici e catabolici consente ai condrociti di adeguare regolarmente la composizione e le proprietà della cartilagine articolare, permettendo di sopportare i carichi meccanici elevati presenti nell'articolazione.

La cartilagine articolare (**Figure 2BC**) è organizzata in quattro strati (Fox S et al, Sports Health 2009):

1. Zona tangenziale (strato superficiale): questa zona contiene condrociti a forma di disco e fibrille di collagene orientate orizzontalmente, che forniscono una superficie liscia e scorrevole per l'articolazione.
2. Zona transitoria: nella zona intermedia, le fibrille di collagene sono orientate diagonalmente e i condrociti rotondi sono distribuiti in modo irregolare in questo strato. Questa zona di transizione funge da ponte tra le zone tangenziale e radiale, fornendo una transizione graduale nell'organizzazione e orientamento dei componenti cartilaginei.
3. Zona radiale: in questo strato più profondo, i condrociti sono posizionati verticalmente con fibrille di collagene disposte radialmente in modo perpendicolare rispetto alla superficie articolare. Questo fornisce una struttura forte e organizzata per resistere alle forze compressive presenti all'interno dell'articolazione.
4. La zona calcificata ad alta mineralizzazione è lo strato più profondo della cartilagine articolare, dove le fibrille di collagene sono disposte in un orientamento perpendicolare alla superficie articolare. Questa zona calcificata altamente mineralizzata è separata fisicamente dagli strati di cartilagine non mineralizzata sovrastanti da una netta "tidemark", che rappresenta un confine chiaramente definito che demarca l'interfaccia tra la cartilagine e l'osso subcondrale sottostante. In quest'area i condrociti sono esigui.

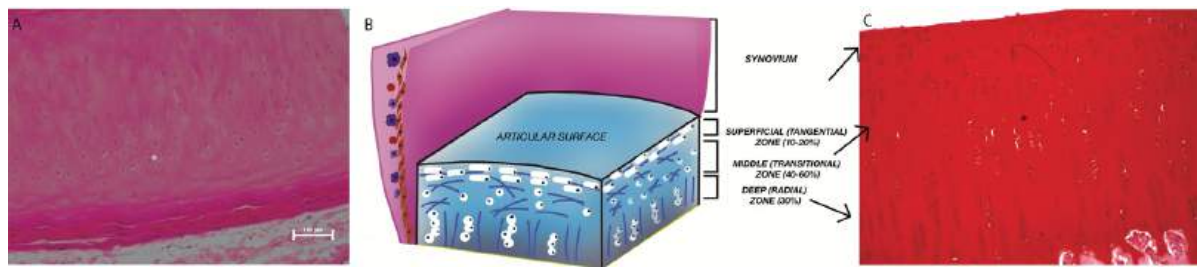


Fig. 2. Le figure mostrano l'aspetto istologico della cartilagine articolare (da De Francesco F et al, Int J Mol Sci 2021).

Il ruolo della cartilagine articolare nello sviluppo dell'osteoartrite degenerativa si verifica principalmente attraverso alterazioni della matrice extracellulare, che portano alla graduale perdita di cartilagine, caratteristica distintiva dell'osteoartrosi. Inoltre, lo sviluppo dell'osteoartrosi è attivato attraverso meccanismi meccanici e successivamente biologici, innescati dal carico meccanico e coinvolgono specificamente meccano-recettori, come i canali ionici meccanosensibili e le integrine, presenti sulla superficie dei condrociti (Jin H et al, Front Cell Dev Biol 2021). Questi meccano-recettori sono in grado di percepire e rispondere agli stimoli meccanici avvertiti nell'articolazione, portando all'attivazione di diversi percorsi di segnalazione cellulare e alla produzione di citochine e fattori di crescita (Mobasheri A et al, Cell Biol Int, 2005) che possono mantenere l'integrità della cartilagine o contribuire alla sua degradazione, in base alla natura e magnitudine delle forze meccaniche applicate. L'attività fisica e la compressione dinamica servono come stimoli biomeccanici che possono ridurre la sintesi di enzimi proteolitici e limitare la degradazione della cartilagine. Al contrario, un'inadeguata stimolazione biomeccanica, come l'immobilizzazione prolungata, è stata osservata per ridurre lo spessore e la morbidezza della cartilagine articolare. Un'azione biomeccanica eccessiva, d'altra parte, provoca danni irreversibili alla cartilagine, innescando sensazioni dolorose (Musumeci G, J Funct Morphol Kinesiol 2016). A seguito di stress meccanici, la cartilagine articolare sperimenta un accumulo di acqua nella regione superficiale e una perdita di glicosaminoglicani e proteoglicani, che sono componenti cruciali della matrice extracellulare. Man mano che l'aggrecan perde le sue proprietà osmotiche, i condrociti rispondono potenziando la loro capacità sintetica per rigenerare i componenti mancanti della matrice extracellulare. Istologicamente, il segno iniziale dell'osteoartrite è una fibrillazione superficiale della cartilagine nello strato superficiale. Durante le prime fasi dell'osteoartrite, le metalloproteinasi della matrice giocano un ruolo centrale nella degradazione della matrice extracellulare. In particolare, la MMP-1 e la MMP-3 sono responsabili della degradazione della rete di collagene, mentre la MMP-13 in particolare guida la degradazione del collagene di tipo II, il collagene predominante trovato nella cartilagine ialina delle articolazioni (Hedbom E, Cell Mol Life Sci 2002). Questi enzimi proteolitici, capaci di

scindere i componenti strutturali della matrice extracellulare della cartilagine, sono considerati mediatori chiave della distruzione cartilaginea che contraddistingue la progressione dell'osteoartrosi. Man mano che la degenerazione della matrice avanza, i condrociti intraprendono da una parte un processo ipertrofico (Rim YA et al, Int J Mol Sci 2020) per compensare la perdita di componenti della matrice extracellulare, aumentando la produzione dei costituenti della matrice come collagene e proteoglicani. D'altra parte, i prodotti della degradazione cartilaginea, tra cui frammenti della matrice extracellulare e molecole infiammatorie, innescano la produzione di mediatori pro-infiammatori da parte dei condrociti e delle cellule circostanti. Questa risposta infiammatoria sostenuta esacerba ulteriormente i cambiamenti degenerativi all'interno della cartilagine articolare. Istologicamente, questo fenomeno è caratterizzato da fibrillazioni che si estendono profondamente nelle zone di transizione e radiale della cartilagine articolare, formando profonde fessure che alla fine coinvolgono lo strato cartilagineo calcificato e l'osso subcondrale sottostante. Questi cambiamenti strutturali alla cartilagine e all'osso rappresentano i tratti istologici distintivi osservati durante la progressione dell'osteoartrite.

1.2.2 Osso Subcondrale (SB)

L'osso subcondrale è composto da uno strato superficiale di osso corticale a forma di placca situato sotto la cartilagine calcificata e da uno strato più profondo di osso trabecolare o spugnoso (Madry H et al, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2010).

La struttura dell'osso subcondrale (**Figure 3**) è influenzata dalle attività delle popolazioni cellulari di osteoblasti e osteoclasti.

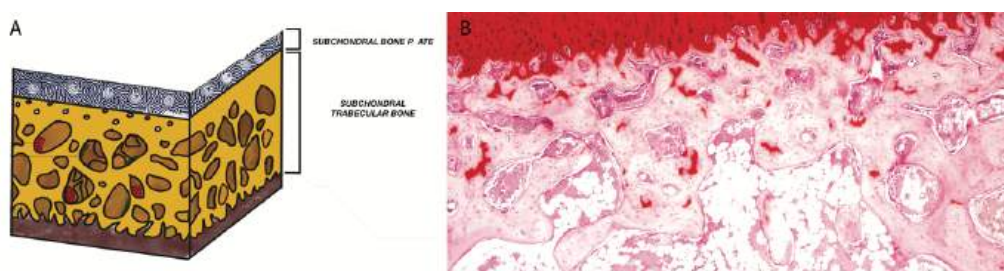


Fig 3 Osso subcondrale (da De Francesco F et al, Int J Mol Sci 2021)

L'osso subcondrale gioca un ruolo cruciale nella patogenesi dell'osteoartrosi. Nell'osteoartrosi stabilita, l'osso subcondrale subisce fenomeni di deterioramento in una fase precoce (Radin EL et al, Nature 1970) e fenomeni di sclerosi in una fase successiva (Lajeunesse D et al, Mod Rheumatol. 2003). Questi cambiamenti sono accompagnati da alterazioni del volume e dello spessore della placca trabecolare subcondrale, che portano a un squilibrio osteoblastico/osteoclastico. Le alterazioni dell'osso subcondrale, inclusi

l'aumento dello spessore della placca subcondrale, la sclerosi e la formazione di cisti subcondrali e osteofiti (Donell S, EFORT Open Rev 2019), possono contribuire alla degenerazione complessiva dell'articolazione osservata nell'osteoartrite. In particolare, l'osso subcondrale subisce un processo di rimodellamento aumentato, portando a un irrigidimento e a un ispessimento anomalo della placca subcondrale. Le microfratture dell'osso subcondrale, generalmente associate a erosioni e fessure cartilaginee, sono responsabili delle prime manifestazioni cliniche dell'osteoartrosi, come dolore e disagio avvertiti dal paziente (O'Neill TW, Curr Osteoporosis Rep 2018). Queste microfratture possono portare all'infiltrazione di nuovi vasi sanguigni e nervi in strutture anatomiche che normalmente non hanno accesso a queste strutture, contribuendo ai sintomi dolorosi associati all'osteoartrite in fase iniziale (Zhu X et al, Front Cell Dev Biol, 2020). Questo fenomeno è dovuto all'infiltrazione, attraverso le fessure (osseo e cartilagineo), di nuovi vasi e nervi che accedono in modo inusuale a certe strutture anatomiche (Eitner A et al, Front Mol Neurosci, 2017). La patogenesi dell'osteoartrite era in precedenza considerata a esclusivo coinvolgimento della cartilagine articolare, ma studi recenti hanno dimostrato che le strette connessioni patogenetiche tra cartilagine articolare e osso subcondrale sono responsabili sia del corretto mantenimento dell'omeostasi articolare che della progressione della malattia (Goldring M, Goldring S, NY Acad Sci, 2010). Clinicamente, questa manifestazione patologica è correlata alla sclerosi subcondrale, sinonimo di osteoartrosi in stadio avanzato. Questa maggiore rigidità dell'osso subcondrale può alterare le proprietà meccaniche dell'articolazione, risultando in una diminuita capacità della cartilagine articolare sovrastante di distribuire efficacemente le forze compressive avvertite durante le attività di carico.

1.2.3 Sinovia e Fluido Sinoviale

La sinovia è composta dalla membrana sinoviale e dal fluido sinoviale. L'anatomia della membrana sinoviale è costituita da uno strato di rivestimento intinale e da un livello sottostante chiamato strato subsinoviale. La membrana sinoviale è formata da più strati ricchi di sinoviociti simili a fibroblasti, che collettivamente formano un rivestimento che copre la cavità articolare e il fluido sinoviale (**Figura 4**).

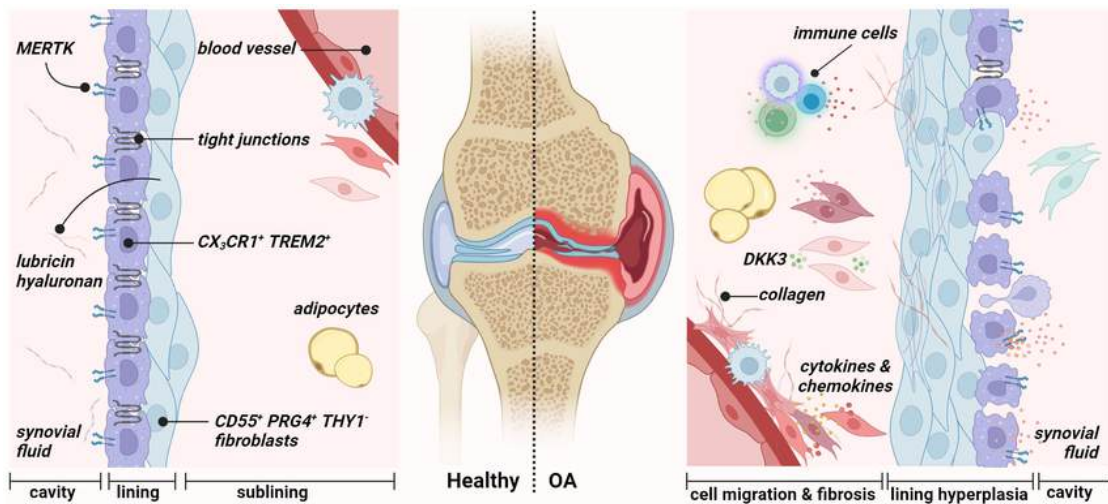


Fig 4 Anatomia della membrana sinoviale in un'articolazione sana ed affetta da osteoartrite

Lo strato intinale è composto da cellule sinoviali specializzate (cellule simili a macrofagi di tipo A e cellule simili a fibroblasti di tipo B) che secernono il fluido sinoviale, il quale lubrifica e nutre la cartilagine articolare. I sinoviociti secernono principalmente molecole lubrificanti come l'acido ialuronico e sostanze derivate dal plasma che sono essenziali per la nutrizione della cartilagine avascolare. Inoltre, il fluido sinoviale svolge un ruolo cruciale nella conservazione dei prodotti di degradazione. La membrana sinoviale include uno strato intinale e subintinale che, a differenza di altre membrane epiteliali, non è separato da una membrana basale (Pap T et al, *Semin Cell Dev Biol*, 2020). L'assenza di una membrana basale è responsabile dell'incursione di componenti sierici dai capillari nello spazio sinoviale. Le uniche molecole di adesione presenti sono la cadherina-11, che è in gran parte responsabile dell'adesione tra i singoli sinoviociti (Valencia X et al, *J Exp Med*, 2004). Istologicamente, i due strati possono apparire disgiunti, ma i sinoviociti mostrano un alto grado di eterogeneità. I sinoviociti simili a fibroblasti sono sinoviociti di tipo B, che differiscono dai sinoviociti di tipo A, i quali sono effettivamente cellule sinoviali simili a macrofagi. I sinoviociti simili a macrofagi sono positivi per CD163 e CD68 e proliferano durante l'infiammazione. I sinoviociti simili a fibroblasti sono positivi per CD55 e producono principalmente acido ialuronico. Queste differenze sembrano essere cruciali per la specifica reazione tissutale che si verifica in condizioni patologiche come l'osteoartrite (Di Nicola V, *Regen Ther*, 2020). L'infiammazione associata all'osteoartrite stimola la proliferazione della membrana sinoviale, che a sua volta facilita l'infiltrazione di linfociti T, linfociti B e mastociti (Bondeson J et al, *Arthritis Rheum* 2010). I sinoviociti attivati secernono citochine infiammatorie, chemokine ed enzimi degradanti della matrice che contribuiscono alla distruzione della cartilagine articolare (Roach HI et al, *Curr drug Targ*, 2007). Le metalloproteinasi della matrice e altre proteasi risultanti dai mediatori

infiammatori, in particolare l'Interleuchina-1 (IL-1) e il Fattore di Necrosi Tumorale (TNF), inducono i condrociti, le cellule sinoviali e i linfociti a generare IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, il fattore inibitorio della leucemia e la prostaglandina E2 (PGE2), nonché a produrre enzimi proteolitici che provocano danni alla cartilagine, dolore e infiammazione sinoviale (Kim JR et al, Int J Mol Sci, 2018).

1.2.4 Intra-articular adipose tissue structure

I depositi di tessuto adiposo intra-articolare, noto come cuscinetto adiposo articolare (AFP), sono stati individuati all'interno delle articolazioni sinoviali (**Figura 5**).

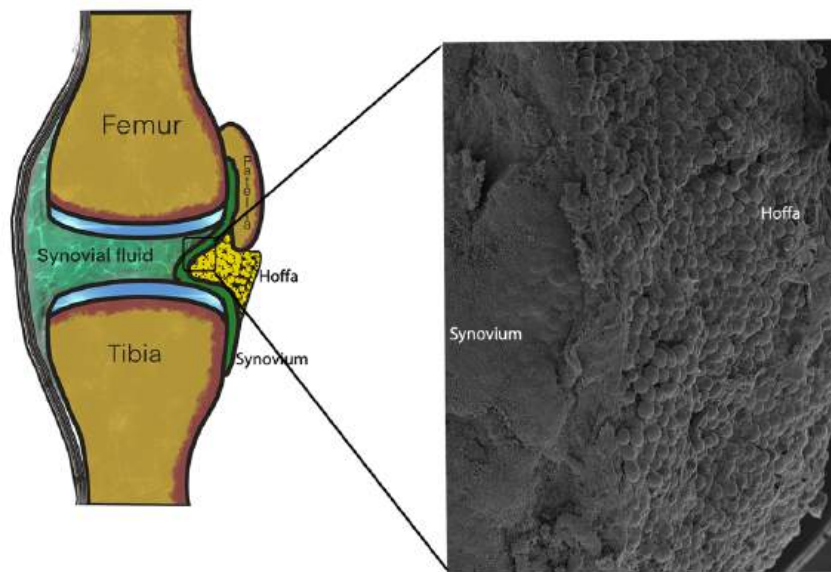


Fig 5: L'aspetto microscopico della membrana sinoviale e del grasso intra-articolare (da De Francesco F et al, Int J Mol Sci 2021)

Il grasso intra-articolare costituisce una parte fondamentale delle strutture di supporto che contribuiscono alla stabilità e all'assorbimento degli shock dell'articolazione. L'AFP condivide somiglianze strutturali con il tessuto adiposo bianco (WAT) nel corpo, ma sembra essere regolato da vie metaboliche distinte. Questa localizzazione del WAT è affascinante e significativa, sebbene sia stata ampiamente sottovalutata (Labusca L and Zugun-Eloae F, Front Vet Sci 2018). Il ruolo preciso dei circuiti nel mantenimento dell'omeostasi articolare rimane poco chiaro; tuttavia, il loro coinvolgimento nella secrezione di molecole bioattive è ben documentato. Queste molecole svolgono un ruolo chiaro nel preservare l'omeostasi e nel facilitare specifici meccanismi di riparazione all'interno della matrice extracellulare sinoviale o di tutti i tessuti articolari. Considerata la partecipazione di tutti i tessuti articolari e la posizione del tessuto adiposo nell'osteoartrite, si può dedurre ragionevolmente che il tessuto adiposo intra-articolare sia associato alla patogenesi di questa condizione. L'AFP è un tessuto articolare specializzato che fornisce

molecole bioattive implicate nella crescita cellulare e nella matrice extracellulare (ECM) e nella modulazione dell'infiammazione articolare tramite il rilascio di citochine pro- o antinfiammatorie oltre un ruolo biomeccanico e protettivo (Labusca L e Zugun-Eloae F, *Front Vet Sci* 2018). L'AFP è stata descritta in molte articolazioni del corpo come l'articolazione del ginocchio (Leese J and Davies DC, *J Anat* 2020), l'articolazione dell'anca (Jayasekera N et al., *PLoS One* 2014), l'articolazione radio-omerale (Mercer SR and Bogduk N, *Clin Anat* 2007), l'articolazione della faccetta lombare (Taylor JR and McCormick CC, *Neuroradiology* 1991), intermetacarpale (Clavert P et al., *Surg Radiol Anat* 2006), e dell'articolazione della mano (Riordan DC, *Orthop Clin North Am* 1974). L'anatomia microscopica della sinovia consiste tipicamente di due strati: l'intima e la subintima. Il tessuto sinoviale può essere classificato come fibroso, areolare, o adiposo, basato sulla struttura e il contenuto dello strato subintimale. La sinovia adiposa si trova principalmente nei cuscinetti adiposi come il Cuscinetto Adiposo di Hoffa (HFP). Nella sinovia adiposa, esiste uno strato completo di cellule intimali che può essere a contatto diretto con gli adipociti o separato da una fascia di collagene, con il tessuto più profondo che è adiposo. D'altro canto, il tipo di sinovia areolare è considerato la forma più specializzata. È caratterizzato da uno strato continuo di cellule avvolgenti, e immediatamente sotto queste si trova una matrice fibrosa di tessuto connettivo con alcune fibre di collagene di tipo I mentre l'area più profonda consiste in uno strato di tessuto connettivo lasso in cui è possibile trovare cellule adipose come visibile nella **Figura 6A** dove lo strato profondo formato da adipociti è evidente. Queste cellule adipose della sinovia non sono così diverse da quelle trovate nel WAT corporeo; tuttavia, presentano una stretta relazione con il tessuto connettivo come mostrato nella **Figura 6B,C**.

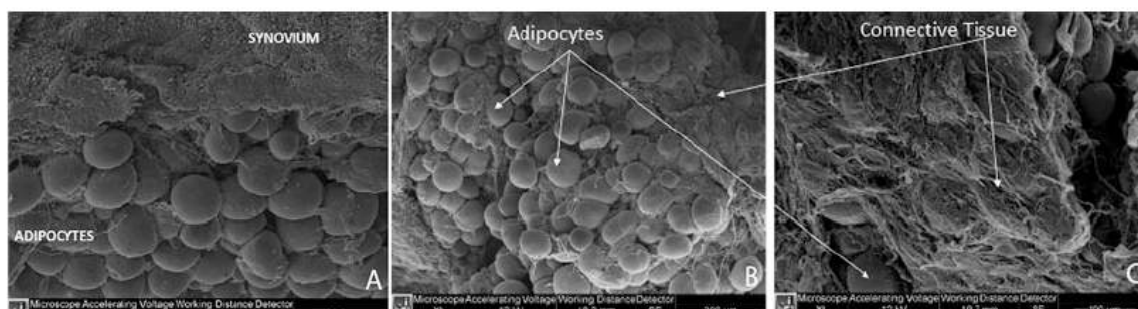


Fig 6: Immagini di ultramicroscopia del cuscinetto adiposo articolare. Il tessuto sinoviale è caratterizzato da uno strato superficiale di cellule, immediatamente al di sotto del quale si trova una matrice fibrosa di tessuto connettivo con alcune fibre di collagene di tipo I. In profondità, consiste in uno strato di tessuto connettivo lasso dove il livello profondo, formato da adipociti, presenta una stretta relazione con il tessuto connettivo (da De Francesco F et al, *Adv Exp Med Biol* 2024).

L'AFP presenta alcuni adipociti polimorfi intercalati con il tessuto connettivo che lo rende altamente reattivo con una tendenza a formare noduli che aumentano il rischio di infiammazione (Belluzzi E et al., Biomed Res 2019; Zhou S et al., J Orthop Res 2022). Recentemente, alcuni autori (Macchi V et al., J Anat 2018; Emmi A et al., Front Cell Dev Biol 2022; De Francesco F et al, IJMS 2021) hanno caratterizzato l'AFP come un tessuto fibro-adiposo che fa parte di un sistema più ampio comprendente la membrana sinoviale. Questo "organo" di recente riconoscimento è visto come un'unica unità funzionale anatomica che gioca un ruolo cruciale nella patogenesi e progressione dell'osteoartrite. Il tessuto adiposo può essere considerato un organo (Kershaw EE and Flier JS, J Clin Endocrinol Metab 2004) a causa della sua capacità di secernere citochine, interleuchine, fattori di crescita e adipocine. Tali mediatori infiammatori sono presenti nel fluido sinoviale (Schaffler A et al, Jama 2003) e sono in grado di determinare il metabolismo della cartilagine e della sinovia (Toussiroit E et al, Curr Med Chem 2007). In particolare, la leptina e l'adiponectina sono adipochine secrete in grandi quantità nel fluido sinoviale solo dal tessuto adiposo presente nella membrana sinoviale. La leptina è presente in quantità maggiore rispetto all'adiponectina, ed entrambe sono in grado di stimolare la produzione di mediatori pro-infiammatori (Dumond H et al, Biochim Biophys Acta 2006). La leptina è in grado di stimolare la produzione di IL-1 β e iniziare l'espressione di MMP nella cartilagine dell'osteoartrite (Vuolteenaho K et al., Basic clin Pharmacol Toxicol 2014). Inoltre, l'adiponectina è in grado di indurre la produzione di MMP-1 e IL-6 nei fibroblasti sinoviali. La presenza di queste adipochine è associata a un'elevata permeabilità della sinovia infiammata. Inoltre, le adipochine sono in grado di attivare macrofagi, neutrofilii, cellule dendritiche, cellule killer naturali e cellule Th1. Numerosi mediatori infiammatori come IL-1 α e -1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, prostaglandine e ossido nitrico sono prodotti dal tessuto adiposo e sono apparentemente correlati alla malattia articolare. Alcuni autori, inoltre, hanno ipotizzato un legame tra i livelli di leptina e la gravità dell'osteoartrite nel ginocchio (Ku JH et al, clin rheumatol 2009). Pertanto, il tessuto adiposo e il rilascio di vari mediatori infiammatori potrebbero giocare un ruolo chiave nella patogenesi dell'osteoartrite.

1.2.5 L'origine multipla degli adipociti: Linee cellulari adipose e origine embrionaria

A causa della distribuzione ubiquitaria delle cellule adipose, una questione chiave per comprendere lo sviluppo del tessuto adiposo è quella della sua origine embrionale. Da molti anni, è noto che gli adipociti derivano dalla nicchia perivascolare (Crisani M et al., Cell Stem Cell 2008; Lin G et al., Stem Cell Dev 2008), ma non è ancora chiaro quando,

come e dove le cellule migrano verso le loro nicchie. Questo suggerisce che gli adipociti possono originare da diverse cellule progenitrici. Tale teoria è supportata da numerosi studi, su modelli animali, che dimostrano come gli adipociti, durante l'embriogenesi, provengano da compartimenti diversi e indipendenti attraverso specifici meccanismi molecolari (Jiang Y et al., Cell Rep 2014). Il tessuto adiposo è considerato avere un'origine mesodermica, così come i tessuti muscolari e ossei. Lo sviluppo del mesoderma inizia con la migrazione di un gruppo di cellule tra l'endoderma e l'ectoderma. Questo strato di cellule si diffonde in direzione antero-posteriore e ventro-dorsale, dando origine a mesoderma assiale, della placca laterale, intermedio e paraassiale. Quest'ultimo darà poi origine ai somiti di segmentazione, da cui deriveranno i muscoli del tronco e lo scheletro assiale. In particolare, ciascun somite si divide in sclerotomo, miotomo e dermomiotomo. Le cellule progenitrici di questi compartimenti somitici hanno capacità di sviluppo distinte:

1. Dallo sclerotomo derivano i tessuti cartilaginei e osteoidi dello scheletro assiale;
2. Dal miotomo si sviluppano i muscoli del tronco (Pang D and Thompson DNP, Childs Nerv Syst 2011);
3. Dal dermomiotomo, i progenitori mostrano una grande diversità di linee cellulari, generando muscoli, derma del dorso e diversi depositi adiposi (Seale P et al., Nature 2008; Atit R et al., Dev Biol 2006; Lepper C and Fan CM, Genesis 2010; Sebo ZL et al., Development 2018).

Il mesoderma laterale si divide in strati splancnico e somatico. Questi due strati, oltre a vari organi toracici e addominali, generano anche adipociti nei depositi adiposi sottocutanei viscerali e associati agli arti (Sanchez-Gurmaches J and Guertin DA, Nat Commun 2014a; Sanchez-Gurmaches J e Guertin DA, Biochim Biophys Acta 2014b). Al contrario, lo scheletro e i muscoli del cranio e del viso hanno origine ectodermica, ovvero dalla cresta neurale. Ciascuno di questi foglietti germinali potrebbe dare origine al tessuto adiposo.

Le cellule adipose sono in grado di differenziarsi diversamente nei mammiferi; le cellule adipose bianche sono correlate allo stoccaggio dei lipidi e quelle brune al consumo energetico. Mentre l'origine degli adipociti bianchi rimane incerta, è chiaro, tuttavia, che gli adipociti bruni derivano da una cellula progenitrice mesenchimale distinta, condivisa con il muscolo scheletrico ma non con il tessuto adiposo bianco. Sono stati fatti molti progressi nello studio della definizione delle reti trascrizionali che sottolineano la differenziazione terminale dei progenitori degli adipociti, ma la ricerca sull'origine embrionale delle linee adipose è solo agli inizi (Billon N and Dani C, Stem Cell Rev Rep 2012). Nella regione toracica, gli adipociti bianchi originano da progenitori adipocitari situati nella parete murale dei vasi sanguigni (**Figura 7**) derivanti da cellule staminali

mesenchimali derivate dal mesoderma laterale, che si sviluppano da un precursore comune endoteliale e mesenchimale (Tang W et al., Science 2008).

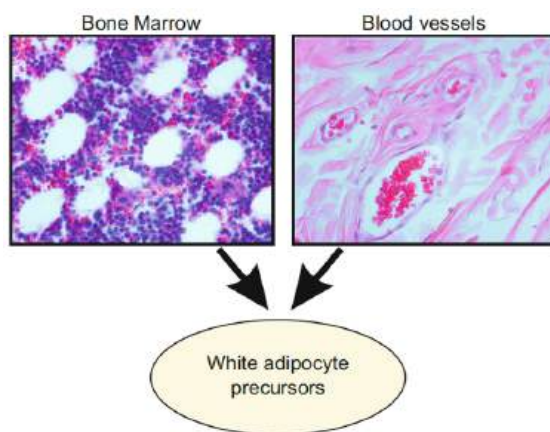


Fig 7: Rappresentazione schematica che riassume le principali fonti degli adipociti bianchi nel tessuto adulto. La ricerca sull'origine embrionale delle linee adipose è ancora agli inizi. La teoria più accettata suggerisce l'esistenza di un precursore comune endoteliale e mesenchimale. (da De Francesco F et al, Adv Exp Med Biol 2024).

È notevole che i depositi di adipociti bianchi della testa, a differenza dei loro omologhi del tronco, si sviluppino dalla cresta neurale e non dai precursori mesodermici (Billon N et al., Development 2007). Alcuni autori hanno scoperto, in particolare, che la presenza di cellule staminali adipose nel tessuto adiposo intorno all'arco aortico (PAAR) origina da cellule della cresta neurale (NCC), una popolazione di cellule migratorie derivata dall'ectoderma (**Figura 8**) (Fu M et al., arterioscler Thromb Vasc Biol 2019; Qi Y et al., J Vis Exp 2020). In contrasto, gli adipociti bruni e i muscoli scheletrici condividono una linea comune e unica che coinvolge precursori positivi per myf5 derivati dal mesoderma paraassiale (**Figura 9**). In un recente studio, Sanchez-Gurmaches e colleghi (Sanchez-Gurmaches J et al., Cell Metabol 2012) hanno riscontrato che Myf5 era espresso non solo in depositi consistenti in BAT, ma anche in WAT retroperitoneale e, in misura minore, nell'inguine e perigonadico (**Figura 8**).

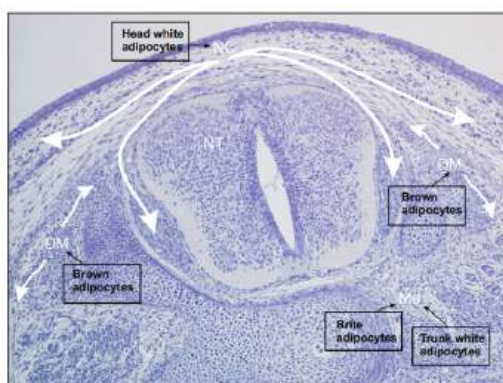


Fig 8: Immagine schematica che indica le principali fonti di adipociti bianchi, adipociti bruni e adipociti bruni durante lo sviluppo embrionale dei mammiferi. DM dermomiotomo, Me mesenchima, NC cresta neurale, NT tubo neurale. (da De Francesco F et al, Adv Exp Med Biol 2024).

Gli adipociti beige/brite possiedono caratteristiche comuni sia con gli adipociti bruni che con quelli bianchi. Questi tipi intermedi si svilupperanno nel WAT in seguito a stimolazione β -adrenergica ed esposizione al freddo. Queste cellule condividono anche origini comuni con le cellule adipose bianche del tronco (Cousin B et al., *Biochem J* 1993; Boon MR and van Marken Lichtenbelt WD, *Handb Exp Pharmacol* 2016; Frontini A and Cinti S, *Cell Metabol* 2010) (**Figura 9**).

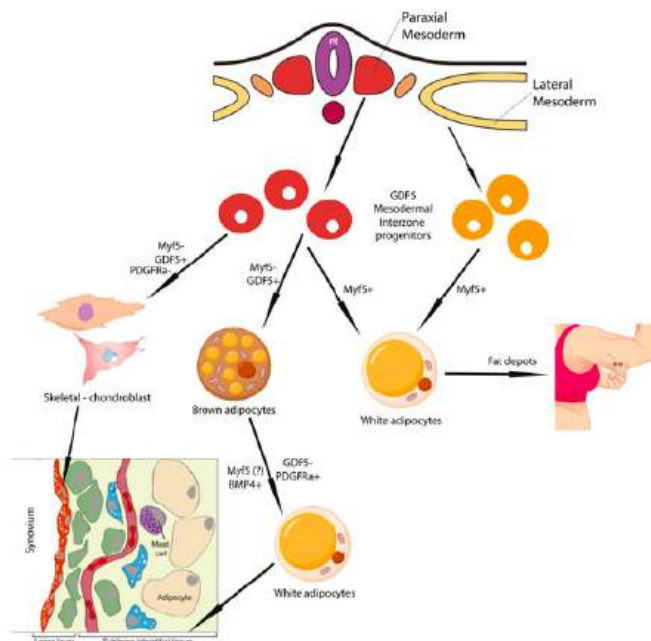


Fig 9: Fasi distinte e rispettivi marcatori durante lo sviluppo degli adipociti bianchi/beige/bruni. Durante l'embriogenesi, gli adipociti sono generati da cellule della cresta neurale e cellule mesodermiche. Gli adipociti bianchi e beige probabilmente hanno la stessa origine, derivando da cellule staminali della placca laterale, mentre gli adipociti bruni, le cellule muscolari scheletriche e una piccola percentuale di adipociti bianchi derivano da cellule mesodermiche paraassiali, così come le cellule dell'articolazione sinoviale. È probabile l'esistenza di un progenitore comune, regolato dall'espressione di GDF5, che mostra una grande eterogeneità trascrizionale con un gruppo di cellule che tende verso uno stato mesenchimale (adipocita) e un gruppo che tende verso uno stato condroprogenitore (sinovia). (da De Francesco F et al, *Adv Exp Med Biol* 2024).

Va notato che un processo di transdifferenziazione reversibile tra adipociti bianchi e bruni può basarsi su adipociti bruni generati nel tessuto adiposo bianco, rispondendo a condizioni fisiologiche specifiche, senza l'impegno preliminare del precursore adipocitario (Cinti S, *Am J Physiol endocrinol Metab* 2009).

Oltre a queste diverse origini embrionali delle cellule adipose, è interessante notare che è stata documentata la presenza di progenitori adipocitari provenienti da cellule staminali mesenchimali migranti del midollo osseo (Sera Y et al., *Exp Hematol* 2009). Queste osservazioni suggeriscono l'ipotesi che il potenziale terapeutico della terapia a base di precursori mesenchimali adipocitari possa dipendere in modo significativo dall'origine anatomica del tessuto adiposo.

1.2.6 Osteoartrite: fisiopatologia e classificazione istologica

L'osteoartrite è caratterizzata dalla degradazione progressiva della cartilagine articolare, che porta a una disfunzione articolare. La ricerca attuale ha dimostrato che l'infiammazione è uno dei fattori chiave che contribuiscono alla distruzione della cartilagine nell'osteoartrite (Kim JR et al., *Int J Mol Sci* 2018). Nella sinovia dell'osteoartrite, si osserva frequentemente l'infiltrazione di cellule infiammatorie, a volte in un grado simile a quello visto nell'artrite reumatoide. La causa diretta dell'osteoartrite è sconosciuta, ma si pensa che derivi da alterazioni intrinseche del tessuto articolare o come risposta allo stress meccanico cumulativo. Tra i mediatori infiammatori, il ruolo delle citochine è stato studiato maggiormente, e sono state trovate numerose citochine nelle articolazioni affette da osteoartrite, in correlazione con la severità dell'infiammazione; queste svolgono vari ruoli nel perturbare l'equilibrio tra l'attività catabolica e anabolica nei tessuti articolari (Maldonado M and Nam J, *Biomed Res Int* 2013). Le citochine IL-1 β , IL-6 e TNF- α ricoprono i ruoli più importanti nella patogenesi e nell'infiammazione nell'osteoartrite (Wojdasiewicz P et al, *Mediat Inflamm* 2014). Le citochine proinfiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale α , sono significative, anche se esiste un equilibrio tra i processi anabolici e catabolici mediati dalle citochine (Kobayashi M et al, *Arthritis Rheum* 2005). La progressione della malattia può portare a disabilità significativa, perdita di funzione e diminuzione della qualità della vita per il paziente. La fisiopatologia della progressione dell'osteoartrite è caratterizzata da vari gradi di infiammazione e degenerazione della cartilagine associati a cambiamenti nel tessuto osseo subcondrale, nella sinovia e in altri tessuti articolari. I condrociti, unici tipi cellulari presenti nella cartilagine articolare matura, sono responsabili della sintesi e del mantenimento della matrice extracellulare della cartilagine, composta di collagene e proteoglicani. In articolazioni sane, i condrociti mantengono un equilibrio tra i processi anabolici e catabolici, fondamentali per preservare le proprietà strutturali e funzionali della cartilagine articolare (Triche R and Mandelbaum BR, *Foot & Ankle Clinics* 2013). Le principali componenti della matrice extracellulare della cartilagine articolare sono il collagene di tipo II, l'aggrecano e altri proteoglicani che conferiscono al tessuto le sue uniche proprietà bio-meccaniche. Durante la progressione dell'osteoartrite, l'equilibrio tra sintesi e degradazione della matrice cartilaginea viene interrotto, portando a una perdita progressiva della cartilagine articolare (Mort JS and Billington CJ, *Arthritis Res Ther* 2001). Ciò avviene in parte perché i condrociti non riescono più a mantenere il corretto fenotipo della cartilagine articolare e non possono

sostenere il giusto equilibrio tra sintesi e degradazione (Noyszewski EA et al., *Arthritis & Rheumatism* 2001). Le citochine proinfiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale α , sono rilevanti; tuttavia, persistono in un equilibrio tra i processi anabolici e catabolici indotti dalle citochine.

Il sistema di valutazione OARSI (Osteoarthritis Research Society International) considera le caratteristiche istologiche dell'osteoartrite (**Figura 10**). La severità dell'osteoartrite può essere classificata in sei gradi, con il Grado 0 che indica cartilagine normale. I Gradi 1-4 riguardano solo i danni alla cartilagine articolare, mentre i Gradi 5 e 6 comprendono anche l'osso subcondrale (Pritzker KPH et al, *Osteoarthritis Cartilage* 2006).

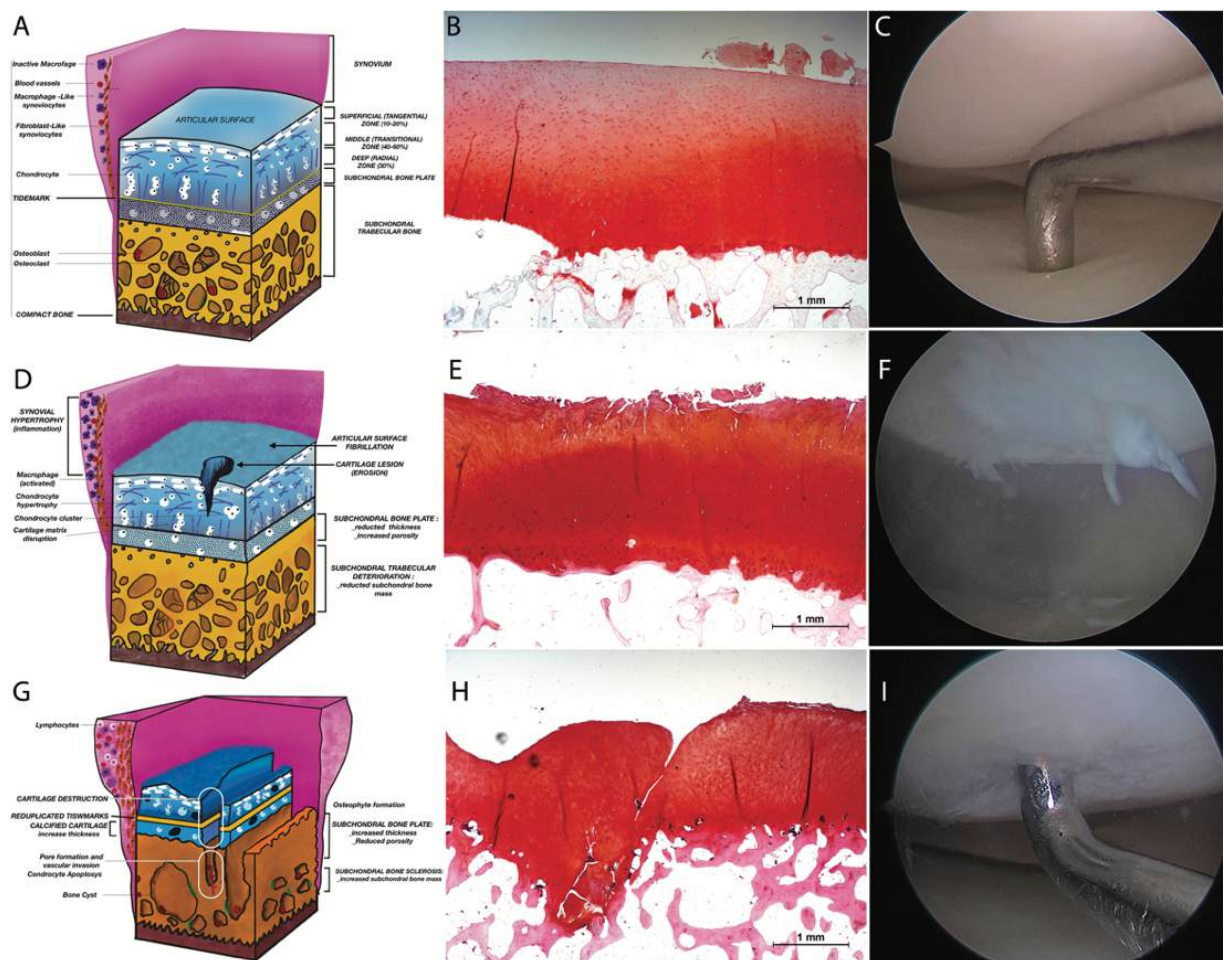


Fig 10. Osteoarthritis severity score by OARSI

Le caratteristiche istologiche della classificazione per gradi dell'osteoartrite coinvolgono la profondità verticale, con punteggi progressivi in base alla profondità. Inoltre, con la progressione della malattia, si osservano anche alterazioni osteoartritiche nelle aree circostanti della cartilagine, coinvolgendo successivamente l'intera area articolare (Mobasheri A et al, *Maturitas* 2014). Le caratteristiche istologiche della classificazione per stadi dell'OA comprendono la superficie, l'estensione dell'area o del volume, con punteggi

che progrediscono in base alla lunghezza o al volume. La malattia implica la degenerazione della cartilagine articolare, un'inflammation sinoviale di basso grado e modifiche nei tessuti molli articolari e nell'osso subcondrale. L'inflammation è un prodotto finale di questi sviluppi ed è il componente principale dell'osteoartrite, dove la sinovia produce mediatori catabolici e pro-inflammatori come citochine, chemokine e adipokine, generando anche ossidi nitrici, prostaglandine E2 e neuropeptidi. Questi fattori causano instabilità tra degradazione e riparazione della matrice cartilaginea. Tali alterazioni peggiorano ulteriormente l'inflammation sinoviale, generando un circolo vizioso che esacerba i sintomi e la degenerazione dell'articolazione (Sellam J and Berenbaum F, Nat Rev Rheumatol 2010). I fondamentali processi di riparazione della cartilagine danneggiata sono notevolmente limitati dalle caratteristiche del tessuto, che possiede uno scarso potenziale di auto-riparazione. La traslazione verso il sito contenente condrociti compromessi, macrofagi e globuli ematici è fattibile solo se c'è un'interruzione dell'osso subcondrale sottostante. Questo processo di riparazione culmina nella formazione di un coagulo di fibrina. Pertanto, le cellule staminali residenti guidano il processo di riparazione della matrice, sostituendo il coagulo di fibrina, differenziandosi in nuovi condrociti e secreti una matrice ricca di proteoglicani per rimodellare il sito difettoso (Fellows CR et al, Front Genet 2016), il che porterà allo sviluppo di un tessuto fibroso debole e, ancora una volta, alla degenerazione della cartilagine e a complicazioni ricorrenti. La riparazione inefficace è dovuta sia a una carenza di vasi sanguigni, essenziali per una risposta efficiente, sia alla bassa presenza di condrociti incapaci di migrare, dalle lacune, all'area danneggiata. Pertanto, è spesso necessaria un intervento estrinseco per rigenerare il tessuto compromesso e, soprattutto, per fermare la progressione della malattia. Considerando che il trattamento più efficace, in una fase avanzata della malattia, è la sostituzione dell'articolazione con una protesi, sono stati proposti molti altri trattamenti chirurgici, come l'osteotomia e l'artroscopia (De l'Escalopier N et al, Ann Phys Rehabil Med 2016).

1.3 DIAGNOSI

1.3.1 Clinica

Le articolazioni tipicamente interessate dall'artrosi (OA) includono il ginocchio, l'anca, le articolazioni interfalangee distali e prossimali, le prime articolazioni trapeziometacarpali (articolazioni carpometacarpali), la prima articolazione metatarsofalangea e le articolazioni faccettali della colonna vertebrale. Le articolazioni meno frequentemente colpite comprendono il gomito, il polso, la spalla e la caviglia. Numerose caratteristiche cliniche

sono osservate nei pazienti con artrosi, che possono derivare dall'accumulo di liquido sinoviale, dall'infiammazione attiva o dalla deformità ossea delle articolazioni (Hunter DJ et al, *Rheum Dis Clin North Am* 2009). Nelle fasi precoci dell'artrosi, la diagnosi si basa principalmente su osservazioni cliniche, tra cui dolore articolare, rigidità e compromissione della funzionalità fisica. L'identificazione di cambiamenti strutturali nell'osso e nella cartilagine può risultare complessa, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia. Altre manifestazioni cliniche comuni includono la tenerezza lungo la linea articolare, la riduzione dell'ampiezza sia del movimento passivo che attivo, crepitii, versamento articolari e gonfiore osseo e deformità (Abhishek A and Doherty M, *Rheum Dis Clin North Am* 2013). Tali manifestazioni possono essere localizzate a un'unica articolazione o presentarsi in forma poliarticolare. I noduli di Heberden e Bouchard (gonfiore alle articolazioni interfalangee distale e prossimale, rispettivamente) sono frequentemente osservati (Alexander CJ, *Ann Rheum Dis* 1999; AlexandeBar CJ, *Ann Rheum Dis* 1999). La presenza di una cisti poplitea è spesso una conseguenza dell'artrosi del ginocchio. Si possono anche osservare deformità varo o valgo. Nell'anca, è comune riscontrare limitazioni nella rotazione interna durante l'esame clinico. Crepitii e diminuzione dell'ampiezza di movimento, in particolare per la rotazione esterna, sono frequentemente evidenti durante l'esame fisico della spalla. Nell'artrosi del piede, si può riscontrare dolore nella prima articolazione metatarsofalangea con limitata ampiezza di movimento della stessa. Inoltre, si può osservare deformità del primo dito (alluce valgo) durante l'esame fisico.

1.3.2 Imaging

L'artrosi (OA) è principalmente una diagnosi clinica. La radiografia convenzionale rimane la modalità di imaging principale per la diagnosi e il monitoraggio dell'artrosi (Wang X et al, *Rheumatology* 2018). Le modifiche radiografiche associate all'artrosi includono il restringimento dello spazio articolare, la sclerosi subcondrale, la formazione di osteofiti e la presenza di cisti subcondrali (Steenkamp W et al, *SICOT J* 2022). L'articolazione del ginocchio è generalmente valutata mediante radiografie in estensione del ginocchio, eseguite mentre il paziente è in carico. Le radiografie del ginocchio flessio sono anche utilizzate per migliorare la visualizzazione intra-articolare. Sono disponibili diversi schemi di classificazione per la valutazione del restringimento dello spazio articolare o della formazione di osteofiti; uno dei più comuni è il sistema di classificazione di Kellgren-Lawrence (Kellgren JH and Lawrence JS, *Ann Theum Dis* 1957). Le caratteristiche radiografiche dell'artrosi descritte da Kellgren e Lawrence includono la valutazione dei

seguenti aspetti: formazione di osteofiti sui margini articolari o sulle spine tibiali, ossicini periarticolari (articolazioni interfalangee distali o prossimali), restringimento della cartilagine articolare associato a sclerosi dell'osso subcondrale, piccole aree pseudocistiche con pareti sclerotiche situate nell'osso subcondrale e alterazioni nella forma delle estremità ossee. La classificazione è suddivisa nei seguenti gradi (**Figura 11**):

- Grado 0: nessun restringimento dello spazio articolare o cambiamenti reattivi.
- Grado 1: restringimento dello spazio articolare dubbio, possibile formazione di osteofiti.
- Grado 2: osteofiti definitivi, possibile restringimento dello spazio articolare.
- Grado 3: osteofiti moderati, evidente restringimento dello spazio articolare e possibile deformità delle estremità ossee.
- Grado 4: grandi osteofiti, marcato restringimento dello spazio articolare, sclerosi severa, deformità ossea definita.

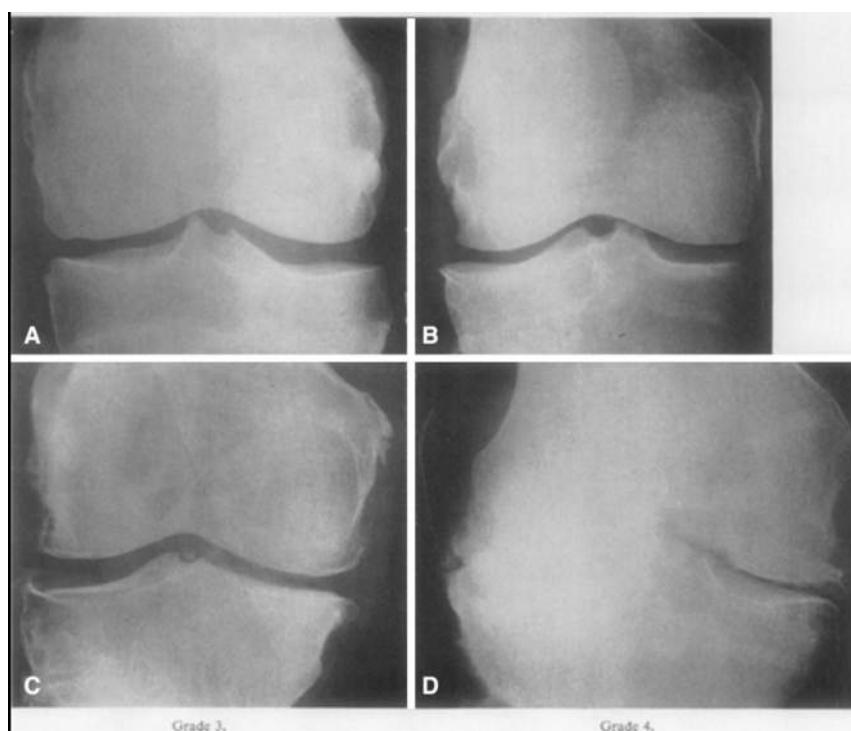


Fig 11. Original classification in Kellgren-Lawrence article (A) Grade 1;(B) Grade 2; (C) Grade3; (D) Grade 4 (Kohn MD at AI; Clin Orthop Relat Res. 2016)

La risonanza magnetica (RM) rappresenta una modalità utile per visualizzare la cartilagine, le strutture ossee e gli elementi di tessuto morbido dell'articolazione (Burge AJ and Jawetz ST, Semin Musculoskelet Radiol 2020). L'uso della RM e della tomografia computerizzata è raramente necessario. L'ecografia può rivelarsi utile per visualizzare l'infiammazione sinoviale, il versamento e gli osteofiti. La forza muscolare, i range di movimento, la deambulazione, l'equilibrio, la contrattura da flessione e le deformità possono essere tutti

valutati (Braun HJ and Gold GE, Bone 2011; Roemer FW et al., Best Pract Res Clin Rheumatol 2014).

1.3.3. Test di laboratorio

Non esistono test di laboratorio definitivi per diagnosticare l'osteoartrite. I risultati dei test di laboratorio sono solitamente normali nei pazienti affetti da osteoartrite, anche se possono essere utili per restringere le diagnosi differenziali quando la diagnosi è incerta. I livelli di proteina C-reattiva e la velocità di sedimentazione degli eritrociti possono rivelarsi utili per valutare la presenza di condizioni infiammatorie sistemiche e disturbi autoimmuni. Questi sono spesso normali o solo lievemente elevati nell'osteoartrite (Harrison M, Aust Prescr 2015). Un livello di acido urico può aiutare a valutare la presenza di gotta. Le linee guida cliniche stabilite dall'American College of Rheumatology sconsigliano l'ordinazione routinaria di pannelli per artrite per i pazienti con problemi articolari (Clinical Guidelines. Arthritis Rheum. 1996).

1.4 TRATTAMENTO

Attualmente non esiste una cura definitiva per l'osteoartrite. Il trattamento per l'osteoartrite è principalmente un insieme di interventi farmacologici e non farmacologici (Yusuf E et al, Curr treat Options in Rheum 2016) (**Figure 12**). I trattamenti non farmacologici (Sharma M et al, J Clin Orthop Trauma 2018) includono la perdita di peso, la terapia fisica, l'esercizio fisico, l'educazione del paziente e l'uso di dispositivi di supporto. I trattamenti farmacologici (Richard MJ et al, Osteoarthritis Cartilage 2023) comprendono l'acetaminofene, i farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), i FANS topici, le iniezioni di corticosteroidi intraarticolari e la viscosupplementazione intraarticolare. Tra i trattamenti più avanzati figurano interventi chirurgici (Brumat P et al, Life 2022) come l'osteotomia, la chirurgia artroscopica e la sostituzione articolare. Inoltre, emergono evidenze per diversi trattamenti innovativi (Siddiq MAB et al, Joint Bone Spine 2024) come modificatori sintomatici, agenti modificanti la malattia, farmaci anti-obesità e il blocco del nervo genicolato e ablazione mediante radiofrequenza ma anche per diversi trattamenti rigenerativi (Im GI, Bone Joint Res 2021) come utilizzo di cellule staminali, esosomi e genomica. Nelle fasi iniziali dell'osteoartrite, il trattamento è incentrato sulla riduzione del dolore e della rigidità (Farinelli L et al, Biomedicines 2024). In seguito, l'obiettivo del trattamento si sposta verso il mantenimento della funzione fisica.

	Treatment	OARSI Guidelines Recommendation
Reduction in modifiable risk factor	Weight loss	Appropriate
	Exercise	Appropriate: both land and water based, including strengthening
Bracing and physical modalities	Cane	Appropriate for knee-only OA
	Crutches	Uncertain
	Biomechanical interventions	Appropriate
Alternative therapies	T'ai Chi	No recommendation
	Acupuncture	Uncertain
	Balneotherapy/spa	Appropriate with individuals with multiple joint OA Uncertain with knee-only OA
	NMES	Not appropriate
	Self-management and education	Appropriate
	Cognitive behavioral therapy	No recommendation
	TENS	Uncertain in knee-only OA, otherwise inappropriate
	Ultrasound	Uncertain in knee-only OA, otherwise inappropriate
	Laser therapy	No recommendation
	Electromagnetic field therapy	No recommendation
	Pharmacologic (oral)	Acetaminophen
Avocado soybean unsaponifiables		Uncertain
Chondroitin/glucosamine		Uncertain for symptom relief, not appropriate for disease modification
Diacerein		Uncertain
Duloxetine		Appropriate with multijoint OA, uncertain in knee-only OA
NSAIDs		Appropriate in those without significant comorbidities
Opioids		Uncertain
Risedronate	Not appropriate	
Rosehip	Uncertain	
Pharmacologic (topical)	Capsaicin	Appropriate in knee-only OA
	NSAIDs	Appropriate in knee-only OA, uncertain in multijoint OA
	Tramadol	No recommendation
	Opioids	Uncertain
Pharmacologic (intraarticular)	Topical NSAIDs	No recommendation
	Corticosteroids	Appropriate
	Hyaluronic acid	Uncertain in knee-only OA, not appropriate in multijoint OA

Data from Rannou F, Poiraudou S, Beaudreuil J. Role of bracing in the management of knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22(2):218–222.

Fig. 12: Diverse opzioni terapeutiche per la cura dell'osteoartrite secondo le linee guida fornite dall'OARSI (Osteoarthritis Research Society International)

1.4.1 Gestione del dolore nell'osteoartrite

La sensazione di dolore costituisce un sintomo chiave nell'osteoartrite. Nelle fasi iniziali dell'osteoartrite, il dolore è correlato all'attività, mentre con la progressione della malattia esso diventa cronico e si manifesta attraverso attacchi dolorosi intensi. La cartilagine articolare negli adulti è avascolare e anuerale (Fox S et al, *Sports Health* 2009), pertanto, la cartilagine non può generare dolore o infiammazione in modo diretto, in particolare nelle fasi precoci della malattia, prima di una potenziale invasione neurovascolare che si verifica nelle fasi avanzate o terminali della malattia (O'Neill TW and Felson DT, *Curr Osteoporos Rep* 2018). Alterazioni patologiche nei tessuti articolari non cartilaginei, come l'osso sottocondrale, la sinovia, la capsula articolare, i legamenti periarticolari e i muscoli periarticolari, sono abbondantemente innervati e rappresentano fonti potenziali di dolore

nell'osteoartrite. Durante la fase infiammatoria o il processo di deterioramento della cartilagine, vengono rilasciati mediatori infiammatori che sensibilizzano i nervi afferenti primari. L'osso sottocondrale e i recettori del dolore risultano pertanto esposti a causa della perdita di cartilagine, portando a congestione vascolare dell'osso sottocondrale e a un aumento della pressione intraossea. Sono state segnalate fibre nervose sensoriali nei canali vascolari in relazione all'angiogenesi osteocondrale, suggerendo un possibile origine del dolore sintomatico (Omoigui S, Med Hypotheses 2007; Omoigui S, Med Hypotheses 2007). La gestione dell'osteoartrite si concentra principalmente sul sollievo dei sintomi, considerando la limitata comprensione dell'etiopatogenesi che ostacola lo sviluppo di adeguati farmaci modificanti la malattia. Secondo le linee guida stabilite dall'American College of Rheumatology (ACR) (Kolasinski SL et al, Arthritis Care Res 2020) e dalla Osteoarthritis Research Society International (OARSI) (Bannuru RR et al, Osteoarthr Cartil 2019), la gestione fondamentale dell'osteoartrite include l'educazione del paziente e la gestione autonoma, esercizi a terra come esercizi di rafforzamento, cardiovascolari, di equilibrio, neuromuscolari o esercizi mente-corpo, oltre alla gestione del peso per individui sovrappeso o obesi. Inoltre, per l'osteoartrite del ginocchio, le linee guida suggeriscono alternative di trattamento come l'esercizio acquatico, dispositivi di aiuto alla deambulazione, farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) topici e orali, iniezioni intra-articolari di steroidi e tutori tibiofemorali. Le linee guida OARSI raccomandano l'uso di FANS topici, ma consigliano di utilizzare iniezioni intra-articolari, FANS orali, inibitori della pompa protonica e inibitori della COX-2 solo in condizioni specifiche. Nel caso dell'osteoartrite dell'anca, entrambe le linee guida raccomandano fortemente l'educazione del paziente, la gestione autonoma e gli esercizi a terra come strategie terapeutiche principali. L'uso orale di FANS e gli esercizi mente-corpo sono fortemente raccomandati da entrambe le linee guida, mentre le linee guida ACR suggeriscono ulteriormente l'uso di dispositivi di aiuto alla deambulazione, iniezioni intra-articolari di glucocorticoidi e perdita di peso. Per l'osteoartrite della mano, il consiglio terapeutico dell'ACR e dell'EULAR (European Alliance of Associations for Rheumatology) include la formazione del paziente, esercizi per le mani e ortesi come approcci di trattamento fondamentali (Kloppenburger M et al, Ann Rheum Dis 2019). Attualmente, non esiste un trattamento in grado di modificare il decorso dell'osteoartrite e la terapia si concentra sulla mitigazione del dolore e sul miglioramento della funzionalità. In particolare, vengono proposti farmaci, tra cui FANS, acetaminofene, duloxetina, oppioidi, FANS topici e capsaicina (Richard MJ et al, Osteoarthr Cartil 2022). Inoltre, le iniezioni intra-articolari coinvolgono comunemente corticosteroidi, acido ialuronico (HA), ozono, plasma ricco di fattori di crescita e plasma

ricco di piastrine (Rastogi AK et al, Am J Roentgenol 2016). Attualmente sono in corso studi clinici su terapie intra-articolari innovative, inclusi trattamenti biologici, terapie geniche e terapie cellulari (De Francesco F et al, Int J Mol Sci 2021).

1.4.2. Somministrazione intra-articolare di farmaci

Le iniezioni intra-articolari offrono un accesso diretto all'articolazione, con la potenzialità di alleviare i sintomi infiammatori. La prospettiva delle iniezioni intra-articolari è promettente e vantaggiosa rispetto alla somministrazione sistemica. Tuttavia, un significativo svantaggio consiste nella rapida eliminazione dei farmaci dall'articolazione, rappresentando un ostacolo sostanziale all'efficacia del trattamento (Jones IA et al, Nat Rev Rheumatol 2019). Attualmente, le iniezioni intra-articolari costituiscono il componente centrale del trattamento non chirurgico per l'osteoartrite (OA) (Bannuru RR et al, Osteoarthr Cartil 2019). Le evidenze esistenti indicano l'efficacia del trattamento nel ridurre il dolore a breve termine nei pazienti affetti da osteoartrite, migliorando la funzionalità articolare con un rischio minimo di lesioni al paziente (Wehling P et al, Ther Adv Musculoskelet Dis 2017). Le iniezioni intra-articolari consentono un accesso immediato all'articolazione, aumentando così la biodisponibilità mirata dei farmaci e riducendo gli eventi avversi, l'esposizione complessiva e i costi. Nonostante la sicurezza riconosciuta delle iniezioni intra-articolari, la rapida clearance dei farmaci impone delle limitazioni sui loro effetti terapeutici (Arden NK et al., Nature Rev Rheumatol 2021). Inoltre, fattori quali gli effetti sistemici, le tecniche di somministrazione e il tempo di permanenza del farmaco contribuiscono alla variabilità del trattamento (Gerwin N et al, Adv Drug Deliv Rev 2006).

1.4.3. Somministrazione intra-articolare di Corticosteroidi

I corticosteroidi mostrano potenzialità anti-infiammatorie e immunosoppressive, con un meccanismo d'azione complesso che implica un'interazione immediata con i recettori steroidei nucleari, perturbando sia la cascata immunologica che il processo infiammatorio in diverse fasi. Tale meccanismo consente ai corticosteroidi di ridurre la permeabilità vascolare e di ostacolare l'aggregazione delle cellule infiammatorie (Richard MJ et al, Osteoarthr Cartil 2022; Rastogi AK et al, Am J Roentgenol 2016; Jones IA et al, Ther Adv Musculoskelet Dis 2017). Inoltre, impediscono la fagocitosi, lo sviluppo di superossido da parte dei neutrofili, le metalloproteasi e gli attivatori delle metalloproteasi. I corticosteroidi inibiscono anche la sintesi e l'emissione di numerosi mediatori infiammatori, tra cui prostaglandine e leucotrieni (Ahmad B et al, BMJ 2004). Cinque corticosteroidi iniettabili

hanno ricevuto approvazione dalla Food and Drug Administration (FDA) per iniezioni intra-articolari, che includono acetato di metilprednisolone, acetato di triamcinolone, acetato e fosfato sodico di betametasona, esacetone di triamcinolone e desametasona. Nella pratica clinica, gli anestetici locali vengono frequentemente associati ai corticosteroidi prima dell'iniezione per fornire un'anestesia ad insorgenza rapida. Da questa pratica comune non esistono evidenze che suggeriscano che l'aggiunta di anestetici locali alle preparazioni di corticosteroidi modifichi le proprietà fisiche o l'efficacia del corticosteroide (Arroll B and Goodyear-Smith F, BMJ 2004; Estee MM et al, BMC Musculoskelet Disord 2022). Nella gestione delle condizioni infiammatorie acute e croniche, le iniezioni intra-articolari di corticosteroidi sono comunemente utilizzate (Ostergaard M and Halberg P, BioDrugs 1998). Queste iniezioni sono particolarmente vantaggiose durante le riacutizzazioni di osteoartrite, quando sono presenti segni di infiammazione e versamento articolare (Cushman DM et al, Sports Health 2022). In questo contesto, sono stati condotti numerose meta-analisi per indagare il tipo ottimale di corticosteroide, valutare la sicurezza del trattamento e, soprattutto, valutare la sua efficacia in relazione alla durata del sollievo dal dolore. In una revisione sistematica della Cochrane (Bellamy N et al, Emergencias 2006), i confronti tra vari corticosteroidi intra-articolari hanno rivelato che l'esacetone di triamcinolone dimostrava superiorità rispetto al betametasona in termini di riduzione del dolore duratura fino a 4 settimane dopo l'iniezione. Inoltre, in altre revisioni sistematiche della letteratura condotte nel 2009, è stata esaminata la durata dell'azione delle iniezioni intra-articolari di corticosteroidi nell'alleviare il dolore (Hepper CT et al, J Am acad Orthop Surg 2009). I risultati della revisione indicavano l'associazione dei corticosteroidi intra-articolari con una diminuzione della sensazione dolorosa che persisteva per un periodo minimo di una settimana, suggerendo che i corticosteroidi intra-articolari dovrebbero essere considerati esclusivamente come un trattamento transitorio per i casi cronici.

Il sottocomitato sull'osteoartrite dell'American College of Rheumatology (ACR) raccomanda le iniezioni di corticosteroidi come metodo efficace per ridurre il dolore (Kolanski SL et al, Arthritis Care Res 2020). Analogamente, l'Osteoarthritis Research Society International (OARSI) consiglia l'uso di corticosteroidi intra-articolari per il dolore associato a OA sintomatica (Bannuru RR et al, Osteoarthr Cartil 2019). Una revisione sistematica indica un effetto terapeutico modesto, solitamente della durata media di 2-4 settimane (Juni P et al, Emergencias 2015). A causa della durata limitata della terapia, le iniezioni di richiamo (fino a quattro somministrazioni annuali) sono comunemente necessarie. Recentemente, studi hanno riferito dell'uso ricorrente di corticosteroidi intra-

articolari in relazione a un aumento della perdita cartilaginea (McAlindon TE, JAMA 2017). In alternativa, la European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) ha suggerito un uso moderato dei corticosteroidi in specifiche condizioni di controindicazione agli FANS o di alleviamento insufficiente dopo trattamento con FANS, specificamente per un periodo ridotto di analgesia (Bruyere O et al, Semin Arthritis Rheum 2019). Al contrario, l'efficacia delle iniezioni di corticosteroidi presenta incertezze; perciò, nel 2021, la European League Against Rheumatism (EULAR) ha proposto di utilizzare le iniezioni intra-articolari di corticosteroidi solo nei casi di esacerbazione del dolore, in particolare con versamento associato, evitando l'uso di corticosteroidi intra-articolari in casi di dolore acuto insorto di recente senza una diagnosi appropriata (Uson J et al, Ann Rheum Dis 2021). Tuttavia, il gruppo di lavoro dell'American Society of Orthopaedic Surgeons ha interpretato le evidenze come inconclusive riguardo ai benefici dei corticosteroidi intra-articolari e si è astenuto dal fornire raccomandazioni per la somministrazione nelle linee guida per i pazienti con OA sintomatica (Martin CL et al, J Am Acad Orthop Surg 2019). In sintesi, le evidenze di ricerca disponibili suggeriscono che le iniezioni intra-articolari di corticosteroidi portano a una riduzione a breve termine del dolore associato all'osteoartrite. Possono essere considerate una terapia adiuvante in associazione con il trattamento di base per alleviare il dolore da moderato a severo negli individui con OA.

1.4.4. Somministrazione intra-articolare di Acido Ialuronico

L'acido ialuronico può essere estratto da creste di gallo o prodotto tramite fermentazione batterica in vitro (Sze JH et al, 3 Biotech 2016). L'acido ialuronico è definito come un glicosaminoglicano lineare non solfato, formato principalmente da un'unità ripetuta di N-acetilglucosamina e acido glucuronico, collegati da legami glicosidici β -(1-4) e β -(1-3), contribuendo a una struttura attivamente resistente (Fallacara A et al, Polymers 2018). I disaccaridi possiedono una massa molecolare (MW) approssimativa di 400 Da, e una catena di acido ialuronico può contenere fino a 10.000 disaccaridi, risultando in una massa molecolare di circa 4.0×10^3 kDa (Kotla NG et al, J Control Release 2021). I prodotti iniettabili di ialuronano approvati dalla FDA includono l'ialuronato di sodio e l'ialuronano ad alto peso molecolare (Bowman S et al, Clin Transl Med 2018). L'ialuronano è una molecola derivata naturalmente dalla matrice extracellulare (ECM) presente nel liquido sinoviale, svolgendo un ruolo importante nella lubrificazione articolare. Le caratteristiche modificate dell'ialuronano nella sinovia possono generare infiammazione (Sze JH et al, 3 Biotech 2016). Una concentrazione ridotta e un peso molecolare medio di acido ialuronico

nella sinovia sono conseguenze di una diminuzione della sintesi di acido ialuronico, un aumento della degradazione di acido ialuronico e un elevato stress ossidativo (Nicholls AM et al, Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord 2017). Numerosi studi hanno segnalato che l'esposizione di condrociti e fibroblasti a frammenti di acido ialuronico a basso peso molecolare (LMW) (<400 kDa) può risultare in una sovraregolazione di citochine pro-infiammatorie (Sokolove J and Lepus CM, Ther Adv Musculoskelet Dis 2013; Campo GM et al, J Cell Biochem 2012; Monslow J et al, Front Immunol 2015). Al contrario, l'acido ialuronico ad alto peso molecolare (HMW) può provocare un effetto opposto su certi sistemi, inibendo mediatori come TNF- α e IL-1 (Wang CT et al., Osteoarthr Cartil 2006; Altman R et al, Cartilage 2018). Nel liquido sinoviale normale, l'acido ialuronico ad alto peso molecolare svolge sia funzioni di lubrificazione delle articolazioni sia di assorbimento degli urti. L'attività viscoelastica dell'acido ialuronico può variare in base alla forza applicata. Sotto sforzo di taglio, l'acido ialuronico funge da lubrificante che diminuisce gradualmente la viscosità, consentendo così una mobilità agevole. Al contrario, l'acido ialuronico agisce come un ammortizzatore sotto compressione, prevenendo danni articolari. Inoltre, l'acido ialuronico HMW nel liquido sinoviale è cruciale per mantenere l'integrità articolare intrinseca, necessaria per proteggere le cellule sinoviali e regolare la mobilità delle molecole di grandi dimensioni all'interno dell'articolazione, evitando così la liberazione di radicali liberi e prevenendo una risposta infiammatoria (Marinho A et al, Biomolecules 2021). In contesti infiammatori di osteoartrite o artrite reumatoide, l'acido ialuronico HMW viene dissipato da specie reattive dell'ossigeno (ROS), riducendo lo stato viscoso e compromettendo il suo potenziale lubrificante e di assorbimento degli urti (Berdiaki AZ et al, Antioxidants 2023). Questa deteriorazione porta a una compromissione del movimento articolare e a dolore (Sprott H et al, Pharmaceutics 2023). Inoltre, le riduzioni del dolore associate all'acido ialuronico intra-articolare sono state collegate a uno sviluppo ridotto di prostaglandina E2 e sostanza P, insieme alla restrizione diretta degli afferenti nocicettivi (Dray A et al, Arthritis Res Ther 2007). L'iniezione intra-articolare di acido ialuronico può rigenerare le caratteristiche viscoelastiche regolari del liquido sinoviale morfologicamente modificato, comunemente nota come "viscosupplementazione" (Conrozier T et al, Ther Adv Musculoskelet Dis 2021). È stato suggerito che l'acido ialuronico ripristini temporaneamente il potenziale lubrificante e di assorbimento degli urti del liquido sinoviale. Inoltre, ricerche precedenti riportano gli effetti modificanti la malattia degli aggrappanti viscosi (Goldberg V and Buckwalter J, Osteoarthr Cartil 2005), inclusa una diminuzione dell'infiammazione sinoviale (Pontes-Quero GM et al, Semin Arthritis Rheum 2019), un effetto protettivo in

relazione all'erosione cartilaginea e un miglioramento della produzione di acido ialuronico intra-articolare (Henrotin Y et al, *Semin Arthritis Rheum* 2015). Attualmente, esperimenti in vitro mostrano che la somministrazione di acido ialuronico a basso peso molecolare esogeno può potenziare la sintesi di proteine della matrice extracellulare, inclusi condroitina e solfato di cheratina, e proteoglicani (Henrotin Y et al, *Semin Arthritis Rheum* 2015). L'acido ialuronico possiede proprietà reologiche che possono alleviare il dolore attraverso (i) l'inibizione delle scariche dei nocicettori articolari, agendo come un autentico filtro elastoviscoso; (ii) l'ipersensibilità chimica dei terminali nocicettivi all'interno dei tessuti articolari infiammati, in gran parte associata alla concentrazione di HA (Caires R et al, *Nat Commun* 2015); (iii) e il rivestimento dei nocicettori situati nella sinovia, con un potenziale intrappolamento molecolare del segnale del dolore (Ghosh P and Guidolin D, *Semin Arthritis Rheum* 2002). Inoltre, iniezioni intra-articolari singole di acido ialuronico sono state indicate nella riduzione della percezione del dolore dovuta all'interferenza con l'elevazione indotta da lipopolisaccaridi (LPS) nello sviluppo di PGE2 e ciclossigenasi 2 (COX-2). Inoltre, l'attivazione dei recettori oppioidi può generare l'attività antinocicettiva dell'acido ialuronico (Zavan B et al, *PLoS One* 2013). L'acido ialuronico HMW ha la potenzialità di inibire gli eventi infiammatori associati all'osteoartrite (Kotla NG et al, *J Control Release* 2021), interrompendo le azioni dei frammenti di acido ialuronico a basso peso molecolare (LMW HA) sui recettori CD44, il recettore per la motilità mediata da acido ialuronico (RHAMM), i recettori toll-like (TLR)-2 e TLR-4 (Campo GM et al, *Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Basis Dis* 2011). Investigazioni in vitro (Misra S et al., *Front Immunol* 2015), così come studi in vivo (Salathia S et al, *Int J Mol Sci* 2023), suggeriscono che la somministrazione di acido ialuronico HMW risulta in una risposta anti-infiammatoria rilevante, mediata in parte dal blocco di CD44. Inoltre, l'acido ialuronico esogeno riduce i livelli di citochine infiammatorie e metalloproteinasi della matrice (MMP) nei tessuti estratti da pazienti affetti da OA e altre condizioni relative a lesioni articolari (Moreland LW, *Arthritis Res Ther* 2003), oltre all'inibizione della produzione di IL-1 e TNF- α (Lee CH et al, *Int J Mol Sci* 2021).

Per quanto riguarda l'osteoartrite, il sottocomitato dell'American College of Rheumatology (ACR) non offre raccomandazioni specifiche sull'uso di ialuronati intra-articolari e non fornisce indicazioni riguardo ai vari pesi molecolari dell'HA (Kolasinski SL et al, *Arthritis Care Res*). Inoltre, l'OARSI non fornisce specifiche sui pesi molecolari di acido ialuronico da utilizzare per ottenere un effetto duraturo. È stato inoltre osservato che l'acido ialuronico intra-articolare presenta un profilo di sicurezza complessivamente più adeguato rispetto alla somministrazione frequente di iniezioni di corticosteroidi (Bannuru RR et al,

Osteoarthr Cartil 2019). Tuttavia, l'American Society of Orthopaedic Surgeons sconsiglia l'uso di acido ialuronico intra-articolare in pazienti affetti da osteoartrite sintomatica del ginocchio a causa dell'assenza di un miglioramento clinicamente significativo (Jevsevar DS, J Am Acad Orthop Surg 2013), sebbene le linee guida affermino che l'acido ialuronico HMW ha mostrato superiorità rispetto all'acido ialuronico LMW nei vari studi analizzati. Il gruppo di lavoro considera altamente le evidenze a sostegno, così come riconosce la forza della raccomandazione riguardante l'uso di acido ialuronico intra-articolare nelle loro linee guida. In Europa, l'ESCEO ha fornito una raccomandazione debole per l'acido ialuronico, suggerendo il suo utilizzo solo in casi di controindicazione individuale agli FANS o di alleviamento insufficiente rispetto alla terapia con FANS (Bruyere O et al, Semin Arthritis Rheum 2019), con segnalazioni anche dell'inferiorità dell'acido ialuronico LMW e che l'acido ialuronico HMW è correlato a un'elevata incidenza di eventi avversi. Al contrario, l'EULAR raccomanda l'uso di iniezioni di acido ialuronico nel trattamento dell'osteoartrite, riportando l'efficacia dell'acido ialuronico nel trattamento dell'osteoartrite per ridurre il dolore e migliorare la mobilità (Jordan KM et al, Ann Rheum Dis 2003).

In sintesi, i risultati indicano la sicurezza complessiva delle iniezioni intra-articolari di acido ialuronico e la potenziale efficacia nella riduzione del dolore in casi di osteoartrite lieve del ginocchio per una durata di 24 settimane. Tuttavia, il costo di tali trattamenti è motivo di preoccupazione significativa e i pazienti devono essere adeguatamente informati. Pertanto, oltre a considerare le aspettative dei pazienti, i fornitori di assistenza sanitaria sono tenuti a valutare la convenienza economica prima di proporre il trattamento.

1.4.5. Somministrazione intra-articolare di Farmaci Analgesici/Antinfiammatori

I farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) sono frequentemente utilizzati per il trattamento dell'osteoartrite (Stoll V et al, Cureus 2023). I FANS rappresentano una vasta classe di composti classificati secondo la loro struttura chimica, selettività dei bersagli e caratteristiche farmacocinetiche. Tra i FANS rientrano i derivati dell'acido salicilico, come l'aspirina; i derivati degli acidi arilacetici, come ibuprofene e naprossene; i derivati degli acidi indoleacetici, come indometacina; i derivati dell'acido antranilico, come diclofenac; e i derivati degli acidi enolici, come meloxicam (Selig D et al, J Clin Pharm Ther 2022). I FANS prevengono la conversione dell'acido arachidonico in prostanoidei, inclusi prostaglandine, prostaciclina e trombassano, mediante l'inibizione della via della cicloossigenasi. I FANS interferiscono con entrambe le isoforme della cicloossigenasi (COX-1, COX-2); tuttavia, il grado di inibizione varia a seconda della selettività dell'FANS. FANS frequentemente impiegati, come diclofenac, naprossene, ibuprofene e

aspirina, inibiscono non selettivamente sia COX-1 che COX-2. Al contrario, celecoxib e meloxicam sono in grado di inibire entrambi gli enzimi COX, con una selettività preferenziale per COX-2 (Stoll V et al, *Cureus* 2023; Selig DJ et al, *J Clin Pharm Ther* 2022). Gli inibitori di COX-2 riducono la formazione di prostaciclina a favore del trombossano, un eicosano pro-trombotico. L'aumento relativo del trombossano, associato a una diminuzione della prostaciclina, può portare allo sviluppo di eventi cardiovascolari trombotici (Dray A and Read SJ, *Arthritis Res Ther* 2007). D'altro canto, un inibitore non selettivo di COX-1 e COX-2 può comportare tossicità gastrica a causa dell'inibizione di COX-1 nella mucosa gastrica (Jordan KM et al, *Ann Rheum Dis* 2003). Sebbene la somministrazione orale di FANS sia la via di somministrazione più comune, le iniezioni intra-articolari di FANS hanno guadagnato popolarità in vari contesti, con l'obiettivo di potenzialmente aumentare la concentrazione di FANS nel tessuto target e, contemporaneamente, ridurre le complicazioni sistemiche associate all'uso di FANS. Selig DJ e colleghi (*J Clin Pharm Ther* 2022) hanno esaminato le farmacocinetiche, la sicurezza e l'efficacia delle iniezioni intra-articolari di FANS, analizzando studi sia sugli animali che sugli esseri umani che riportano sulla sicurezza e sull'efficacia delle dosi singole di FANS intra-articolari. L'analisi di diversi studi indica che le dosi singole di FANS intra-articolari comportano un'esposizione sistemica complessiva e sinoviale significativamente inferiore rispetto a una somministrazione orale settimanale di FANS. Tuttavia, le concentrazioni massime ottenute nella sinovia dopo somministrazione intra-articolare erano notevolmente maggiori. Il profilo di sicurezza dei FANS intra-articolari si è dimostrato ottimale. Negli studi umani, i FANS intra-articolari si sono rivelati altrettanto efficaci quanto i FANS somministrati per via orale e i corticosteroidi intra-articolari nell'alleviare il dolore associato all'osteoartrite. Tuttavia, a nostra conoscenza, attualmente non è stato identificato alcun FANS approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per l'iniezione intra-articolare. Gli oppioidi (ad esempio, il tramadolo) sono efficaci nella gestione del dolore muscoloscheletrico acuto, sebbene vi sia poca evidenza specifica riguardo al loro uso per il dolore da osteoartrite (Richard MJ et al, *Osteoarthr Cartil* 2022). Negli ultimi 20 anni, numerosi studi hanno indagato la capacità del solfato di glucosamina di migliorare i sintomi (dolore e funzionalità) e ritardare la progressione strutturale dell'osteoartrite. Attualmente esiste un ampio e convergente insieme di evidenze che suggerisce che il solfato di glucosamina, somministrato a una dose orale giornaliera di 1500 mg, sia in grado di ridurre significativamente i sintomi di osteoartrite negli arti inferiori (Reginster JY et al, *Rheumatol Int* 2012).

1.4.6. Somministrazione intra-articolare di Plasma ricco di Piastrine

Il plasma ricco di piastrine (PRP) è caratterizzato da una frazione della fase liquida del sangue autologo contenente una concentrazione maggiore di piastrine (Alves R and Grimalt R, *Ski Appendage Disord* 2018). La terapia con PRP è stata adottata per numerose condizioni negli ultimi trent'anni, guadagnando una notevole attenzione nella medicina rigenerativa (Everts P et al, *Int J Mol Sci* 2020). Il concentrato piastrinico viene attivato mediante l'aggiunta di cloruro di calcio, formando un gel piastrinico e consentendo il rilascio di fattori di crescita e molecole bioattive (Cavallo C et al, *BioMed Res Int* 2016). Di conseguenza, le piastrine svolgono un ruolo attivo nel meccanismo di guarigione, rilasciando una vasta gamma di fattori di crescita e altre molecole attive nel sito leso. Numerose questioni relative all'uso del PRP nelle articolazioni con osteoartrite rimangono oggetto di dibattito (Gato-Calvo L et al, *Ther Adv Chronic Dis* 2019), insieme all'uso del PRP in relazione alla riduzione dell'infiammazione (Osterman C et al, *Am J Sports Med* 2015), alleviamento del dolore (Hegaze AH et al, *Cureus* 2021), miglioramento della funzionalità (Rayegani SM et al, *Orthop Rev* 2014) e potenziale rigenerazione della cartilagine (Sakata R and Reddi AH, *Tissue Eng Part B Rev* 2016). La principale sfida consiste nella comprensione dei complessi meccanismi riguardanti i potenziali effetti terapeutici del PRP, principalmente attribuibili alle diverse metodologie di studio che comportano comunemente un alto rischio di bias. A seguito dei risultati dello studio pionieristico condotto da Sampson S. e collaboratori (Sampson S et al, *Am J Phys Med Rehabil* 2010), numerose indagini hanno esplorato l'impatto del PRP nel trattamento dell'osteoartrite. Complessivamente, i risultati indicano costantemente che il PRP è una modalità di trattamento sicura ed economicamente sostenibile (Rajan PV et al, *J Bone Jt Surg* 2020), offrendo un miglioramento sintomatico e funzionale durevole (Bansal H et al, *Sci Rep* 2021). L'effetto terapeutico del PRP è attualmente associato a molteplici fattori, tra cui la sua preparazione, formulazione e la frequenza delle iniezioni, come discusso in vari studi (Hong M et al, *BioMed Res Int* 2021). La controversia circonda la proposta ottimale per l'applicazione del PRP, a causa di risultati divergenti in diversi studi (Korpershoek JV et al, *Orthop J Sports Med* 2023; Korpershoek JV et al, *Acta Orthop* 2020). È importante notare che durante il processo di sperimentazione mancavano linee guida standardizzate per la preparazione del PRP nella letteratura. Nonostante le raccomandazioni generali che supportano l'uso delle iniezioni intra-articolari di PRP per i pazienti con osteoartrite, è fondamentale sottolineare che la FDA non ha attualmente approvato questo intervento terapeutico (Jones IA et al, *Curr Rev Musculoskelet Med* 2018). Le linee guida dell'ACR e dell'OARSI sconsigliano fortemente l'uso del PRP fino a quando non sarà affrontata la

questione in ulteriori studi, riguardante anche la mancanza di variabilità e l'assenza di procedure standard relative alle preparazioni e tecniche accessibili di PRP (Bannuru RR et al, *Osteoarthr Cartil* 2019). Le linee guida dell'AAOS si astengono dal formulare raccomandazioni specifiche sull'uso del PRP (Brown GA, *J Am Acad Orthop Surg* 2013), e l'ESCEO non include il PRP nelle sue linee guida (Bruyere O et al, *Semin Arthritis Rheum* 2019). Nel trattamento dell'osteoartrite del ginocchio, il PRP non ha raccomandazioni a causa della mancanza di evidenze, come delineato nelle linee guida dell'EULAR (Jordan KM et al, *Ann Rheum Dis* 2003). In considerazione della crescente domanda dei pazienti riguardo al trattamento biologico dei disturbi ortopedici, l'American Academy of Orthopaedic Surgeons ha organizzato un simposio coordinato e ha stabilito un framework comune (Chu CR et al, *J Am Acad Orthop Surg* 2019) per migliorare e accelerare la valutazione clinica, l'utilizzo e l'applicazione dei trattamenti biologici nelle malattie muscoloscheletriche. Insieme alle raccomandazioni per l'avvio di studi clinici multicentrici di alta qualità, si raccomanda vivamente ai medici e alle istituzioni di promuovere le terapie biologiche per stabilire database completi sui pazienti che possano essere collegati a biorepository, consentendo così la sorveglianza post-marketing e valutazioni di qualità.

In sintesi, gli studi suggeriscono che il PRP ha un potenziale nell'alleviare il dolore, migliorare la funzionalità del ginocchio, nonché migliorare la qualità della vita. Tuttavia, mancano dati sulle indicazioni del PRP per la regressione degli osteofiti o riguardo alla sua capacità di promuovere la rigenerazione della cartilagine. Risultati più favorevoli sono osservati in pazienti più giovani e in casi di osteoartrite lieve. Gli esiti preliminari interessanti e la crescente amministrazione clinica di questo approccio terapeutico sono evidenti, ma l'uso esteso del PRP nell'osteoartrite manca di un robusto supporto di evidenze di alta qualità per dimostrare un miglioramento clinico inequivocabile.

1.4.7. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono presenti in numerosi tessuti e possono essere definite come cellule progenitrici specializzate. Le MSCs sono in grado di auto-generarsi e, attraverso segnali specifici, possono differenziarsi in diversi tipi di cellule adulte specifiche per il tessuto. In questo modo, le MSCs sostituiscono cellule invecchiate o compromesse (Bianco P et al, *Cell Stem Cell* 2008). Le MSCs formano tessuti della linea mesodermica, come cartilagine, osso e tessuto adiposo, nonché tessuti come il disco intervertebrale, i legamenti e i muscoli (Pittenger MF et al, *Science* 1999). La International Society of Cellular Therapy (Dominici M et al, *Cytotherapy* 2006) ha stabilito un insieme

di caratteristiche distintive per le MSCs, che includono la capacità di aderire al piastra di coltura, l'espressione di marcatori di superficie CD73, CD90, CD105 e l'assenza di marcatori ematopoietici come CD34, CD45, CD14 e CD19. Inoltre, queste caratteristiche comprendono la tripotenza nella differenziazione in fenotipi condrogenici, osteogenici e adipogenici. Oltre alle loro capacità di differenziazione, le MSCs rappresentano un potenziale notevole nella medicina rigenerativa grazie alle loro proprietà anti-infiammatorie e immunomodulatorie (Caplan AI, J Pathol 2009). Le MSCs sono considerate fondamentali nell'ingegneria tissutale, poiché sono in grado di differenziarsi in cellule altamente specializzate; attualmente, tuttavia, le MSCs vengono sfruttate per "convincere" il tessuto o l'organo a rigenerarsi autonomamente. La medicina rigenerativa si propone di ripristinare la funzionalità principalmente attraverso la fornitura di cellule e di cellule staminali specifiche che ulteriormente favoriscono la rigenerazione. È pertanto valido definire la medicina rigenerativa come il ripristino di cellule, tessuti o organi umani per mantenere la normale funzionalità (Mason C and Dunnill P, Regen Med 2008). Come accennato, gli effetti benefici delle MSCs sono dovuti al miglioramento sia della vitalità che della propagazione delle cellule native, nonché alla mitigazione della morte cellulare o al ritardo della senescenza cellulare, oltre agli effetti antinfiammatori e immunomodulatori. Queste azioni riparative vengono ottenute attraverso la secrezione da parte delle MSCs di fattori di crescita e citochine paracrini, comunicazione cellulare dinamica e diretta, insieme al rilascio di vescicole extracellulari (definite esosomi) contenenti peptidi, mRNA e microRNA (Miceli V et al, Adv Health Mater 2021). La regolazione del rinnovamento e della differenziazione delle cellule staminali avviene nelle "nicchie" (Li L and Xie T, Annu Rev Dev Biol 2005). Possono essere osservati diverse nicchie in diversi tessuti (Jones DL and Wagers AJ, Nature Rev Mol Cell Biol 2008). Le MSCs sono state isolate nel midollo osseo (Charbord P, Hum Gene Ther 2010), nel tessuto adiposo (De Francesco F et al, Tissue Eng Part B rev 2015), nella polpa dentale (La Noce M et al, J Dent 2014), nel cordone ombelicale (Mebarki M et al, Stem Cell Res Ther 2021), ma anche nel tessuto residente delle articolazioni, come la cartilagine articolare, la sinovia, il periostio, il cuscinetto adiposo infrapatellare e l'osso trabecolare (Fellows CR et al, Front Genet 2016). La somministrazione di MSCs intra-articolari per la riparazione della cartilagine ha portato ad una rigenerazione del tessuto articolare. Tuttavia, l'efficacia del trattamento con cellule staminali per l'osteoartrite non è ancora stata definita, ma la secrezione di fattori anti-cheratinici (KGF, SDF1, MIP1a, MIP1b), anti-apoptotici (STC-1, SFRP2, TGFbeta1, HGF), angiogenici (VEGF) e mitogenici (TGF-a, TGF-b, HGF, IGF-1, FGF-2, EGF) può spiegare i meccanismi di riparazione naturali (Wyles CC et al, Biomed Pharmacother

2019). Altre indagini hanno dimostrato una possibile interazione tra le cellule immunitarie e le MSCs, nonché la potenzialità di limitare la propagazione delle cellule T infiammatorie e lo sviluppo dei monociti, e la capacità di impedire l'attività delle cellule B, interferendo con il processo patologico o infiammatorio sottostante (Glenn JD and Whartenby KA, World J Stem Cells 2014). La nuova era della terapia mediata dalle cellule (**Figura 13**) nel database delle prove cliniche sembra promettente. Sono necessarie ulteriori indagini per valutare la sicurezza e l'efficacia successiva, con un'urgenza di ampia diffusione delle pubblicazioni all'interno delle comunità scientifiche per comprendere meglio le opzioni terapeutiche. I molteplici studi in corso che coinvolgono le MSCs sono evidenza dell'interesse crescente e della viabilità di queste cellule.

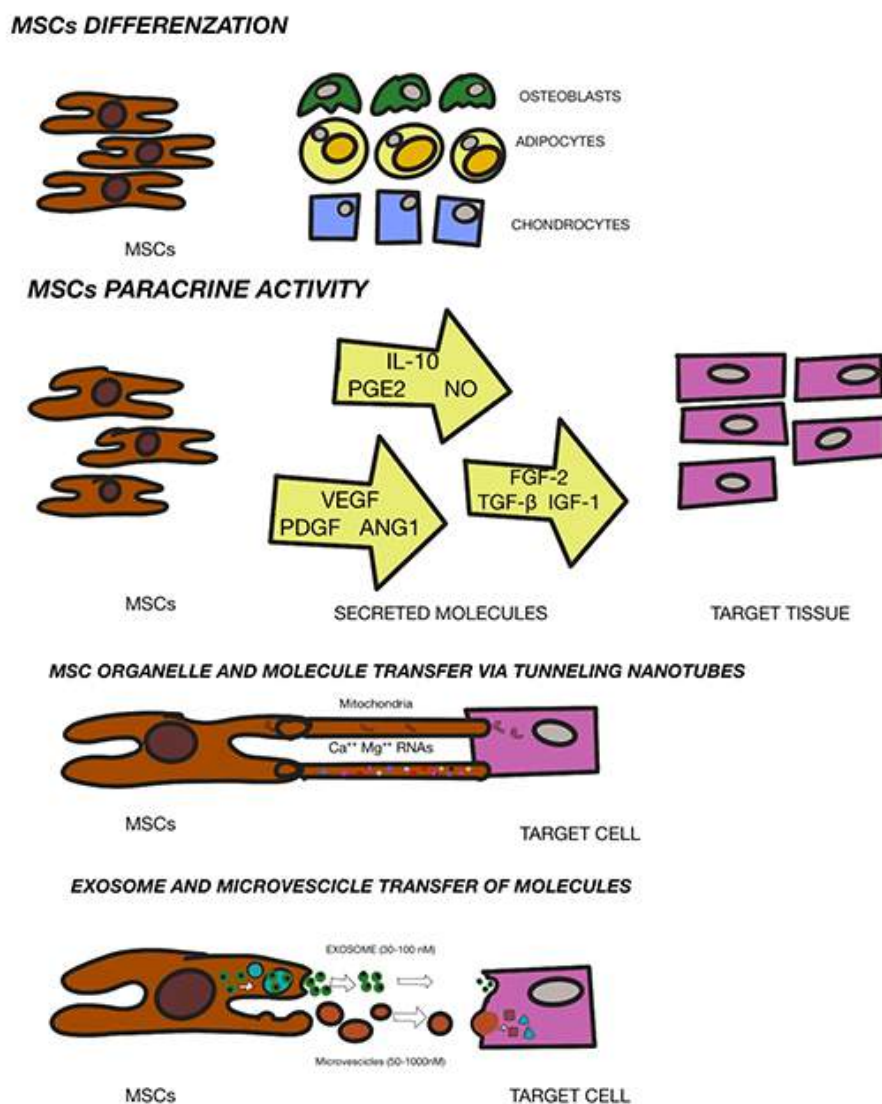


Figure 13: Meccanismo di riparazione mediato dalle MSCs. Modified by article of Fellows CR et al. Front Genet. 2016.

1.4.8 Somministrazione intra-articolare di tessuto adiposo microframmentato con frazione vascolo stromale

Le cellule staminali adipose (ASCs) sono in grado di rinnovarsi e di creare molteplici linee cellulari (Zuk PA et al, Tissue Eng 2001). Inoltre, possono espandersi facilmente e rapidamente in vitro, non invecchiano facilmente e provocano minori morbidity nei pazienti (Palumbo P et al, Int J Mol Sci 2018). Le ASCs hanno dimostrato un significativo potenziale di propagazione e differenziazione in tessuti simili al mesoderma rispetto alle MSCs derivate dal midollo osseo o ad altre fonti (Kern S et al, Stem Cells 2006). È importante sottolineare che le ASCs possono essere facilmente isolate e sono particolarmente accessibili dal tessuto adiposo sottocutaneo (Zhu Y et al, Cell Biochem Funct 2008). Le ASCs hanno anche mostrato una differenziazione condrogenica efficiente durante l'espansione in vitro sotto condizioni adeguate (Kim HJ and IM GI, J Orthop Res 2009), sebbene presentino una capacità condrogenica meno significativa rispetto alle MSCs derivate dal midollo osseo (Im GI et al, Osteoarthr Cartil 2005). In ogni caso, sono richiesti fattori fisici esterni per ottenere una formazione adeguata del tessuto cartilagineo in vivo, come stimoli meccanici specifici o una particolare texture dei supporti. Da questo punto di vista, le indagini risultano effettivamente carenti (Gaut C and Sugaya K, Regen Med 2015; Trumbull A et al, Biomed Eng Online 2016). L'uso clinico delle ASCs è rigorosamente regolamentato poiché i prodotti MSC sono considerati "farmaci" e pertanto particolarmente limitati nella pratica clinica in Europa e negli Stati Uniti (de Girolamo L et al, Curr Pharmacol Des 2013). Tali restrizioni hanno portato a nuovi studi riguardanti terapie alternative con ASCs considerando la "manipolazione minima" (De Francesco F et al, Int J Mol Sci 2018; Busato A et al., Cells 2021; Quintero-Sierra L et al., Cell Transpl 2023). In particolare, se le ASCs non vengono espanse in vitro, ma estratte dal tessuto adiposo all'interno della sala operatoria senza manipolazione mediante l'uso di collagenasi, allora la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti e l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) approveranno i trattamenti con queste cellule (Yano K et al, J Tissue Eng Regen Med 2018). La questione della "manipolazione minima" delle ASCs è presa in considerazione durante l'isolamento di una popolazione cellulare utilizzando processi meccanici, per aderire alle normative stabilite dalla FDA e dall'EMA a livello mondiale (Raposio E et al, Ann Med Surg 2017). Per quanto riguarda i meccanismi enzimatici all'interno delle popolazioni cellulari, la FDA definisce queste procedure come "più che minimamente manipolate" e ha di conseguenza imposto importanti restrizioni. Inoltre, l'alterazione delle caratteristiche biologiche, fisiologiche o strutturali delle cellule o dei tessuti è considerata manipolazione significativa, portando alle seguenti procedure:

concentrazione dell'aspirato di midollo osseo e frazione vascolare stromale derivata da adiposo (SVF). La prima è una procedura invasiva che provoca morbidità nel donatore, mentre la seconda (SVF) è una procedura minimamente invasiva che si avvale della liposuzione. I metodi meccanici sono quindi attualmente preferiti per ottenere una concentrazione adeguata di ASCs in sala operatoria. Sebbene efficiente, la digestione enzimatica richiede sostanze xenogeniche che possono causare reazioni immunitarie ed è discordante con le linee guida europee di buone pratiche di fabbricazione (eGMP) (Regolamento (CE) n. 1394/2007 del Parlamento europeo e del Consiglio europeo). Per eludere questo problema, sono stati adottati dispositivi singoli per separare e isolare la SVF dal tessuto adiposo (Chang H et al, *Aesth Plast Surg* 2013). I metodi non enzimatici per isolare la SVF utilizzano forze meccaniche o fisiche per manipolare l'integrità strutturale del tessuto adiposo. Tali procedure sono meno specifiche e sono sufficientemente in grado di spostare le cellule SVF dalle loro nicchie, e alcuni autori hanno conseguentemente introdotto il concetto di niche vascolare stromale (Oberbauer E et al, Springerplus 2015). Il prodotto finale acquisito tramite digestione non enzimatica non è strettamente materiale stromale vascolare cellulare come generalmente si acquisirebbe tramite digestione enzimatica, ma una combinazione di detriti cellulari, cellule ematiche e componenti della matrice extracellulare (ECM) (Condè-Green A et al, *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2016). Inoltre, i dispositivi meccanici sono in grado di preservare le cellule in gruppi o, piuttosto, nel loro ambiente nativo, il che aiuta a mantenere la funzionalità cellulare, inclusa la scarica di esosomi e la secrezione. Le nicchie vascolare stromale, quindi, proteggono le ASCs attivate, migliorando la loro potenza nell'ambiente ricevente, ma attiva anche una cascata di eventi biologici che imitano il processo di guarigione naturale. Sono state proposte procedure non enzimatiche che includono la dissociazione meccanica del tessuto adiposo utilizzando dispositivi di chiusura automatizzati e strumenti non dipendenti dall'operatore (**Figura 14**).

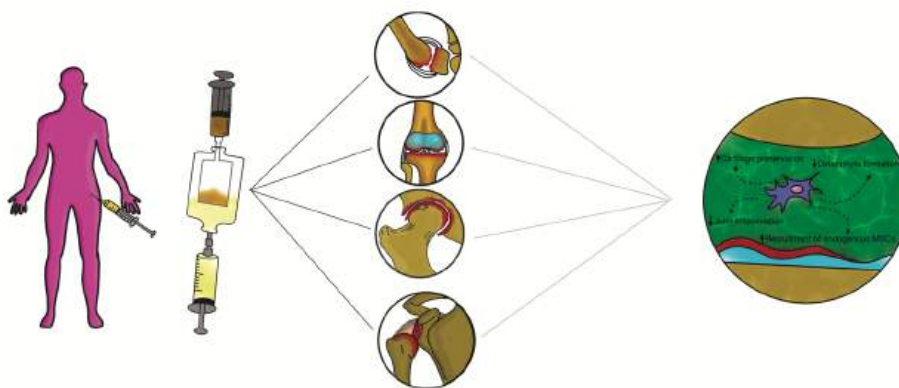


Fig. 14: Non-enzymatic procedures have been proposed including mechanical dissociation of adipose tissue using automated closing devices and non-operator dependent tools

Questi dispositivi si differenziano l'uno dall'altro per il protocollo di isolamento, il tempo e la categoria di dissociazione tissutale, ma variano anche nel prodotto finale della frazione vascolare stromale (SVF). I metodi di isolamento non enzimatici si basano su forze di centrifugazione, pressione, filtrazione e lavaggio. Questi meccanismi ripristinano successivamente il processo di digestione enzimatica nella divisione cellulare o nel processo di aggregazione cellulare proveniente dal tessuto adiposo. I sistemi meccanici comunemente utilizzati per raccogliere e purificare il tessuto adiposo al fine di ottenere SVF includono: Puregraft (Bimini Technologies LLC, USA), LipiVage (Genesis-Biosystems-Inc, Lewisville, USA), Lipogems (Lipogems Int Spa, Italia), Rigenera (HBW srl, Italia), Lipo-Kit GT (Medikan-International Inc, Seul, Corea), Hy-Tissue Nanofat (Fidia Farmaceutici, Italia), Hy-Tissue SVF (Fidia Farmaceutici, Italia), StromaCell (Micro-Aire-Surgical Instruments, Charlottesville, USA), MyStem (MyStem LLC, USA), Revolve (Life Cell Corporation, USA), Wal Body-Jet e Q-Graft system (Human Med AG, Germania), IntelliCell (Biosciences Inc, USA). Molti dei dispositivi riportati hanno ricevuto valutazioni in studi preclinici e clinici. Altri sistemi obsoleti includono LipiVage e PureGraft, che sono stati tra i primi prodotti a essere commercializzati (Ferguson REH et al, Ann Plast Surg 2008; Zhu M et al, Plast Reconstr Surg 2013). La tecnologia di raccolta, lavaggio e trasferimento di LipiVage è un dispositivo che consente il prelievo di innesti adiposi in condizioni controllate con bassa pressione, evitando la centrifugazione o la decantazione. Il tessuto adiposo aspirato all'interno della cannula viene separato da oli e fluidi mediante un filtro integrato in un tempo estremamente ridotto (15 minuti). Questo sistema ha mostrato la presenza di cellule staminali mesenchimali e progenitori, i quali hanno mantenuto la loro capacità di differenziazione (Zimmerlin L et al, Cytotherapy 2013). Inoltre, il tessuto adiposo frammentato da LipiVage non ha mostrato differenze rispetto al tessuto adiposo normale, producendo innesti di grandi dimensioni. Tuttavia, non è stata ancora condotta un'analisi delle particelle. La tecnologia PureGraft si basa sulla filtrazione del tessuto adiposo attraverso una particolare membrana, risultando in una procedura altrettanto rapida (15 minuti). Inoltre, gli innesti provenienti da PureGraft presentavano particelle di dimensione più grande (>1000 µm) e sono stati in grado di effettuare una "dialisi" del tessuto adiposo senza ricorrere ad altri metodi più distruttivi, come la centrifugazione (Fang C et al, Plast Reconstr Surg Glob Open 2020). L'applicazione principale di queste tecnologie è nel campo del trapianto di grasso per aumentare i volumi mammari o per correggere asimmetrie del seno o per ipomastia (De Fazio D et al, Plast Reconstr Surg Glob Open 2020; Gabriel A et al, Gland Surg 2015). Il sistema più studiato e comunemente utilizzato nella pratica clinica è il dispositivo

Lipogems. Il prodotto finale è tessuto adiposo ridotto in piccoli frammenti (600/400 µm) che progressivamente diminuiscono di dimensione e sono privi di residui di olio o sangue, ricchi di periciti e ASCs (Bianchi F et al, Cell Transplant 2013). Questo dispositivo è stato ampiamente utilizzato soprattutto in ortopedia per il trattamento delle tendinopatie (Randelli P et al, Stem Cell Int 2016) e dell'osteoartrite (Barfold KW and Blond L, Dan Med J 2019). Per semplificare e migliorare ulteriormente la disintegrazione meccanica, alcuni autori hanno ideato un sistema "puro" di disintegrazione meccanica (Trovato L et al, J Cell Physiol 2015) dei tessuti, molto più facile da usare, meno costoso e più veloce. È stato dimostrato che il tessuto adiposo micro-frammentato (600/400 µm) non modifica il contenuto delle strutture stromali né delle cellule, ma è in grado di attivare una serie di cambiamenti molecolari che aumentano le proprietà rigenerative naturali del tessuto ricevente (De Francesco F et al, Int J Mol Sci 2018). Inoltre, alcuni autori hanno eseguito analisi comparative tra i diversi sistemi meccanici e la digestione enzimatica. Raposio e colleghi (Raposio E et al, Ann Med Surg 2017) hanno confrontato due procedure per l'isolamento delle ASCs basate su metodi enzimatici+meccanici (centrifugazione o vibrazione con collagenasi) e metodi meccanici (centrifugazione o vibrazione). Gli autori hanno dimostrato che la procedura enzimatica+meccanica sosteneva un numero maggiore di ASCs rispetto al solo metodo meccanico. Gli studi di Raposio sono stati oscurati da alcuni autori che hanno analizzato altre variabili piuttosto che il numero di cellule soltanto. Infatti, Domenis e colleghi (Domenis R et al, Stem Cell Res Ther 2015) hanno mostrato che le ASCs ottenute da un dispositivo meccanico (Fastem kit) erano meno efficienti rispetto agli strumenti enzimatici (Lipo-kit e Celution). Tutte e tre le procedure, tuttavia, sono state in grado di mantenere la quantità di tessuto adiposo e lo spessore nel seno ricostruito. Inoltre, Senesi e colleghi (Senesi L et al, Front Cell Dev Biol 2019) hanno mostrato una significativa vitalità cellulare, marcatori CD e potenza di differenziazione delle ASCs ottenute da dispositivi meccanici (Rigenera e Lipogems) rispetto alla digestione enzimatica. Inoltre, gli autori hanno affermato che i metodi meccanici hanno agito in modo diverso sul rilascio delle ASCs dai niche perivascolari della SVF. Solo la digestione enzimatica è stata in grado di acquisire una popolazione cellulare "pura" e le ASCs potrebbero rapidamente differenziarsi in tutte le linee mesodermiche. Dei due sistemi meccanici analizzati, solo i microinnesti ottenuti da Rigenera (rispetto a Lipogems) erano in grado di differenziarsi, sebbene più lentamente rispetto alla digestione enzimatica. Recentemente, alcuni autori hanno studiato un nuovo dispositivo promettente (Hy-Tissue SVF) che consente di isolare la frazione vascolare stromale sotto forma di cellule libere e micro-frammenti (600/400 µm) di tessuto connettivo contenente cellule stromali e matrice

extracellulare. Questo prodotto ha un significativo potenziale nella medicina rigenerativa (Busato A et al, Cells 2020). La preservazione della struttura principale, dell'integrità morfologica e delle nicchie adipose dopo decomposizione sono fattori degni di nota da considerare nella protezione e nel rafforzamento delle ASCs attive, distinguendo questo prodotto dagli altri. Inoltre, l'eliminazione dell'azione enzimatica ridurrà il trauma tissutale mantenendo l'integrità cellulare. La riduzione delle dimensioni dei gruppi adiposi favorisce l'innesto come risultato di una revascularizzazione più conveniente, efficace e rapida del microinnesto, grazie all'interazione con l'ambiente microvascolare ricevente.

Tuttavia, l'efficacia specifica del trattamento con cellule staminali per il trattamento dell'osteoartrite deve ancora essere chiarita. Negli ultimi anni, diversi studi hanno riportato la durata breve e intermedia della frazione vascolare stromale (SVF) per l'osteoartrite, dimostrando miglioramenti nella funzionalità articolare e effetti analgesici. In una recente meta-analisi condotta da Muthu e colleghi (Muthu S et al, World J Orthop 2023) su 21 pubblicazioni, gli autori hanno sottolineato la riduzione nel punteggio VAS nei pazienti con osteoartrite al ginocchio trattati con SVF derivato da tessuto adiposo, con sette studi che riportano un miglioramento statisticamente significativo a 6 mesi dopo il trattamento, mentre tutti gli altri studi hanno mostrato un miglioramento statistico per periodi di follow-up compresi tra dodici e ventiquattro mesi. Issa e colleghi (Issa MR et al, Ther Adv Musculoskelet Dis 2022) hanno condotto una meta-analisi su quattro studi controllati randomizzati, osservando una diminuzione statisticamente significativa nel punteggio dell'Osteoarthritis Index di Western Ontario e McMaster Universities (WOMAC) nel gruppo SVF rispetto al gruppo di controllo dopo 6 mesi, che è rimasta stabile anche dopo 12 mesi. Inoltre, hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa nel punteggio del dolore (VAS, NRS) nel gruppo SVF rispetto al controllo dopo 6 mesi, con una riduzione corrispondente e statisticamente significativa osservata anche dopo 12 mesi. Infine, gli autori hanno esaminato la qualità della vita e la funzionalità utilizzando i punteggi di risultato per infortuni al ginocchio e osteoartrite (KOOS), trovando una riduzione statisticamente significativa nel gruppo SVF rispetto al controllo dopo un periodo di 6 e 12 mesi. In un'altra meta-analisi su 18 pubblicazioni condotta da Agarwal e colleghi (Agarwal N et al, Cells 2021), gli autori hanno evidenziato un miglioramento nel punteggio WOMAC nei pazienti con osteoartrite al ginocchio trattati con SVF da tessuto adiposo, sottolineando quattro studi che riportano un miglioramento statisticamente significativo entro un mese dopo il trattamento, mentre tutti gli altri studi hanno mostrato un miglioramento statistico per periodi di follow-up compresi tra due e ventiquattro mesi. Inoltre, Kim e colleghi (Kim KI et al, Am J Sports Med 2023) hanno eseguito uno studio di

fase 3, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo su 125 pazienti con osteoartrite al ginocchio, osservando risultati significativamente migliorati nel punteggio VAS su 100 mm e nel punteggio WOMAC totale rispetto al gruppo di controllo dopo 6 mesi. Gli esiti radiologici e gli eventi avversi hanno rivelato nessuna differenza significativa tra i gruppi. Per quanto riguarda l'osteoartrite dell'articolazione trapeziometacarpale, una meta-analisi (Karagergou E et al, *Biomolecules* 2022) ha esaminato sette studi basati su esseri umani. È importante notare che non sono stati condotti studi controllati randomizzati. In tutti gli studi, la manipolazione minima del tessuto adiposo raccolto ha comportato centrifugazione o omogeneizzazione meccanica, sia da soli che combinati con filtrazione e decantazione. Nessuno degli studi ha specificato l'estrazione della frazione vascolare stromale utilizzando metodi enzimatici o meccanici, né hanno affrontato l'esame del tessuto iniettato. Sebbene tutti gli studi abbiano valutato la percezione del dolore prima e dopo il trattamento utilizzando la scala analogica visiva (VAS), è interessante notare che sono state utilizzate due scale diverse (1–10 o 1–100), insieme a diverse metodologie per la misurazione della forza di presa. A causa di queste discrepanze, non è stata stabilita alcuna correlazione statisticamente significativa. Nei casi che coinvolgono il ginocchio, sono stati condotti studi avanzati, controllati e randomizzati; tuttavia, l'attuale corpus di prove per l'osteoartrite dell'articolazione trapeziometacarpale manca di efficacia, indicando una necessità cruciale di ulteriori ricerche in questo settore. L'uso delle MSCs è stato fortemente sconsigliato dall'American College of Rheumatology (ACR), dall'Arthritis Foundation (AF) e dalla Osteoarthritis Research Society International (OARSI) (Kolasinski SL et al, *Arthritis Care Res* 2020; Bannuru RR et al, *Osteoarthr Cartil* 2019). Questa raccomandazione è attribuita alle metodologie diverse impiegate negli studi clinici, incluse le discrepanze nelle origini tissutali delle MSCs, le variazioni nel numero di cellule e le differenze nei metodi di coltura. Tali variazioni nelle strategie di applicazione possono influenzare gli effetti terapeutici e di conseguenza influenzare le risposte cliniche. È importante sottolineare che la terapia con MSCs non è stata incorporata nelle linee guida fornite dall'American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) (Jevsevar DS, *J Am Acad Orthop Surg* 2013), dalla European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis, and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) (Bruyere O et al, *Semin Arthritis Rheum* 2019), e dalla EULAR [Kloppenburger M et al *Ann Rheum Dis* 2018; Jordan KM et al, *Ann Rheum Dis* 2003).

1.4.9 Trattamento chirurgico

Per i pazienti con osteoartrite avanzata che non possono essere adeguatamente trattati con misure conservative, può essere indicato un trattamento chirurgico (Madry H, Osteoarthr Cartil 2022). Le opzioni chirurgiche comprendono osteotomia, lavaggio e debridement artroscopico e sostituzione articolare. La sostituzione totale dell'articolazione (Evans JT et al, Lancet 2019) è il presidio principale nella gestione chirurgica dell'osteoartrite in fase terminale. Fondamentale per il successo della sostituzione totale dell'articolazione è la necessità di una selezione e di un counseling accurati dei pazienti. L'artroplastica totale dell'articolazione rappresenta il trattamento standard d'oro per i pazienti affetti da osteoartrite grave che non hanno risposto ai trattamenti conservativi o in cui il dolore influisce gravemente sulla qualità della vita. Essa può fornire un significativo sollievo dal dolore e un miglioramento funzionale nei pazienti con grave OA all'anca o al ginocchio. Con le tecniche contemporanee, i pazienti sono tipicamente autorizzati a caricare peso come tollerato sull'arto affetto immediatamente dopo l'intervento chirurgico. Il controllo del dolore è importante e viene realizzato attraverso un approccio multimodale. Possono essere utilizzati FANS, analgesici e narcotici. I pazienti generalmente restano in ospedale per 2 o 3 giorni, anche se un numero crescente di pazienti lascia l'ospedale prima. La prevenzione delle complicazioni subito dopo l'intervento è cruciale. Le complicazioni precoci includono infezioni, protesi fallite, deiscenza della ferita e trombosi venosa profonda. Gli eventi trombotici sono prevenuti mediante calze compressive e/o profilassi chimica. Esercizi attivi con ambulatori precoci e frequenti possono aiutare a prevenire la trombosi. Una mobilitazione precoce il giorno dell'intervento ha dimostrato di migliorare i risultati e ridurre la durata della degenza ospedaliera. Non esiste un consenso chiaro riguardo alla frequenza, alla durata o all'intensità ottimali della riabilitazione fisica dopo l'intervento di sostituzione articolare. Un programma di terapia ben strutturato che include esercizi di mobilità articolare, addestramento della deambulazione, rinforzo dei quadricipiti e training nelle attività della vita quotidiana rappresenta un componente importante del processo di riabilitazione post-intervento (Abramoff B and Caldera FE, Med Clin North Am 2020). Al contrario, l'osteotomia, il lavaggio e il debridement artroscopico sono trattamenti chirurgici che possono ritardare la progressione verso l'osteoartrite in fase terminale e la necessità di sostituzione totale dell'articolazione (Cotter EJ et al, Arthroscopy 2024; Phua JKS et al, J Orthop Surg 2020; Medical Advisory Secretariat, Ont Health Technol Assess Ser 2005). Queste procedure mirano a trattare i danni articolari e i sintomi nelle fasi precoci della malattia, con il potenziale di posticipare o evitare la necessità di interventi chirurgici di sostituzione articolare più estesi. Ad esempio,

l'osteotomia tibiale alta può essere considerata per pazienti con osteoartrite sintomatica del compartimento mediale del ginocchio, soprattutto per coloro che sono relativamente giovani e attivi. Il debridement e il lavaggio artroscopico dell'articolazione del ginocchio possono fornire un sollievo temporaneo dei sintomi per alcuni pazienti con osteoartrite, in particolare per quelli con sintomi meccanici o aree localizzate di degenerazione.

In conclusione, le linee guida della Osteoarthritis Research Society International (OARSI) raccomandano di considerare i trattamenti chirurgici per i pazienti affetti da osteoartrite grave e sintomatica che non rispondono ad interventi non chirurgici. Analogamente, le linee guida dell'American College of Rheumatology (ACR) suggeriscono di indirizzare i pazienti verso la valutazione per la sostituzione articolare nel caso in cui presentino limitazioni funzionali da moderate a gravi e/o dolore che influisce significativamente sulla qualità della vita, nonostante un tentativo di trattamento conservativo appropriato. Sebbene i trattamenti chirurgici possano fornire un miglioramento significativo dei sintomi e della funzionalità, essi sono generalmente riservati alla malattia in fase terminale. Inoltre, l'American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) raccomanda l'intervento chirurgico qualora il paziente non abbia risposto a trattamenti non operativi come farmaci, terapia fisica, tutori e modifiche delle attività, e presenti sintomi e disabilità significative, così come la European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis, and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) sostiene l'intervento chirurgico nei casi di osteoartrite avanzata dell'anca e del ginocchio con dolore severo e perdita di funzione che non possono essere controllati mediante trattamenti non chirurgici. Infine, l'EULAR raccomanda l'intervento chirurgico per i pazienti con sintomi e disabilità significativi nonostante il trattamento conservativo appropriato (Ronn K et al, Arthritis 2011). In sintesi, il trattamento chirurgico è tipicamente riservato alle fasi avanzate dell'osteoartrite, quando i trattamenti conservativi non sono stati in grado di gestire adeguatamente i sintomi e il compromesso funzionale.

CAPITOLO 2

ANATOMIA E BIOMECCANICA

DELL'ARTICOLAZIONE

CARPOMETACARPALE DEL POLLICE

2.1 INTRODUZIONE

L'articolazione carpometacarpale del pollice, nota anche come articolazione basale o articolazione trapeziometacarpale, è una struttura articolare complessa che riveste un ruolo cruciale nella funzionalità della mano (Ladd AL et al, Instr Course Lect 2014). Questa articolazione sinoviale a sella è responsabile dei movimenti di opposizione, abduzione e rotazione del pollice, permettendo attività essenziali come la presa a pinzetta e la presa di precisione. Dal punto di vista funzionale, il pollice rappresenta il dito più importante della mano. Definito "anti-mano" da Ippocrate, il pollice, grazie al suo design intricato e alla vasta gamma di movimenti, è in grado di opporsi in modo diametrico alle altre dita (Edmunds JO, J Hand Surg Am 2011). Questo movimento, sebbene sembri semplice, è direttamente responsabile della prensione della mano e della coordinazione di numerose manovre manuali (Neumann DA and Bielefeld T, J Orthop Sports Phys Ther 2003). Fondamentale per questa capacità unica, l'articolazione carpometacarpale (CMC) del pollice, nota anche come articolazione trapeziometacarpale (TM) in riferimento ai suoi due componenti, è considerata una delle articolazioni più importanti del corpo. In questo contesto, si discute dell'anatomia dell'articolazione CMC del pollice, esaminandone anche la biomeccanica e le implicazioni cliniche.

2.2 ANATOMIA

La struttura complessiva dell'articolazione carpometacarpale (CMC) del pollice è ben definita. Il pollice è il dito più corto, e il suo scheletro è composto da due ossa carpali (scafoide e trapezio), dal primo osso metacarpale e da due falangi (prossimale e distale). Queste ossa articolano tra loro in quattro giunture: i) l'articolazione scafotrapeziodale, che corrisponde alla parte anterolaterale dell'articolazione scafotrapezio-trapezoide (STT), nota anche come articolazione triscafale; ii) l'articolazione carpometacarpale del pollice; iii) l'articolazione metacarpofalangea (MCP); e iv) l'articolazione interfalangea (IP) (Komatsu I and Lubahn JD, Oper Tech Orthopaedics 2018; Colditz JC, J Hand Ther 2000). Insieme, l'articolazione STT e l'articolazione CMC del pollice vengono denominate "articolazione basale pantrapeziale". L'articolazione CMC del pollice, che rappresenta l'articolazione tra il trapezio e il primo metacarpale, funge da articolazione universale biconcavo-convessa, con superfici concave e convesse su entrambi i lati (**Figura 15**) (Ombregt L, Applied Anatomy of the Wrist, Thumb, and Hand 2013; Edmunds JO, Hand Clin 2006). In questa configurazione, due forme a sella interconnesse si oppongono l'una all'altra, conferendo stabilità e consentendo al contempo un movimento molteplice straordinario (Imaeda T et

al, J Hand Surg Am 1993; Adams BD and Muller DL, Am J Sports Med 1996; Orbay JL and Cambo RA, Hand Clin 2020).

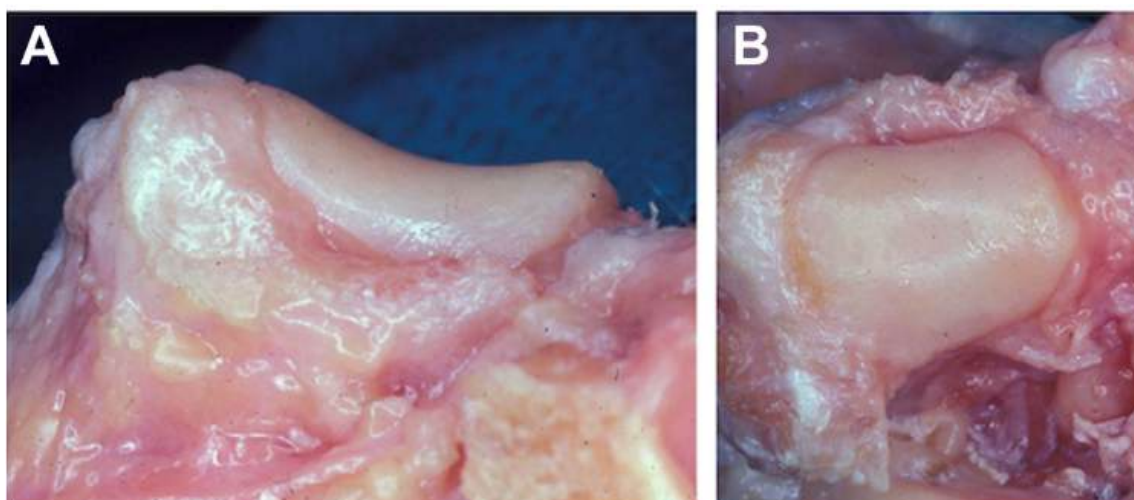


Fig. 15: Concavoconvessità del trapezio. (A) La sua concavità, paragonabile a una sella, rappresentata di lato (vista anteroposteriore). (B) La superficie articolare del trapezio (metacarpale del pollice rimosso) e la sua convessità dal lato del metacarpale del pollice.

Grazie a questa geometria, l'articolazione ha la possibilità di alternare tra uno stato di lassità e uno stabile, garantendo un'efficace funzionalità della mano (Yao J and Park MJ, Hand Clin 2008; Bakri K and Moran SL, Plast Reconstr Surg 2015). L'articolazione CMC del pollice è stata descritta in quattro posizioni (**Figura 16**): riposo, "autostoppista", opposizione senza rotazione e opposizione con "rotazione di avvitaamento". Queste posizioni saranno discusse in dettaglio nel corso di questa revisione.

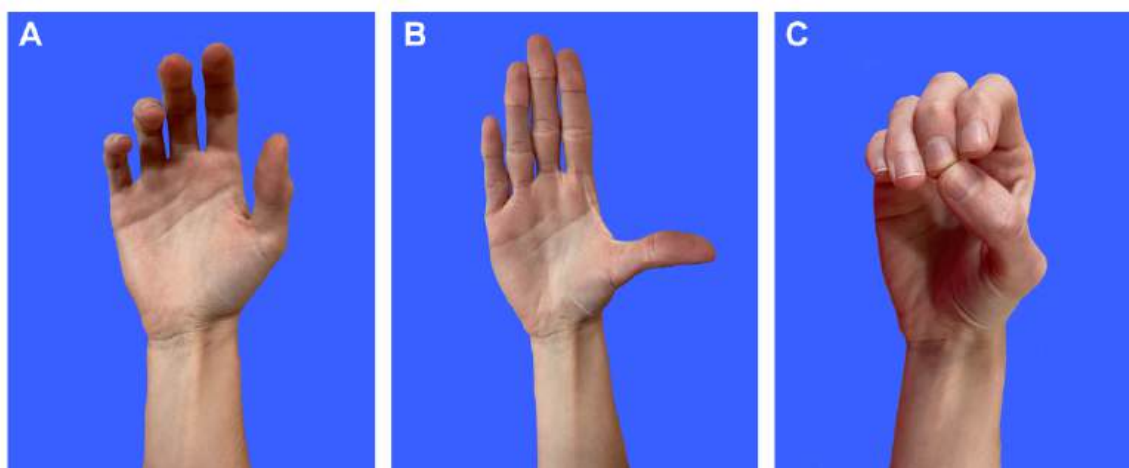


Fig. 16: Posizioni dell'articolazione carpometacarpale (CMC) del pollice. (A) Riposo, in assenza di movimento. (B) Posizione "autostoppista", abduzione radiale. (C) Opposizione con rotazione di avvitaamento, falange distale del pollice allineata in modo uniforme con la falange distale dell'indice.

Sebbene questa terminologia sia stata utilizzata per descrivere specificamente l'articolazione, altri termini sono stati adottati per indicare il movimento generale del

pollice. Come definito da Fontaine e collaboratori, i movimenti isolati di abduzione e adduzione palmari si verificano all'articolazione nel piano anteroposteriore (Fontaine C et al, Hand Surg Rehabil 2021). L'abduzione allontana il pollice dal secondo metacarpale, mentre l'adduzione lo avvicina. Questi movimenti avvengono attorno a un asse che passa attraverso la base del primo metacarpale, e la loro ampiezza media è stata misurata in 42°, 51° e 76° in varie pubblicazioni (Fontaine C et al, Hand Surg Rehabil 2021; Brunelli G and Brunelli F, J Hand Surg 1989; Chang LY et al, IEEE Trans Biomed Eng 2008; Mayer SW et al, J Hand Surg Am 2014; Goubier JN et al, Chir Main 2011). Quando si considerano le ampiezze è importante ricordare che i valori effettivi possono variare tra gli individui in base all'età, al sesso e ad altre variabili demografiche. Nel piano dorso-volare del pollice, i movimenti di flessione ed estensione coinvolgono tutte le articolazioni del pollice, con la flessione che porta la punta del pollice verso il palmo e l'estensione che la allontana (Mayer SW et al, J Hand Surg Am 2014). L'ampiezza media di questi movimenti è stata riportata tra 40° e 45° (Goubier JN et al, Chir Main 2011). Al contrario, i movimenti di pronazione e supinazione si verificano come prosecuzione di quelli nell'avambraccio. Relativamente al piano della punta del pollice, la pronazione ruota la punta in modo da opporsi a quelle delle altre dita (rotazione interna), mentre la supinazione ruota la punta del pollice nell'altra direzione (rotazione esterna) (Zancolli EA et al, clin Orthop Relat Res 1987) (**Figura 17**). Questi movimenti non si verificano in isolamento, consentendo la mobilità in tre piani con soli due assi di controllo (abduzione/adduzione e flessione/estensione).

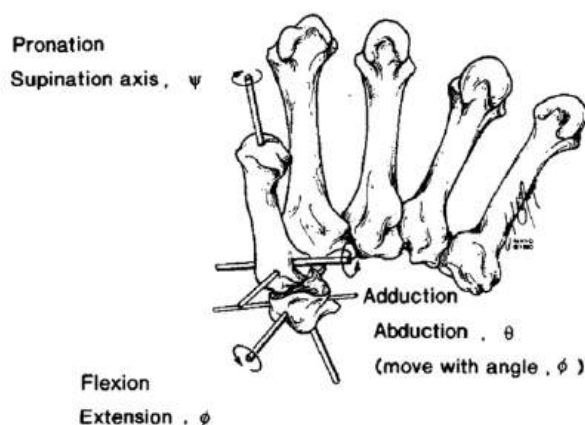


Fig 17: Movimento di flessione/estensione, movimento di abduzione/adduzione e movimento di supinazione/pronazione dell'articolazione CMC del pollice sinistro. L'asse di flessione/estensione è centrato nel trapezio. L'asse di supinazione/pronazione si trova all'interno del primo metacarpo lungo il corpo. L'asse di abduzione/adduzione è ortogonale agli altri assi.

Il pollice presenta anche terminologie specifiche per i movimenti articolari combinati. Nel piano sagittale, si osservano l'anteposizione e la retroposizione attorno a un asse che

attraversa il trapezio (Fontaine C et al, Hand Surg Rehabil 2021). L'anteposizione descrive la posizione del pollice quando viene spostato per toccare la base del mignolo. In questa posizione, l'unghia è parallela al piano del palmo, e l'articolazione CMC è massimamente ruotata e fletta. È importante notare che, affinché gli assi del trapezio e del primo metacarpale si allineino, devono verificarsi 48° di anteposizione, 38° di abduzione e 80° di pronazione rispetto agli assi degli altri metacarpali. Al contrario, la retroposizione descrive la posizione del pollice in piena abduzione ed estensione, in modo che il primo metacarpale si elevi sopra il piano degli altri metacarpali (Pellegrini VD, Hand Clin 2001). L'opposizione, invece, descrive il movimento che porta la punta del pollice a contatto con la punta di uno delle altre quattro dita. Questo movimento è fondamentale per la funzionalità complessiva della mano. L'opposizione controvertita, o retroposizione, descrive il movimento inverso. L'opposizione presenta quattro elementi: anteposizione (che si verifica all'articolazione CMC del pollice), adduzione (anch'essa all'articolazione CMC del pollice), flessione (che si verifica all'articolazione MCP) e pronazione. La pronazione ruota il pollice, permettendo al suo cuscinetto distale di entrare in contatto con il cuscinetto distale di un altro dito. Questa ultima rotazione definisce l'opposizione mediante la rotazione con una forza di "screw home" ed è estremamente importante nella generazione di forza. Infine, molti di questi movimenti si combinano per ottenere la circonduzione, necessaria per numerosi gesti comuni. Questo movimento composito, che avviene attorno a un asse situato al centro della superficie articolare trapeziale, include flessione-estensione, adduzione-abduzione e pronazione-supinazione (Leversedge FJ, Hand Clin 2008; Coert JH et al, J Orthop Res 2020). Il primo metacarpo e il trapezio sono strutturalmente progettati per accogliere i vari legamenti e muscoli che si attaccano in prossimità dell'articolazione CMC del pollice. Il trapezio presenta sei facce (**Figura 18**), nominate in base alla loro relazione con il tubercolo dorsale. Lungo la faccia palmare (1), il tendine del flessore radiale del carpo (FCR) passa attraverso un solco anterolaterale, prima del suo punto di inserzione alla base palmare del secondo metacarpo. Il recesso del trapezio, componente chiave nella stabilità dell'articolazione CMC del pollice, si trova nei pressi di questa faccia. Sulla faccia dorsale (2), i legamenti dorsali si inseriscono al tubercolo del trapezio e forniscono stabilità all'articolazione CMC del pollice. Questa stabilità consente alla faccia prossimale (3) di articolarsi con lo scafoide (articolazione STT) e alla faccia distale (4) di articolarsi con la base del primo metacarpo (articolazione CMC del pollice). La faccia distale presenta una superficie concava da fronte a retro e una superficie convessa da interno a esterno, creando una cresta lungo la sua superficie (Goto A et al, Clin Orthop Relat Res 2014; Wolf JM et al, Clin Orthop Relat Res 2014). Sulla

faccia laterale (5), hanno origine i muscoli dell'eminanza tenare: l'abdotto breve del pollice (APB), l'opponente del pollice (OP) e il flessore breve del pollice (FPB) (Kuczynski K, J Anat 1974). Infine, lungo la faccia mediale (6), la superficie articolare si appoggia proximalmente sul trapezoide e distalmente sul secondo metacarpo (Napier JR, J Anat 1955).

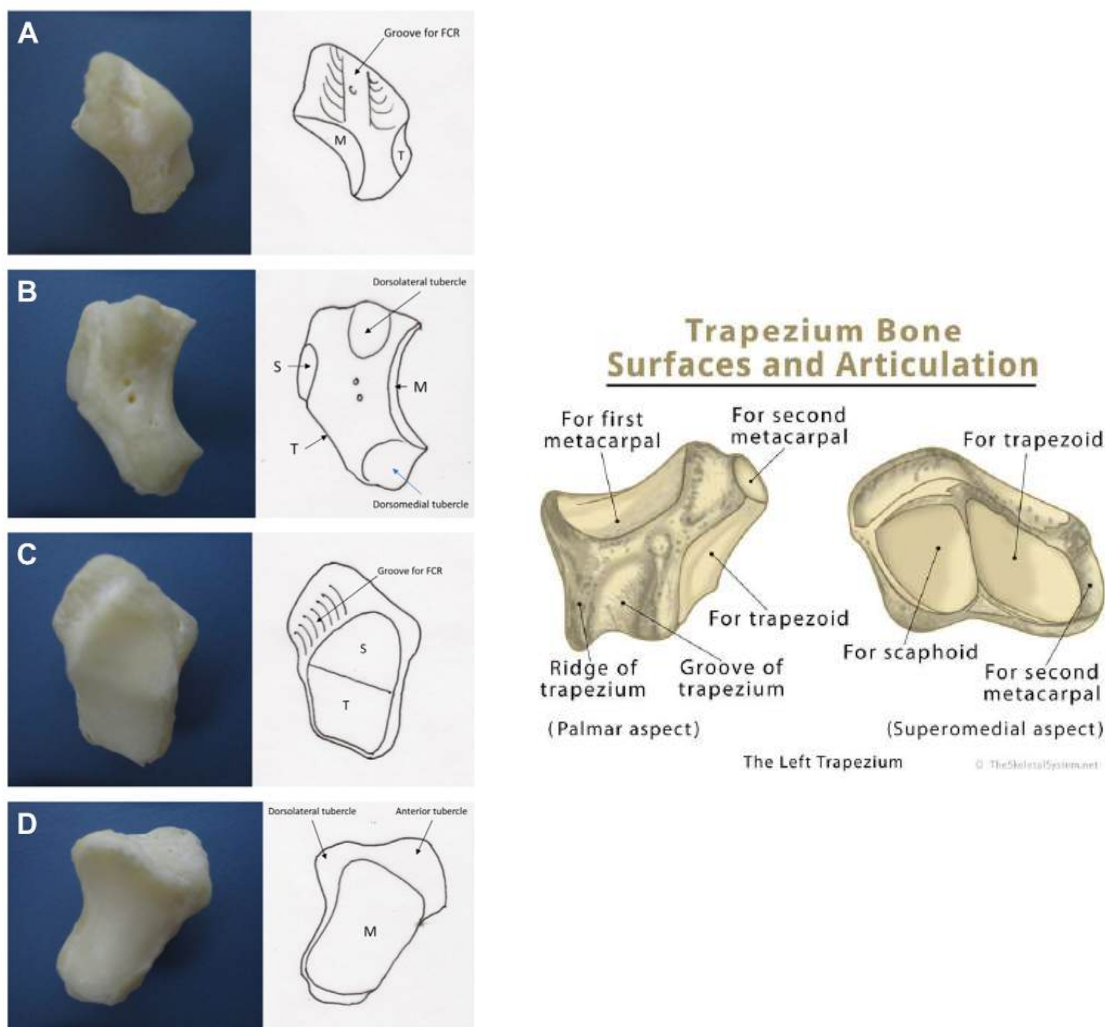


Fig. 18 Anatomia del trapezio. Viste palmare (A), dorsale (B), mediale (C) e distale (D). FCR, flessore radiale del carpo; M, superficie articolare per il primo metacarpo; S, superficie articolare per lo scafoide; T, superficie articolare per il trapezoide.

Il primo metacarpo, componente distale dell'articolazione CMC del pollice, è il metacarpo più corto. Alla sua base, un prominente labbro palmare con espansioni mediale e laterale forma una superficie concavo-convessa a forma di sella che si estende in direzione palmare, creando un becco volare (Panchal-Kildare S and Malone K, Hand Clin 2013). A differenza della superficie distale del trapezio, questa superficie è convessa da fronte a retro e concava da interno a esterno, creando una cresta che non è congruente con l'altra superficie articolare. Distalmente, il metacarpo del pollice non si articola con i metacarpi adiacenti, consentendo l'inserimento di quattro muscoli lungo il suo corpo: l'abdotto

lungo del pollice (APL) sulla superficie dorsale, l'opponente del pollice sulla superficie palmare (e radiale), il primo interosseo dorsale sulla superficie dorsomediale e una piccola porzione del flessore breve del pollice, sebbene questa possa non essere presente in alcuni individui.

La capsula che circonda l'articolazione CMC del pollice è relativamente ampia e lasca per accogliere un ampio raggio di movimento. La capsula è rinforzata da almeno 5 legamenti (**Figura 19**). I legamenti principali dell'articolazione CMC sono essenziali per mantenere la stabilità statica e dinamica tra il metacarpo e il trapezio. Questi legamenti hanno tre funzioni: (1) controllare l'estensione e la direzione del movimento articolare, (2) contribuire a mantenere un allineamento normale dell'articolazione e (3) aiutare a controllare e dissipare le forze generate dai muscoli attivati. Una eccessiva lassità dei legamenti, dovuta a sinovite cronica, infiammazione o infortuni ripetitivi, è una causa primaria di instabilità in questa articolazione e può essere un precursore della degenerazione della cartilagine articolare.

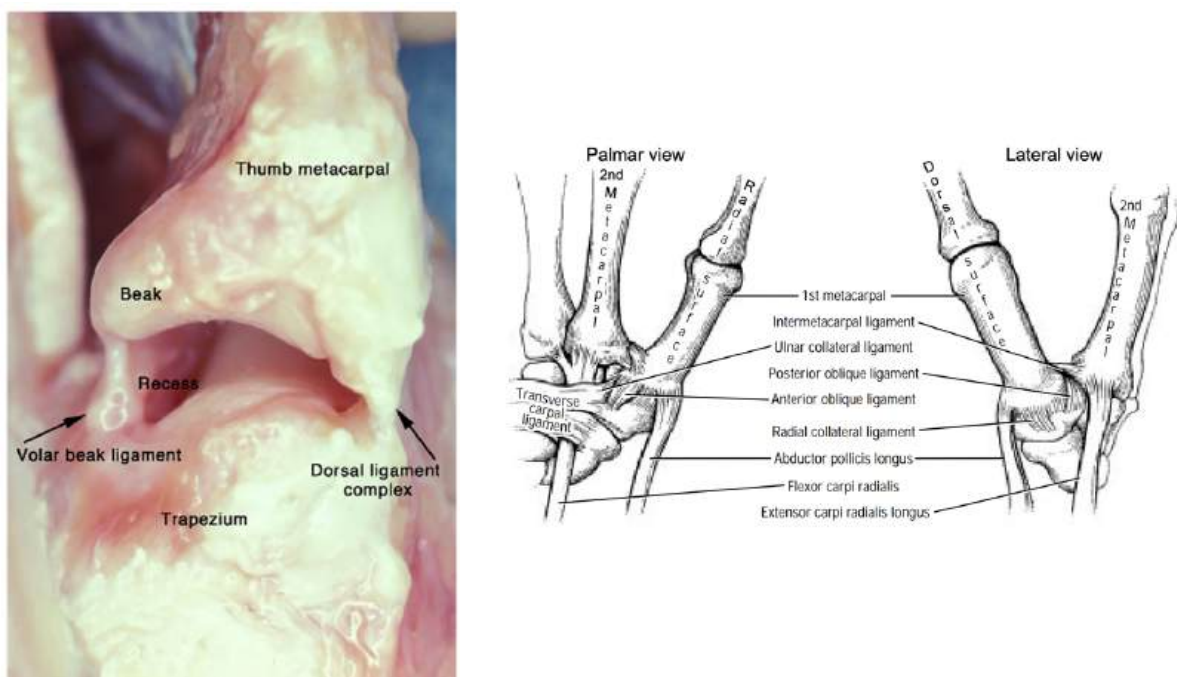


Fig.19 Viste palmare e dorsale dei legamenti dell'articolazione carpometacarpale del pollice. Si noti l'inserzione distale dell'abditore lungo del pollice nella capsula dell'articolazione carpometacarpale del pollice.

2.2.1 Il complesso dei legamenti dorsali

Il complesso dei legamenti dorsali, composto dal legamento radiale dorsale (DRL) e dal legamento obliquo posteriore (POL), è il legamento più grande e spesso dell'articolazione CMC del pollice (**Figura 20**). Comunemente chiamato anche complesso del legamento deltoideo, esso origina dal tubercolo del trapezio e si inserisce alla base del primo metacarpo sul lato radiale, nelle vicinanze dell'inserzione del tendine dell'abditore lungo

del pollice (APL), che funge da rinforzo. All'interno di questo legamento, il legamento radiale dorsale è teso in abduzione/flessione e rilassato in anteposizione/opposizione. Al contrario, il legamento obliquo posteriore è teso in estensione e rilassato in retroposizione, limitando la supinazione.



Fig. 20. Inserzioni di legamenti e muscoli all'articolazione CMC del pollice. Due viste che dimostrano l'anatomia dalla prospettiva anteriore con il pollice nella posizione di riposo e dalla prospettiva laterale con il pollice nella posizione di riposo. APL, abduktore lungo del pollice; DAOL, legamento obliquo anteriore profondo; DIML, legamento intermetacarpale dorsale; DRL, legamento radiale dorsale; IML, legamento intermetacarpale; MC1 e MC2, primo e secondo metacarpale; POL, legamento obliquo posteriore; SAOL, legamento obliquo anteriore superficiale; Tz, trapezio; UCL, legamento collaterale ulnare.

Storicamente, esiste una controversia riguardo alla determinazione del legamento stabilizzatore principale dell'articolazione CMC del pollice. In studi iniziali pubblicati da Imaeda e colleghi (Imaeda T et al, J Hand Surg Am 1993) e Pellegrini e colleghi (Pellegrini VD et al, J Hand Surg Am 1993), gli investigatori hanno evidenziato che i legamenti anteriori erano i principali stabilizzatori e conclusero che i legamenti dorsali non giocavano un ruolo significativo nello stabilizzare l'articolazione. Questo è stato inoltre corroborato da Bettinger e colleghi (Bettinger PC et al, J Hand Surg 1999). Tuttavia, dopo ulteriori indagini su cadaveri, alcuni autori hanno evidenziato che i legamenti anteriori erano deboli rispetto al complesso dorsale e hanno rettificato la teoria originaria (Bettinger PC et al, J Hand Surg Am 2000; Bettinger PC et al, Hand Clin 2001). Da allora, numerosi studi, tra cui quelli di Van Brenk e colleghi (Van Brenk J Hand Surg 1998), Ladd e colleghi (Ladd AL et al, Instr Course Lect 2013) e Strauch e colleghi (Strauch RJ et al, J Hand Surg 1994), hanno dimostrato che il complesso dei legamenti dorsali è più robusto, permettendo di prevenire la lussazione durante l'opposizione e la rotazione metacarpale spingendo il becco volare nel recesso trapeziodale. In particolare, questi studi hanno concluso che il legamento radiale dorsale e il legamento obliquo posteriore limitano l'articolazione dorsalmente durante la fase di pronazione (screw home) dell'opposizione,

prevenendo il disimpegno della testa del primo metacarpo e la sublussazione dorsale (Bettinger PC et al, J Hand Surg 1999). Come discusso da Cooney e Chao, se il complesso dei legamenti dorsali è danneggiato, gli altri legamenti non sono in grado di compensare, e si verifica sublussazione (Cooney WP and Chao EY, J Bone Joint Surg 1977). Pertanto, se il complesso è compromesso e si cerca di eseguire un grip di potenza, che può generare fino a 120 kg di forza nell'articolazione CMC del pollice, l'articolazione diventa instabile e il becco volare si lussa. Oltre a questi legamenti dorsali primari, Ladd e colleghi e Kuhlmann hanno anche identificato legamenti dorsali accessori durante studi su cadaveri (Ladd AL et al., J Bone Joint Surg Am 2012; Kuhlmann JN, Chir Main 2001). Questi legamenti, in particolare il legamento dorsale centrale, presentano fibre in prossimità del legamento dorsale radiale e del legamento obliquo posteriore e svolgono un ruolo accessorio nella stabilità articolare.

2.2.2 Il complesso dei legamenti volari (beak ligament)

Anteriormente, il complesso dei legamenti volari è composto dal legamento obliquo anteriore superficiale (SAOL) e dal legamento obliquo anteriore profondo (DAOL). Questi si originano dal becco volare del primo metacarpo e si inseriscono volarmente sul trapezio, vicino al recessus del becco (**Figura 21**).

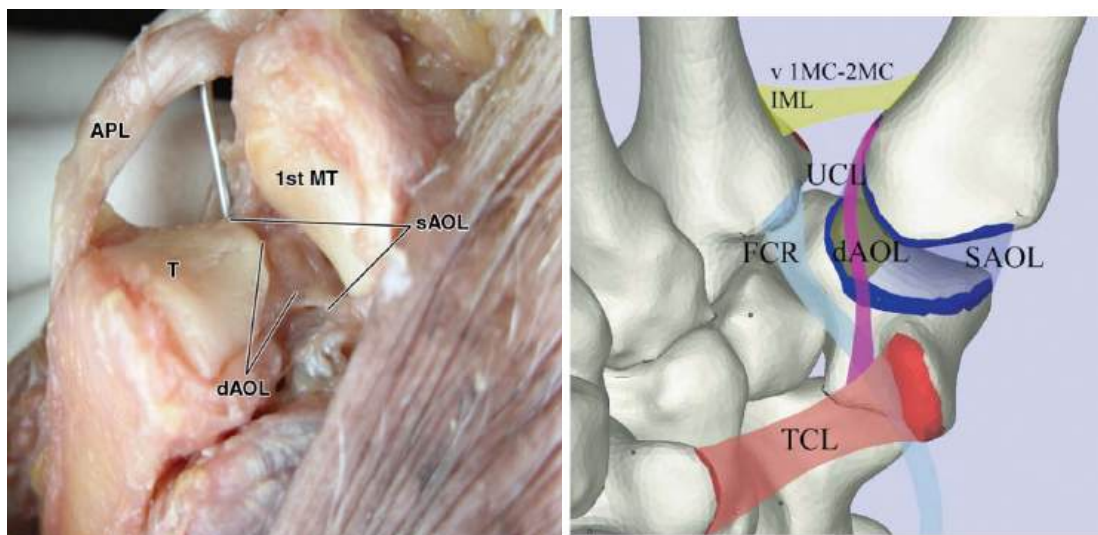


Figura 21: Fotografie di campioni cadaverici mostrano l'articolazione trapeziometarpale. 1st MT = primo metacarpo, SAOL = legamento obliquo anteriore superficiale, DAOL = legamento obliquo anteriore profondo, T = trapezio, APL = abducente lungo del pollice. L'articolazione è stata aperta come un cardine dal dorso per rivelare il legamento obliquo anteriore profondo (legamento del becco).

Una vista volare di un modello 3D. Le aree colorate solide mostrano i punti di attacco dei legamenti, mentre le aree colorate trasparenti mostrano i percorsi dei legamenti. SAOL, legamento obliquo anteriore superficiale (blu); DAOL, legamento obliquo anteriore profondo (marrone).

Questi legamenti insieme sono spesso denominati legamento del becco (Hirschmann A et al, Skeletal Radiol 2013). A differenza del complesso dei legamenti dorsali, i legamenti volari sono tesi solo nella posizione del "autostoppista" (abduzione, estensione e pronazione) durante il disimpegno del becco volare, prevenendo la sublussazione palmare. Sono laschi durante la maggior parte dei movimenti, inclusa l'opposizione (Eaton RG et al, J Hand Surg 1984; Adams JE et al, Am J Orthop 2008). Pertanto, non svolgono alcun ruolo nella prevenzione della sublussazione dorsale. È importante notare che durante la posizione dell'"autostoppista", il legamento obliquo anteriore profondo funge da punto di pivot per l'articolazione CMC del pollice, guidando il primo metacarpo durante la pronazione e prevenendo la traduzione mediale/laterale mentre i muscoli dell'eminenza tenare si contraggono per estendere e abduire il pollice. Questo è assistito dal legamento obliquo anteriore superficiale, che aiuta a controllare la sublussazione volare del metacarpo (Kuhlmann JN, Chir Main 2001). A causa di questo ruolo, il legamento del becco volare è inizialmente stato ritenuto lo stabilizzatore più importante dell'articolazione CMC del pollice e si pensava contribuisse allo sviluppo dell'osteoartrite dell'articolazione CMC del pollice. Per questo motivo, per decenni, la ricostruzione di questo legamento dopo trapeziectomia mediante tenodesi è stata prioritaria, per fornire stabilità all'articolazione (Ooishi D et al, Eur J Pain 2019; Bernstein RA, Instr course Lect 2015). Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che questa pratica è inutile poiché l'articolazione rimane stabile durante l'opposizione se i legamenti dorsali sono intatti (Pieron AP, Acta Orthop Scand 1973; Shin EK and Meals RA, J Hand Surg 2005).

2.2.3 Il legamento intermetarpale (IML)

Il legamento intermetarpale, che passa tra i metacarpi del pollice e dell'indice, ha la funzione di mantenere queste ossa in prossimità (**Figura 22**) e risulta particolarmente utile se sia il complesso dei legamenti dorsali che il legamento del becco volare sono danneggiati.



Figura 22: Il legamento intermetarpale visto volarmente e dorsalmente

È composto da un tronco comune e da due bracci: il legamento intermetacarpale dorsale e il legamento intermetacarpale volare. È importante notare che questo legamento viene spesso ricostruito utilizzando i tendini del flessore radiale del carpo (FCR) o dell'abditore lungo del pollice (APL) durante le procedure di trapeziectomia per prevenire il disagio dovuto alla migrazione prossimale del primo metacarpo (Eaton RG et al, J Hand Surg 1984; Adams JE et al, Am J Orthop 2008). Analogamente, il legamento collaterale ulnare, noto anche come legamento collaterale mediale, si inserisce prossimalmente al corpo sul tubercolo mediale del metacarpo del pollice e si unisce al legamento intermetacarpale nel prevenire la separazione ossea e nel controllare le forze di rotazione (Colman M et al, J Hand Surg 2007; Leversedge FJ, Hand Clin 2008).

2.2.4 Muscoli che attraversano l'articolazione

I muscoli che attraversano l'articolazione CMC del pollice sono responsabili del movimento articolare e della stabilizzazione attiva. Questi includono 4 muscoli estrinseci (3 situati sul lato dorsale) e 5 muscoli intrinseci (tutti localizzati sul lato palmare) (**Figura 23**). Inoltre, sebbene il primo muscolo interosseo dorsale non attraversi lo spazio articolare, agisce sull'articolazione attraverso la contrazione riducendo la sublussazione. Per questo motivo, è un elemento centrale nella riabilitazione muscolare per l'artrite dell'articolazione basale del pollice (Kerkof Fd et al, J electromyogr Kinesiol 2016; Srinivasan H and Landsmeer JM, J Hand Surg Am 1982).

Muscles acting near the thumb CMC joint. Includes intrinsic and extrinsic musculature		
Flexion	Adduction	Opposition
Adductor pollicis	Adductor pollicis	Abductor pollicis brevis
Flexor pollicis brevis	Extensor pollicis longus	Abductor pollicis longus
Flexor pollicis longus	First dorsal interosseus	Flexor pollicis brevis
Opponens pollicis		Flexor pollicis longus
		Opponens pollicis
Extension	Abduction	Reposition
Abductor pollicis longus	Abductor pollicis brevis	Extensor pollicis longus
Extensor pollicis brevis	Abductor pollicis longus	
Extensor pollicis longus		

Fig 23: Muscoli che agiscono vicino all'articolazione CMC del pollice. Include la muscolatura intrinseca ed estrinseca.

Tra i muscoli estrinseci, l'abditore lungo del pollice (APL) è suddiviso in parti superficiali e profonde, con l'aspetto profondo che si inserisce vicino al primo metacarpo all'articolazione CMC del pollice. Questo muscolo funziona principalmente per abduire il pollice, sebbene si pensi anche che supporti l'opposizione e assista il flessore breve del pollice (EPB) nell'estensione del pollice all'articolazione CMC (Maw J et al, Br J Hosp Med 2016). È importante notare che l'estensore breve del pollice (EPB) funge da principale estensore di questa articolazione (Leversedge FJ, Hand Clin 2008). D'altra parte,

il flessore lungo del pollice (EPL), anch'esso un muscolo estrinseco, funge sia da estensore che da adduttore dell'articolazione. Infine, il flessore lungo del pollice (FPL), situato sulla superficie palmare, flette l'articolazione mentre assiste anche nell'opposizione. I muscoli intrinseci sono disposti in 2 strati, a seconda della loro posizione relativa al tendine del flessore lungo del pollice (FPL). I muscoli tenari superficiali (opponente del pollice (OP), abducente breve del pollice (APB) e il capo superficiale del flessore breve del pollice (FPB)) sono innervati dal ramo ricorrente del nervo mediano, e i muscoli tenari profondi (adduttore del pollice e capo profonda del flessore breve del pollice (FPB)) sono innervati dal ramo profondo del nervo ulnare. Tra i muscoli intrinseci, l'opponente del pollice (OP) è specificamente progettato per l'opposizione. Questo muscolo si inserisce lungo il bordo radiale del primo metacarpo e funge da flessore/rotatore del pollice, guidando le superfici articolari e le creste all'interno dell'articolazione CMC del pollice. L'abducente breve del pollice (APB) è il più laterale dei muscoli tenari superficiali ed è principalmente responsabile dell'abduzione e dell'opposizione. È stata discussa anche la sua funzione nella flessione, nell'anteposizione e nella pronazione. Inoltre, l'abducente breve del pollice (APB) aiuta a stabilizzare l'articolazione, insieme all'abducente lungo del pollice (APL). Inoltre, il capo superficiale del flessore breve del pollice (FPB) funziona per flettere l'articolazione, assieme al capo profondo del flessore breve del pollice (FPB). Accanto a questo muscolo, l'adduttore del pollice è responsabile dell'adduzione dell'articolazione CMC del pollice e assiste nella retroposizione e nella supinazione. Questo muscolo ha due capi: trasversale e obliqua. Considerando questi muscoli estrinseci e intrinseci, è importante notare che le funzioni di questi muscoli si sovrappongono e un chiaro consenso sui loro rispettivi ruoli non è facilmente disponibile.

2.2.5 Vascolarizzazione e Innervazione

L'articolazione CMC del pollice è irrorata da una rete vascolare che origina dall'arteria princeps pollicis, o arteria principale del pollice (ramo dell'arteria radiale). Questa rete è più densa sul lato radiale, il che è necessario considerare durante l'esplorazione chirurgica (**Figura 24**). L'articolazione è principalmente innervata da rami del nervo mediano, in particolare dal ramo ricorrente e dai suoi rami. È importante notare che i rami del nervo radiale e il ramo profondo del nervo ulnare raggiungono anch'essi l'articolazione e i tessuti circostanti, il che può essere rilevante per la terapia di denervazione (Lore DP et al, Chir Main 2001; Lore DP et al, J Hand Surg Br 2002) (**Figura 25**). Il ramo ricorrente del nervo mediano di solito emette 2 rami, uno dei quali fornisce innervazione all'opponente del pollice (OP) e l'altro all'abducente breve del pollice (APB) (Poupon M et al, Rev Chir

Orthop Reparatrice Appar Mot 2004). Il ramo destinato all'opponente del pollice è spesso responsabile dell'innervazione primaria dell'articolazione, poiché si orienta sopra l'opponente del pollice e si distribuisce lungo la faccia palmare del trapezio, vicino al tendine del flessore radiale del carpo (FCR). Hagert e colleghi e Mobargha e colleghi, nei loro studi sulla propriocezione articolare, hanno riscontrato un numero maggiore di terminazioni nervose e meccanocettori localizzati vicino agli inserti tendinei del complesso dei legamenti dorsali rispetto ai legamenti palmari e al resto dell'articolazione (Hagert E et al, J Hand Surg Am 2012; Mobargha N et al, Clin Orthop Relat Res 2014). Hanno quindi concluso che questi legamenti devono svolgere un ruolo chiave nella funzione proprioceptiva del pollice.

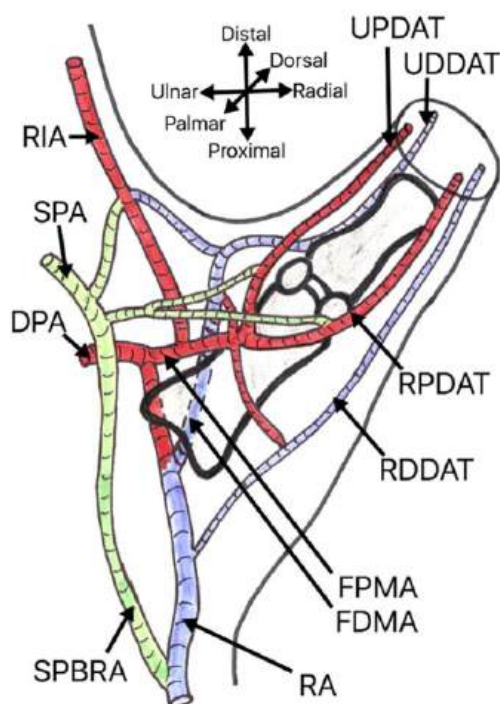


Fig 24: Fonti delle arterie del pollice suddivise per sistemi: verde, sistema palmare superficiale (dominante nel 8,22%); rosso, sistema palmare profondo (dominante nel 66,21%); blu, sistema dorsale (dominante nel 15,53%).
 Legenda: DPA, arco palmare profondo; RDDAT, arteria digitoparametrale radiodorsale del pollice; UDDAT, arteria digitoparametrale ulnodorsale del pollice; FDMA, prima arteria metacarpale dorsale; FPMA, prima arteria metacarpale palmare; RPDAT, arteria digitoparametrale radiopalmare del pollice; UPDAT, arteria digitoparametrale ulnopalmar del pollice; RA, arteria radiale; RIA, arteria radialis indicis; SPA, arco palmare superficiale; SPBRA, ramo palmare superficiale dell'arteria radiale.

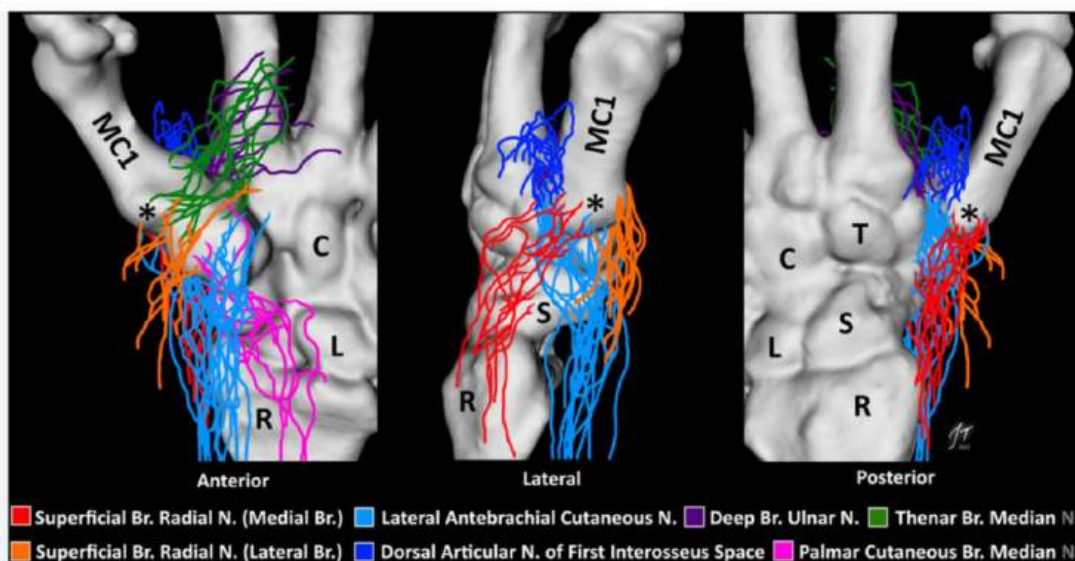


Fig 25: Diversa innervazione dell'articolazione CMC del pollice.

2.3 BIOMECCANICA

2.3.1 Posizione di Riposo del Pollice

La posizione di riposo neutra dell'articolazione CMC del pollice è definita come: 15-20° di abduzione palmare, 20-30° di retroposizione e 30-45° di opposizione. Questa posizione neutra consente al pollice di coprire il massimo arco funzionale di movimento. Il range di movimento dell'articolazione varia sostanzialmente tra gli individui, ma generalmente consente: Abduzione palmare: 50-70°, Abduzione radiale: 15-20°, Opposizione: 40-80°, Retroposizione (estensione): 20-45°, Anteposizione: 10-20°.

L'ampio range di movimento dell'articolazione è possibile grazie alla complessa rete legamentosa che circonda l'articolazione CMC, così come alle superfici articolari a forma di sella del trapezio e del primo metacarpo. Grazie al suo allineamento, il piano dell'unghia del pollice si trova ad angolo retto rispetto al piano delle altre 4 unghie mentre è a riposo. Questo fornisce una distanza adeguata all'opposizione, consentendo simultaneamente alla mano di appiattirsi (Colditz JC, J Hand Ther 2000).

2.3.2 Movimenti Dinamici del Pollice

Oltre alla posizione di riposo, il pollice è coinvolto in diverse manovre di presa che contribuiscono alla funzionalità complessiva della mano (Duncan SF et al, J Hand Surg Am 2006). In primo luogo, la presa di precisione, descritto anche come “terminal pinch” che comporta la flessione dell'articolazione interfalangea (IP) del pollice e dell'indice (IF), consentendo di afferrare oggetti piccoli come strumenti da scrittura. Al contrario, la presa opposizionale (“sub-terminal pinch”) implica il contatto della polpa del pollice, non della punta, con l'IF, mantenendo le articolazioni IP e distale IP in estensione, fornendo una maggiore stabilità rispetto al pizzicamento di precisione (Duncan SF et al, J Hand Surg Am 2006).

Il secondo movimento di presa è la cosiddetta “key pinch” la quale richiede l'adduzione del pollice e non l'opposizione, in modo che la polpa del pollice possa contattare la parte radiale della falange media dell'IF (Nanayakkara VK et al, Front Mech Eng 2017). Questo movimento è tipicamente utilizzato quando si inserisce una chiave in una serratura. L'ultimo tipo di presa è la cosiddetta “chuck pinch” (detta anche “tripod pinch”) la quale comporta il movimento del pollice in opposizione contro l'IF e il medio. Le manovre di presa, come il pizzicamento, richiedono coordinazione tra il pollice e l'IF; tuttavia, coinvolgono anche altre dita e il palmo della mano. In primo luogo, la presa a pinza, nota anche come presa direzionale, consente alla mano di avvolgere un oggetto cilindrico e applicare una forza torsionale (Duncan SF et al, J Hand Surg Am 2006; Nanayakkara VK

et al, Front Mech Eng 2017). Questa presa è utilizzata quando si usa un cacciavite. Analogamente, la presa ad uncino richiede anch'essa di avvolgere le dita attorno a un oggetto; tuttavia, in questo caso è solitamente necessaria una maggiore flessione delle dita e non richiede il pollice (Ladd AL et al, Instr Course Lect 2013). Questa viene utilizzata per afferrare un manico. Come la presa ad uncino, la presa di forza coinvolge anch'essa la flessione delle dita; tuttavia, il pollice è coinvolto, opponendosi direttamente alle altre dita per sostenere la presa. Questa presa sarà discussa nella sezione successiva. Infine, la presa a “campana” viene utilizzata quando un oggetto riempie completamente il palmo, come nel caso di afferrare una palla.

2.3.3 Stabilità dell'Articolazione CMC del Pollice

La revisione precedente dell'anatomia e delle manovre manuali fornisce le basi per una discussione sulla meccanica dell'articolazione CMC del pollice. Le chiavi della stabilità articolare sono il becco del metacarpo del pollice, il recesso del becco e i legamenti articolari, principalmente il complesso dei legamenti dorsali. La loro disposizione offre stabilità durante la rotazione nella fase finale dell'opposizione. Questa fase è necessaria per le manovre di presa discusse in precedenza. Quando il pollice è in riposo, il becco volare è disinserito dal suo recesso. Questo consente all'interspazio dell'articolazione CMC del pollice di allargarsi, creando lassità nei legamenti anteriori e posteriori (Esplugas M et al, J Wrist Surg 2016). È importante notare che il legamento anteriore rimane lasco durante la maggior parte dei movimenti del pollice e delle posizioni statiche, ad eccezione della posizione dell'"autostoppista". In questa posizione, l'abdotto lungo del pollice (APL), l'estensore breve del pollice (EPB) e l'estensore lungo del pollice (EPL) ritirano il primo metacarpo, consentendo al becco volare di disincastarsi dal suo recesso, simile a quanto avviene nella posizione di riposo. Inoltre, durante la posizione dell'"autostoppista", il posizionamento del metacarpo del pollice causa la tensione del legamento anteriore, a differenza delle altre posizioni. Durante la rotazione e l'opposizione, i movimenti più importanti dell'articolazione CMC del pollice, il becco volare inizia a articolarsi con il suo recesso, mantenuto in parte dal complesso dei legamenti dorsali tesi (Srinivasan H and Landsmeer JM, J Hand Surg Am 1982). Per iniziare questo processo, l'abdotto breve del pollice (APB) abduce il pollice all'articolazione CMC, mentre l'opponente del pollice (OP) inizia a portare il pollice in opposizione. Successivamente, i muscoli tenari intrinseci si contraggono, causando ulteriore rotazione del pollice e incastrando il becco volare nel suo recesso attraverso forze compressive (**Figura 26**). Nel frattempo, i legamenti anteriori

rimangono laschi. Questa trasformazione consente a un'articolazione precedentemente lasca e incongrua di ottenere congruenza articolare e stabilità.

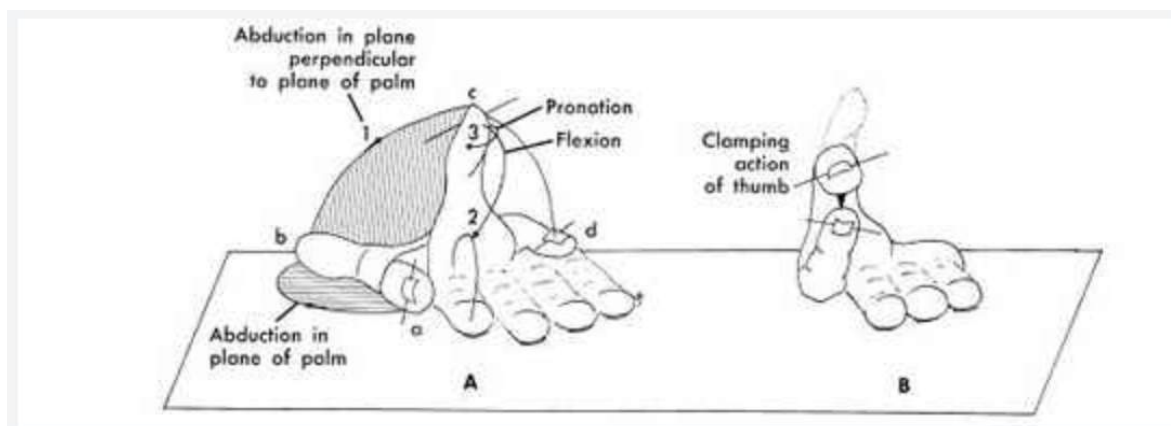


Fig 26: Opposizione del pollice. A, fase I è il posizionamento del pollice contro il dito corrispondente. Questo movimento comporta la curva 1, abduzione in un piano perpendicolare al palmo; curva 2, flessione; curva 3, pronazione. B, fase II comporta il serraggio delle dita opposte. Ciò fornisce potenza all'opposizione.

2.3.4 Conseguenze del carico sull'Articolazione

La forza di taglio applicata all'articolazione CMC del pollice può essere significativa. Come dimostrato in uno studio fondamentale di Cooney e Chao, durante il pizzicamento, i tendini intrinseci ed estrinseci del pollice sostenevano carichi fino a 30 e 10 kg, rispettivamente. Durante la presa, i carichi sui tendini raggiungevano anche i 50 kg. Questo ingente carico, fino a 120 kg, era responsabile di una significativa forza di compressione e di taglio nel pollice, che si concentrava direttamente sull'articolazione CMC del pollice alla sua base (Strauch RJ et al, J Hand Surg 1994). In teoria, anche minimi movimenti di pizzicamento, come quelli eseguiti durante lo spazzolamento dei denti o la rotazione delle chiavi, possono esercitare un carico elevato sull'articolazione a causa della sua posizione. Pertanto, è stato ipotizzato che, nel tempo, le forze di taglio consumino il becco volare, causando l'instabilità della torsione a vite (Komatsu I and Lubahn JD, Oper Tech Orthopaedics 2018). Questa instabilità consente la traduzione laterale del metacarpo sul trapezio, erodendo la superficie articolare e portando all'artrite articolare. Esistono numerosi trattamenti conservativi e chirurgici per questa condizione, ampiamente discussi nella letteratura sulla chirurgia della mano.

CAPITOLO 3

OSTEOARTRITE CARPOMETACARPALE DEL POLLICE

3.1 INTRODUZIONE

L'artrite della mano è una causa principale di disabilità a livello mondiale, specialmente nella popolazione anziana. Il pollice rappresenta il dito più importante, essendo in grado di opporsi agli altri dita e l'articolazione trapezio-metacarpale (TM) è considerata la più rilevante nel corpo umano (Pellegrini VD, J Hand Surg Am 1991). L'articolazione carpometacarpale (CMC) è la seconda sede più comune dell'artrite della mano, dopo l'articolazione interfalangea distale. L'osteoartrite dell'articolazione carpometacarpale del pollice, nota anche come artrite dell'articolazione basale o osteoartrite trapezio-metacarpale, è una condizione comune e debilitante che può avere un impatto significativo sulla funzionalità della mano e sulla qualità della vita. L'articolazione CMC del pollice è particolarmente suscettibile all'osteoartrite a causa della sua complessità biomeccanica, dell'ampia gamma di movimento e dell'uso frequente in attività di pizzicamento e presa. Le stime di prevalenza suggeriscono che fino al 33% delle donne e il 14% degli uomini oltre i 55 anni sono affetti da osteoartrite del CMC del pollice (Kaneko S et al, J Hand Ther 2009). La pato-anatomia dell'osteoartrite carpometacarpale del pollice coinvolge la degenerazione dell'articolazione, causata da instabilità ossea intrinseca, eccessiva lassità legamentosa e schemi di uso ripetitivo o eccessivo. Le conseguenze risultanti comprendono infiammazione sinoviale, usura della cartilagine e degenerazione progressiva dell'articolazione, fino a portare ad una traduzione dorsale patologica dell'osso metacarpale (Kloppenburger M et al, Best Pract Res Clin Rheumatol 2017). L'osteoartrite CMC tipicamente inizia con una graduale usura dell'articolazione, conducendo a dolore, rigidità e perdita di forza e mobilità. Con il progredire della malattia, possono verificarsi instabilità articolare, sublussazione e, infine, riduzione dello spazio articolare e deformità ossea. L'osteoartrite CMC in fase iniziale è spesso gestita in modo conservativo con farmaci anti-infiammatori, modifiche all'attività, splintaggio e iniezioni. Tuttavia, per le malattie più avanzate che non rispondono ai trattamenti non chirurgici, possono essere considerate opzioni chirurgiche.

3.2 DIAGNOSI CLINICA

Un'accurata valutazione fisica è utile per localizzare la fonte del dolore, valutare la lassità delle articolazioni metacarpo-falangee (MCP) e carpometacarpale (CMC) del pollice, e per escludere altre cause di dolore al polso dal lato radiale, tra cui la tenosinovite di De Quervain, la tendinite del flessore radiale del carpo, la tenosinovite stenotizzante del pollice, l'artrite scafotrapeziale trapezoidale (STT) e l'artrite radio-scafoidea (Choa RM et al, J Hand Surg Eur Vol 2014). I pazienti con osteoartrite dell'articolazione CMC del

pollice presentano tipicamente un'insorgenza insidiosa di dolore, rigidità e perdita di forza e mobilità nell'articolazione interessata del pollice. Durante l'esame fisico, i principali riscontri possono includere: ingrossamento osseo e tenerezza alla base del pollice, crepitio durante il movimento articolare, perdita dell'escursione articolare del CMC, specialmente in abduzione radiale e abduzione palmare, debolezza nella forza di pizzicamento e di presa, instabilità e lassità dell'articolazione CMC, con potenziale sublussazione. La valutazione radiografica è essenziale per confermare la diagnosi e per inquadrare la gravità della malattia. I rilievi radiografici tipici includono il restringimento dello spazio articolare, la sclerosi subcondrale, la formazione di osteofiti e, infine, la sublussazione articolare o deformità. Sebbene le radiografie convenzionali rimangano lo strumento diagnostico principale, modalità di imaging avanzate come risonanza magnetica (MRI) o tomografia computerizzata (CT) possono fornire ulteriori informazioni sull'estensione del coinvolgimento dei tessuti molli e ossei.

3.2.1 Ispezione

I pazienti con artrite dell'articolazione CMC possono presentare gonfiore attorno all'articolazione, causato da infiammazione e proliferazione sinoviale. Man mano che i legamenti stabilizzatori si attenuano progressivamente e la biomeccanica viene alterata, la base del primo metacarpo si sublussa dal trapezio nella direzione dorsoradiale, creando un gradino. L'aspetto risultante è descritto come "quadratura" o "segno della spalla" (Weinstock-Zlotnick G et al, HSS J 2019; Normand M et al, Hand Ther 2021). Grandi osteofiti sul trapezio possono anche contribuire alla prominenza dell'articolazione. Man mano che la condizione progredisce, l'articolazione carpometacarpale mostra una crescente rigidità, e i muscoli intrinseci tenari subiscono atrofia e fibrosi a causa del ridotto uso. Questo processo contribuisce ulteriormente alla perdita di funzionalità della mano e alla difficoltà nelle attività quotidiane che implicano l'uso del pollice. L'atrofia dei muscoli intrinseci riduce la forza e il controllo motorio fine, portando a un aumento della dipendenza da strategie compensatorie, che possono aggravare ulteriormente le deformità e le limitazioni funzionali associate all'artrite CMC. Questo comportamento porta infine a una contrattura dello spazio interdigitale, comunemente chiamata deformità in adduzione. L'adduzione fissa del primo metacarpo provoca una cascata di deformità compensatorie nelle articolazioni distali del pollice. Per portare la punta del pollice in una posizione migliore nello spazio, l'articolazione MCP si iperestende, il che allunga la placca volare e tira il tendine dell'estensore lungo del pollice. Conseguentemente, il flessore lungo del pollice è sottoposto a tensione mentre attraversa un'articolazione MCP esteso, causando la

flessione dell'articolazione interfalangea. La postura risultante viene definita deformità a zig-zag e riflette le patomeccaniche e le limitazioni funzionali caratteristiche dell'artrite CMC severa (Gillis J et al, Can J Plast Surg 2011).

3.2.2 Palpazione

La palpazione dell'articolazione CMC può rivelare una dolorabilità puntiforme, localizzata volarmente e direttamente prossimale all'eminenza tenare. Nel caso dell'artrite scafo-trapeziale trapezoidale (STT), il dolore può essere evocato mediante palpazione diretta dorsalmente nella parte distale della tabacchiera anatomica, radialmente rispetto al tendine dell'estensore lungo del pollice. Inoltre, l'esaminatore può valutare l'instabilità articolare, che può indicare lassità legamentosa e precoci segni di malattia artritica, testando le articolazioni interfalangee, metacarpo-falangee e CMC del pollice (Merritt MM et al, J Hand Ther 2020). Questa valutazione prevede che l'esaminatore stabilizzi la mano del paziente prossimale all'articolazione di interesse e sottoponga l'articolazione a stress in varie direzioni, come flessione, estensione, abduzione e adduzione. L'esame dovrebbe essere ripetuto sulla mano omolaterale per confronto, al fine di valutare eventuali differenze nella mobilità articolare o nell'instabilità.

3.2.3 Manovre Provocatorie

Diversi test provocatori sono utilizzati per differenziare l'artrite CMC da altre cause di dolore al polso dal lato radiale. Il “grind test” include la compressione assiale dell'articolazione CMC con la circonduzione del pollice ed è considerato positivo quando viene riprodotto il dolore (Merritt MM et al, J Hand Ther 2020). Il crepitio, dovuto alla distruzione della cartilagine articolare, è talvolta presente. È consigliabile evitare un'eccessiva flessione dell'articolazione MCP del pollice durante questo manovra per prevenire confusione con il dolore derivante dalla trazione del primo compartimento dorsale. Nonostante la sua popolarità e l'alta specificità (80%–100%), il test ha una bassa sensibilità (30%–50%).

Con il “traction-shift test” (noto anche come “subluxation-relocation test”), si applica una trazione longitudinale al pollice mentre si esercita una pressione dorsale e volare alla base del primo metacarpo, sublussando e riposizionando alternativamente l'articolazione. La riproduzione del dolore indica un test positivo. In uno studio prospettico che confrontava i test di trazione-shift e di compressione, il primo è risultato superiore, con una sensibilità del 67% (rispetto al 30%) e una specificità del 100% (rispetto al 97%) (Gelberman RH et al, J Hand Surg Am 2015).

Per il “lever test”, l'esaminatore afferra la base del primo metacarpo e lo sposta radialmente e ulnarmente per provocare dolore artritico. Questo test è più sensibile rispetto al grind test (82% contro 41%), sebbene non così specifico (81% contro 100%). Alcuni autori (Glickel SZ, Hand Clin 2001) hanno descritto le manovre di stress per adduzione ed estensione del pollice. Nel test di adduzione, l'esaminatore supporta la mano del paziente in una posizione neutra mentre applica una pressione verso il basso (adduzione passiva) sulla testa del primo metacarpo, in modo che sia parallela al secondo metacarpo. Nel test di estensione, l'esaminatore spinge radialmente la testa del primo metacarpo, in modo da essere coplanare con il palmo. I test di adduzione ed estensione hanno dimostrato un'elevata sensibilità (94%), specificità (93%-95%) e affidabilità inter-valutatori.

Altre manovre provocatorie descritte includono il grind test della base del metacarpo (noto eponimamente come test di Glickel) e il “torque test” (distrazione del primo metacarpo con rotazione assiale descritto da Eaton e Littler).

3.2.4 Forza e Range di Movimento

La forza di presa preoperatoria, così come i range di movimento, dovrebbero essere valutati e documentati. La debolezza del pollice è spesso una lamentela presentata da pazienti con artrite dell'articolazione CMC. Esistono tre tipi di presa: laterale (o a chiave), a due punti (o a punta) e a tre punti (o tripod); questi possono essere facilmente misurati utilizzando dinamometri commercialmente disponibili. La presa laterale viene eseguito con il pollice che esercita pressione contro il lato radiale dell'indice. La presa a due punti viene eseguito con la punta del pollice premuta contro la punta dell'indice. Nella presa a tre punti, la polpa volare del pollice viene premuta contro la polpa dell'indice e del medio. I valori misurati dovrebbero essere confrontati con il lato controlaterale e con i valori normativi pubblicati in base a età, sesso e dominanza della mano (Villafane JH and Valdes K, J Phys Ther Sci 2014; McQuillan TJ et al, Clin Orthop Relat Res 2016).

I range di movimento sono quasi universalmente compromessi e peggiorano con il grado di degenerazione della malattia. Il movimento dell'articolazione CMC è difficile da misurare in modo affidabile. Utilizzando un goniometro, l'asse e il braccio fisso vengono posizionati sull'articolazione CMC e sul secondo metacarpo, rispettivamente, mentre il braccio mobile è centrato sul primo metacarpo. Negli individui normali, il range medio di movimento è di 41° per flessione/estensione, 51° per abduzione/adduzione e 21° per rotazione assiale, con flessione/estensione e abduzione/adduzione significativamente maggiori nelle donne (Goubier JN et al, Chir Main 2009). Per le articolazioni MCP e interfalangee, esiste una

grande variabilità nella popolazione e i valori dovrebbero essere comparati con il pollice controlaterale. Un altro test utilizzato è il test di Kapandji per la valutazione dell'opposizione (Jha B et al, Hand Ther 2015).

3.2.5 Esame Sensoriale

I pazienti affetti da artrite dell'articolazione carpometacarpale (CMC) presentano una prevalenza di sindrome del tunnel carpale (CTS) che può raggiungere il 43% (Florak TM et al, J Hand Surg Am 1992). Si ritiene che ciò sia correlato alla compressione del tunnel carpale derivante dall'infiammazione della giunzione basale, dalla sinovite e dalla presenza di osteofiti trapeziali. L'esame fisico dovrebbe comprendere test sensoriali mediante stimolazione leggera e utilizzo di monofilamenti nella distribuzione del nervo mediano, oltre a manovre provocatorie per la sindrome del tunnel carpale (ad es., segno di Tinel, test di Phalen, test di Durkan). Si dovrebbe annotare la presenza di atrofia dell'eminanza tenare. Una diagnosi di sindrome del tunnel carpale coesistente può essere confermata tramite studi di conduzione nervosa (elettromiografia).

3.3 DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

Quando si sospetta un'artrite dell'articolazione carpometacarpale (CMC), è necessario effettuare esami di imaging per supportare la diagnosi e valutare la severità e la distribuzione delle alterazioni degenerative. Il trattamento è guidato dai sintomi e dalle limitazioni funzionali del paziente, piuttosto che dai risultati radiografici.

3.3.1 Radiografie Standard

Le radiografie standard sono obbligatorie nella valutazione dell'artrite dell'articolazione carpometacarpale (CMC) e spesso mostrano caratteristiche peculiari delle patologie articolari (Wenham CYJ et al, Osteoarthr Cartil 2014). Le malattie articolari possono essere classificate come degenerative (sia primarie che post-traumatiche) o infiammatorie. Nelle artriti degenerative si riscontrano un restringimento articolare asimmetrico, sclerosi sottocondrale, cisti e osteofiti. L'artrite infiammatoria è caratterizzata da un restringimento articolare simmetrico, osteopenia periarticolare, erosioni e una disruzione dell'architettura articolare. La sublussazione dorso-radiale del primo metacarpo rispetto al trapezio può essere presente sia nell'artrite degenerativa che in quella infiammatoria. È importante annotare la presenza di artrite dell'articolazione scapho-trapezio-trapezoidale (STT), anche se può risultare difficile da stabilire tramite radiografie standard. Le tre proiezioni standard della mano (posteriore-anteriore, laterale, obliqua) sono sufficienti per la rilevazione di

un'artrite CMC avanzata; tuttavia, data l'orientazione obliqua del trapezio e l'allineamento fuori piano del pollice rispetto al palmo e alle dita, sono disponibili altre viste radiografiche (Oheb J et al, Hand Surg 2015; Dela Rosa TL et al, J Hand Surg Eur Vol 2004; Wolf JM et al, J Hand Surg 2009; Van Royen K et al, J Hand Surg Eur Vol 2022) per minimizzare l'overlap con altre ossa carpali.

La vista di Robert si ottiene massimizzando la pronazione dell'avambraccio e posando il dorso del pollice sulla pellicola. Questo fornisce una vera vista antero-posteriore del pollice (**Figura 27A**).

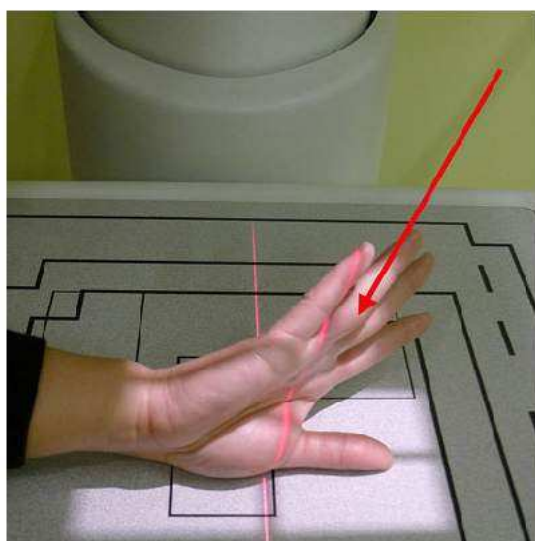


Fig 27A: Robert's view: vista anteroposteriore del pollice



Nella vista di Bett (nota anche come vista di Gedda), si ottiene una vera vista laterale dell'articolazione CMC pronando la mano di 20°-30°, posando il pollice piatto contro la pellicola e dirigendo il fascio di raggi X 15° da distale a prossimale. In questo modo è possibile visualizzare tutte e quattro le articolazioni del trapezio (**Figura 27B**).



Fig 27B: Bett's view: vista laterale del pollice



La vista di stress di Eaton è una proiezione posteriore-anteriore delle mani bilaterali, in cui il paziente deve posizionare i pollici in parallelo e premerli insieme. Questa configurazione dinamica dimostra la sublussazione radiale del primo metacarpo, così come la lassità intrinseca dell'articolazione, che è stata proposta come fattore di rischio per l'artrite CMC (Figura 27C).

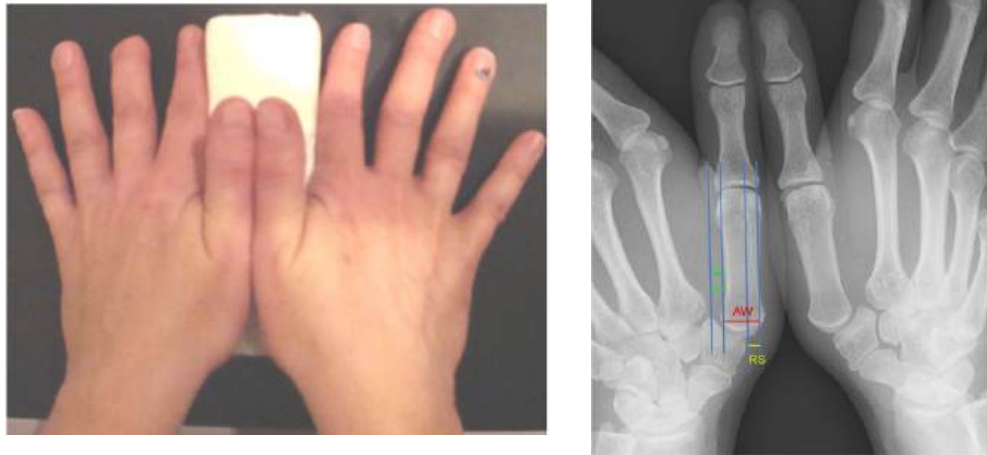


Fig 27C: Eaton's stress view

La vista di pinzamento laterale, in cui il pollice è massimamente premuto contro l'indice, può valutare il grado di scomparsa metacarpale se ottenuta preoperatoriamente e postoperatoriamente (Figura 27D).

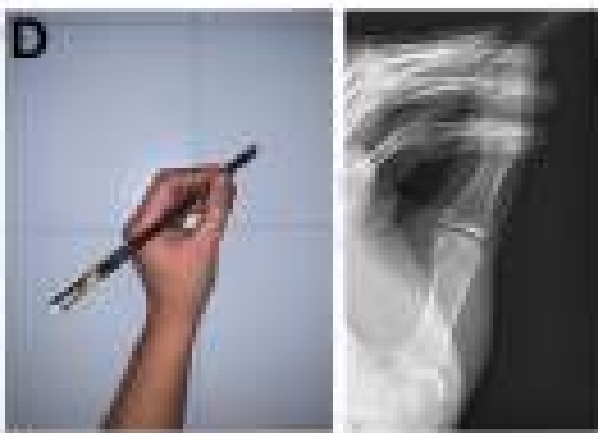


Fig 27D: Lateral Pinch view

3.3.2 Classificazione radiografica

Eaton e Littler hanno proposto un sistema di classificazione radiografica per stadiare la severità dell'osteoartrite dell'articolazione carpometacarpale (CMC) del pollice (Eaton RG and Littler JW, J Bone Joint Surg Am 1973). Gli autori hanno cercato di fornire un sistema di classificazione chirurgica basato su evidenze radiografiche di degenerazione articolare (Figura 28).



Fig 28: (A–D). I 4 stadi radiografici della classificazione di Eaton–Littler.

L'osteoartrite di stadio 1 è caratterizzata da un aspetto complessivamente sano dell'articolazione CMC, con solo una sottile dilatazione dovuta a effusione, sinovite o lassità legamentosa. Non sono presenti osteofiti, sclerosi o cisti sottocondrali. Questo stadio rappresenta la forma più lieve di osteoartrite dell'articolazione CMC. Nello stadio 2, l'articolazione presenta un lieve restringimento con sclerosi moderata e cisti sottocondrali. Possono essere presenti osteofiti o corpi mobili inferiori a 2 mm di dimensione, insieme a una sublussazione dell'articolazione fino a un terzo. Questo stadio dimostra cambiamenti degenerativi più avanzati rispetto allo stadio 1. L'osteoartrite di stadio 3 è contrassegnata da un significativo restringimento dell'articolazione, un aumento della sclerosi e la presenza di cisti sottocondrali. Gli osteofiti superano i 2 mm di diametro e più di un terzo dell'articolazione è sublussata. L'articolazione STT rimane non coinvolta in questo stadio. La descrizione originaria dello stadio 4 descriveva un avanzato restringimento articolare con severi osteofiti, sclerosi e cambiamenti cistici. Nel 1987, Eaton e Glickel hanno modificato questo stadio per includere un'articolazione CMC patologica come descritta nello stadio 3, insieme a restringimento dell'articolazione STT, cisti e sclerosi (Eaton RG and Glickel SZ, *Hand Clin* 1987).

La stadiazione radiografica di Dell (Dell PC et al, *J Hand Surg Am* 1978) è un sistema di classificazione utilizzato per valutare la gravità dell'osteoartrite dell'articolazione carpometacarpale (CMC) del pollice. Questo sistema è stato sviluppato per fornire un quadro chiaro e standardizzato delle modifiche radiografiche associate all'osteoartrite, facilitando così la diagnosi e la pianificazione del trattamento. In generale, il sistema di stadiazione di Dell si basa sull'analisi di diversi segni radiografici, come la presenza di osteofiti, il restringimento dello spazio articolare, la sclerosi subcondrale e le deformità articolari.

La stadiazione radiografica di Dell e la classificazione di Eaton-Littler sono entrambe utilizzate per valutare l'osteoartrite dell'articolazione carpometacarpale (CMC) del pollice, ma si differenziano per i criteri e i dettagli specifici che impiegano nella classificazione della gravità della malattia.

In particolare la stadiazione radiografica di Dell si concentra sull'analisi di segni radiografici specifici, come la presenza di osteofiti, il restringimento dello spazio articolare e altri cambiamenti degenerativi mentre la classificazione di Eaton-Littler è un sistema diviso in stadi ben definiti (da 1 a 4), ognuno con caratteristiche specifiche associate alla degenerazione articolare, incorporando non solo i cambiamenti radiografici ma anche l'aspetto clinico della malattia, considerando fattori come la sublussazione e lo stato delle articolazioni adiacenti (ad es. STT).

In sintesi, la principale differenza tra le due classificazioni risiede nell'approccio: mentre la stadiazione di Dell è focalizzata sui dettagli radiologici, la classificazione di Eaton-Littler offre un quadro più globale e pratico della malattia, con implicazioni dirette per il trattamento. Entrambi i sistemi sono utili in contesti clinici e possono essere utilizzati in modo complementare per una valutazione più completa dell'osteoartrite CMC.

3.3.3 Altre Modalità di Imaging

L'imaging per sezioni trasversali è raramente necessario nella valutazione di routine dell'artrite basale del pollice, tuttavia, può fornire informazioni aggiuntive in pazienti selezionati. La risonanza magnetica (RM) offre visualizzazioni altamente accurate e dettagliate dell'anatomia dei tessuti molli e ossei, compresa l'architettura legamentosa, la presenza di cisti gangliari e l'erosione della cartilagine articolare, sebbene sia più costosa rispetto ad altre modalità. La RM può anche rivelare altre potenziali cause di dolore al pollice, inclusi infortuni ai legamenti collaterali delle articolazioni metacarpofalangee (MCP) (Saltzherr MS et al, Skeletal Radiol 2013). In particolare, la RM è in grado di visualizzare la struttura della sinovia, con maggiore dettaglio, consentendo una valutazione più completa della patologia articolare. Nelle fasi iniziali della malattia, la RM può rilevare l'assottigliamento della cartilagine, l'edema del midollo osseo e le lesioni legamentose prima che tali cambiamenti siano evidenti sulle radiografie convenzionali.

Le scansioni con tomografia computerizzata (TC) forniscono dettagli sull'anatomia ossea e sui cambiamenti artritici. In uno studio, è stato dimostrato che la tomografia computerizzata fornisce una maggiore affidabilità inter-osservatore nella diagnosi di artrite carpometacarpale (CMC) e scafoidea-trapezio (STT) rispetto alla radiografia convenzionale (Melville DM et al, Skeletal Radiol 2015).

L'esame ecografico è uno strumento relativamente economico per valutare l'integrità dei legamenti di stabilizzazione e le loro inserzioni attorno all'articolazione CMC. Con questa modalità è possibile rilevare anche l'effusione articolare e gli osteofiti marginali (To P et al, Hand 2017). Quando la terapia intra-articolare mediante punti di riferimento palpabili risulta difficoltosa, l'iniezione guidata da ecografia può migliorare l'accuratezza (To P et al, Hand 2017).

3.4 MANAGEMENT NON OPERATORIO

L'artrite del pollice viene frequentemente gestita in modo non chirurgico mediante modifiche alle attività, utilizzo di ortesi, farmaci anti-infiammatori (orali e/o topici) e iniezioni di corticosteroidi intra-articolari (O'Shaughnessy MA and Rizzo M, Hand Clin 2023). Pochi studi riportano il tasso di successo della gestione non operativa, ma uno studio recente condotto da Spaans e colleghi (Spaans AJ et al, J Hand Surg 2020) ha evidenziato che oltre il 60% dei pazienti presentatisi per la prima volta in una clinica di chirurgia della mano ha mostrato miglioramenti tramite modalità non operatorie. Bertozzi e colleghi (Bertozzi L et al, Disabil Rehabil 2015) hanno realizzato una revisione sistematica e hanno riscontrato in modo simile che solo il 30% dei pazienti ha progredito verso un intervento chirurgico.

3.4.1 Istruzione e Modifica delle attività

Uno degli aspetti più importanti nella gestione dell'artrite del pollice è il controllo del dolore. La gestione iniziale di un'articolazione dolorosa comprende l'evitamento delle attività dolorose. Questo può essere difficile a causa della funzione cruciale dell'articolazione basale del pollice nelle attività quotidiane; tuttavia, l'educazione del paziente su come evitare di sovraccaricare inutilmente l'articolazione CMC del pollice può essere benefica. I pazienti dovrebbero evitare di pizzicare, torcere e stringere in caso di infiammazione acuta (Yao J and Park MJ, Hand Clin 2008). L'uso di strumenti di assistenza, come un assistente per le chiavi e un apribottiglie / vasetti, può ridurre il carico imposto sull'articolazione del pollice e migliorare in modo significativo la qualità della vita. Quando utilizzati correttamente, i pazienti hanno mostrato miglioramenti nella forza di presa e nel sollievo dal dolore (Stamm TA et al, Arthritis Care Res 2002; Hammond A and Freeman K, Rheumatology 2001).

3.4.2 Farmaci orali e topici

I farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) possono essere utilizzati sia localmente che per via orale per controllare il dolore. L'efficacia dei FANS è ben consolidata e rappresentano una pietra miliare per il controllo dei sintomi nell'osteoartrite (Mgini A et al, Pain Ther 2021). Il diclofenac topico (gel o unguento allo 1%), ora disponibile senza prescrizione, ha dimostrato di migliorare il dolore del 40% nei pazienti affetti da osteoartrite della mano (Altman RD et al, J Rheumatol 2009). La medicazione topica presenta inoltre il vantaggio di evitare effetti collaterali renali ed ematologici avversi che talvolta si riscontrano con i FANS orali. Con la crescente legalizzazione e accesso ai prodotti a base di cannabis, questa categoria di farmaci ha il potenziale di cambiare il trattamento dell'artrite. Attualmente, i prodotti a base di cannabis non sono regolamentati dalla Food and Drug Administration (FDA) e sono considerati integratori; di conseguenza, permangono confusione riguardo alla qualità dei prodotti e alle dosi raccomandate. A complicare l'uso diffuso di questi prodotti è la confusione riguardo a ciò che è legale in relazione ai test antidroga sul posto di lavoro e alle restrizioni correlate. Sono in corso studi che valutano l'efficacia e la sicurezza dell'uso dei cannabinoidi per il dolore cronico (Hendricks O et al., BMJ Open 2019).

3.4.3 Splinting

L'uso di ortesi è una delle strategie terapeutiche più comuni. Il design tipico è un'ortesi che stabilizza l'articolazione carpometacarpale (CMC) del pollice e spesso anche l'articolazione metacarpofalangea (MCP), mantenendo libera l'articolazione interfalangea. È raccomandata un'ortesi che supporti l'articolazione CMC in abduzione palmare, per facilitare la stabilità e massimizzare l'ampiezza dello spazio interdigitale (Shridar V and Williams S, Aust J Gen Pract 2020). Possono essere indossate di notte per far riposare l'articolazione durante il sonno, ed utilizzate durante il giorno per supportare e alleviare l'articolazione durante l'attività. La stecca Push MetaGrip (**Figura 29**) rappresenta un design innovativo a basso profilo che può essere facilmente realizzata dai terapisti della mano. Alcuni pazienti trovano questa piccola ortesi particolarmente funzionale grazie alla possibilità di indossarla durante l'uso quotidiano. Le stecche a base di avambraccio sono un'opzione per i pazienti con artrite del polso concomitante. La letteratura è contraddittoria riguardo al ruolo delle ortesi. Uno studio prospettico randomizzato che ha confrontato una stecca morbida in neoprene "pronta per l'uso" con una stecca termoformata su misura ha rilevato che la stecca in neoprene era mediamente più confortevole, meno costosa e altrettanto efficace (Becker SJE et al, Osteoarthr Cartil 2013).



Fig 29: Esempio di ortesi conformata su misura.

Vari studi mostrano che l'uso di ortesi è significativamente correlato a un tasso ridotto di interventi chirurgici (Bertozzi L et al, *Disabil Rehabil* 2015) e a un modesto miglioramento del dolore (Weiss S et al, *J Hand Ther* 2000; Weiss S et al, *J Hand Ther* 2004). Attualmente, le linee guida internazionali raccomandano formalmente la fornitura di ortesi per l'osteoartrite del pollice (Kloppenburger M et al, *Ann Rheum Dis* 2019).

3.4.4. Trattamenti conservativi

La letteratura è generalmente favorevole riguardo agli esiti della terapia nell'osteoartrite del pollice, sebbene alcuni studi riportino solo effetti modesti. O'Brien e colleghi (O'Brien VH et al., *J Hand Ther* 2013) hanno condotto una revisione retrospettiva del loro approccio alla stabilità dinamica, riscontrando una riduzione del dolore del 15% e un miglioramento nella funzionalità nel loro campione. Un trial controllato randomizzato che ha confrontato 180 pazienti trattati con educazione, dispositivi ausiliari, ortesi e esercizi rispetto a quelli trattati solo con educazione ha mostrato una lieve, ma non significativa, tendenza a ritardare e ridurre la necessità di interventi chirurgici nel gruppo di trattamento (Gravas EMH et al, *RMD Open* 2019). Il potenziamento del primo muscolo interosseo dorsale potrebbe aiutare ad alleviare i sintomi dell'artrite del pollice. McGee e colleghi (McGee C et al, *J Hand Ther* 2015) hanno scoperto che la contrazione del primo muscolo interosseo dorsale riduceva anatomicamente l'articolazione CMC sotto fluoroscopia. L'analisi del movimento ha rilevato che il primo muscolo interosseo dorsale è importante per la stabilizzazione dell'articolazione CMC e suggerisce che il potenziamento di questo muscolo potrebbe alleviare il dolore (McGee C et al, *J Hand Ther* 2015).

3.4.5 Iniezione intra-articolare di corticosteroidi

Le iniezioni di corticosteroidi intra-articolari rappresentano un trattamento fondamentale per l'artrite sintomatica. Sebbene il meccanismo d'azione non sia completamente compreso, si ritiene che gli steroidi riducano l'infiammazione e le citochine infiammatorie. Sono disponibili diverse formulazioni, tra cui triamcinolone, desametasone e betametasona, senza evidenze di superiorità comprovata. Il triamcinolone è uno steroide relativamente insolubile, il che, teoricamente, potrebbe aumentarne la durata d'azione, mentre il desametasone e il betametasona sono più solubili e meno inclini a causare atrofia del tessuto adiposo sottocutaneo o depigmentazione della pelle (Rastogi AK et al., *Am J Radiol* 2016). La tecnica di iniezione dipende dal medico, ma l'autore preferisce eseguire l'iniezione mediante palpazione diretta dell'articolazione CMC del pollice utilizzando una tecnica sterile. Il pollice viene mantenuto sotto leggera distrazione dalla mano non dominante del chirurgo per consentire l'ingresso nell'articolazione artritica. Viene utilizzato un ago da 25 gauge per entrare nell'articolazione, inclinando distalmente l'ago proprio alla base del metacarpo per accedere alla capsula. Si presta attenzione a non colpire l'osso per rendere l'iniezione meno dolorosa. Alcuni autori preferiscono utilizzare una combinazione di desametasone 4 mg/mL (0,7 mL) e lidocaina 1% (0,3 mL) ed alcuni preferiscono l'iniezione guidata da ultrasuoni per migliorare l'accuratezza del posizionamento del farmaco nell'articolazione. Le percentuali di efficacia variano ampiamente nella letteratura (Heyworth BE et al, *J Hand Surg Am* 2008). Uno studio prospettico di Day e colleghi (Day C et al, *J Hand Surg Am* 2004), che ha combinato steccaggio e iniezioni di steroidi, ha trovato un affidabile sollievo dal dolore a lungo termine di circa 23 mesi in media. Il sollievo dai sintomi è stato più affidabile nei pazienti con malattia in fase iniziale di Eaton, con un 80% di successo, mentre solo il 35% ha riportato sollievo duraturo nei pazienti in fase avanzata di Eaton. Swigart e colleghi (Swigart CR et al., *J Hand Surg Am* 1999) hanno riscontrato risultati migliori nei pazienti con gradi iniziali, con il 75% degli stadi 1 o 2 di Eaton e solo il 50% degli stadi 3 o 4 di Eaton che ha mostrato un miglioramento sostenuto dei sintomi a 6 mesi di follow-up. Un rapporto recente ha osservato che le iniezioni di steroidi sono riportate come efficaci per un periodo di tempo compreso tra 3 e 6 mesi, con un intervallo medio di 14 mesi tra le iniezioni (Ostergaard PJ et al, *J Hand Surg* 2020).

3.4.6 Iniezione intra-articolare di Acido Ialuronico

L'acido ialuronico è un componente naturale del liquido sinoviale che funge da lubrificante e ammortizzatore d'urto, contribuendo alla ritenzione dei fluidi, specialmente nelle

articolazioni sottoposte a carico. L'acido ialuronico è ridotto nelle articolazioni dei pazienti affetti da artrite; pertanto, si sostiene che l'iniezione di acido ialuronico possa alleviare il dolore e migliorare la funzionalità delle articolazioni artritiche (Koh SH et al., *Medicine (Baltimore)* 2019). L'iniezione di acido ialuronico può ripristinare la viscoelasticità del liquido sinoviale e potrebbe avere un effetto emostatico. Uno studio controllato randomizzato prospettico condotto da Heyworth e colleghi (Heyworth BE et al, *J Hand Surg Am* 2008) ha confrontato le iniezioni di steroidi, acido ialuronico e placebo, riscontrando nessuna differenza significativa tra i tre gruppi; tuttavia, il sollievo dal dolore è stato duraturo, e gli investigatori raccomandano che l'acido ialuronico possa essere considerato per l'artrite basale del pollice. Una recente revisione sistematica sull'uso dell'acido ialuronico per l'artrite del pollice ha evidenziato che la maggior parte degli studi ha mostrato risultati migliori con l'iniezione di acido ialuronico in termini di funzionalità e movimento articolare, mentre quelle con iniezione di steroidi mostrano un'efficacia maggiore sul dolore. La revisione ha anche rilevato che l'azione delle iniezioni di steroidi è più rapida ma di durata più breve, mentre l'acido ialuronico richiede più tempo per ottenere un beneficio terapeutico ma presenta una durata maggiore (Papalia R et al, *J Biol Regul Homeost Agents* 2017).

3.4.7 Terapia autologa

Il plasma ricco di piastrine (PRP) è ottenuto dal sangue autologo, centrifugato per ottenere fattori di crescita concentrati e mediatori infiammatori, tra cui il fattore di crescita derivato dalle piastrine, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare e le interleuchine (IL). L'ipotesi è che l'iniezione concentrata di questi potenti modulatori infiammatori possa migliorare il dolore e possibilmente la salute della cartilagine. Studi sperimentali dimostrano effetti protettivi contro l'apoptosi dei condrociti, la proliferazione delle cellule staminali e il potenziale per la guarigione dei difetti cartilaginei. Malahias e colleghi (Malahias MA et al., *Cartilage* 2021) hanno condotto uno studio randomizzato confrontando l'iniezione di PRP guidata da ultrasuoni con quella di steroidi, riscontrando risultati significativamente migliori riguardo alla scala visiva del dolore, ai punteggi del Quick Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand e alla soddisfazione dei pazienti nel gruppo PRP, sebbene non sembra che i pazienti siano stati accecati rispetto all'intervento. A oggi, sono stati pubblicati solo tre studi riguardanti l'uso del PRP nel pollice (Tenti S et al., *Front Pharmacol* 2021).

L'utilizzo di cellule staminali mesenchimali autologhe è in fase di studio per il trattamento dell'osteoartrite. L'iniezione di cellule staminali nell'osteoartrite potrebbe fornire supporto meccanico nell'articolazione e stimolare la riparazione e la rigenerazione della cartilagine;

tuttavia, le evidenze attuali sono ancora limitate (Song Y et al., J Orthop Transl 2020). Tenti e colleghi (Tenti S et al., Front Pharmacol 2021) hanno trovato due studi clinici in corso, senza risultati pubblicati fino ad oggi. Bohr e colleghi (Bohr S et al., Hand Surg 2021) segnalano l'uso di un prelievo di grasso autologo, seguito da un trattamento di arricchimento cellulare extracorporeo e iniettato nella prima articolazione CMC, con un miglioramento dei sintomi (Riley N et al., BMJ Open 2019). Attualmente, queste terapie autologhe non sono coperte dalla maggior parte degli assicuratori e i pazienti devono sostenere le spese di tasca propria per l'intervento. Sono necessarie ulteriori evidenze per giustificare il loro utilizzo.

3.4.8 Raccomandazioni

La European League Against Rheumatism (EULAR) ha pubblicato raccomandazioni formali aggiornate per l'osteoartrite (OA) della mano (Kloppenburger M et al., Ann Rheum Dis 2019). Le raccomandazioni di grado A, che offrono il più alto livello di evidenza, includono: offrire educazione, allenamento fisico e dispositivi assistivi a tutti i pazienti; uso a lungo termine di ortesi per il sollievo dei sintomi; preferire agenti topici ai trattamenti sistemici; considerare i FANS topici come prima opzione terapeutica; considerare l'uso di solfato di condroitina; e iniezioni di steroidi, che generalmente non dovrebbero essere utilizzate, ma possono essere considerate per le articolazioni dolenti.

Una revisione sistematica del 2015 dei trial controllati randomizzati riguardanti il trattamento dell'artrite del pollice ha stabilito quanto segue: (1) la terapia manuale può ridurre il dolore, ma l'evidenza è inconcludente; (2) sia le iniezioni di steroidi che quelle di acido ialuronico forniscono sollievo dal dolore, con alcuni ricercatori che trovano l'acido ialuronico più efficace; (3) le ortesi riducono il dolore senza effetti sulla forza funzionale o sulla destrezza; e (4) mancano evidenze di alto livello riguardo agli effetti degli analgesici e dell'educazione del paziente (Spaans AJ et al., J Hand Surg Am 2015).

Il protocollo di trattamento preferito dall'autore (Farinelli L et al., Biomedicine 2023) per l'artrite del pollice è il seguente: la consultazione iniziale per un paziente con una lamentele di artralgia CMC è solitamente un appuntamento lungo. Vengono effettuate radiografie di base per valutare il grado di artrite e/o sublussazione articolare e per escludere patologie articolari adiacenti. Viene fornita educazione riguardo alla diagnosi e alla patofisiologia dell'artrite del pollice. Si discute a lungo delle opzioni di gestione, come descritto in precedenza. Se desiderato, viene offerta una ortesi e fornita al paziente. È proposta una terapia per l'istruzione agli esercizi, il potenziamento della forza della muscolatura tenare, misure per evitare l'iperestensione dell'MCP e ulteriori educazioni da parte del terapeuta.

Viene fornita una panoramica sull'uso di FANS topici, e la crema di diclofenac allo 1% è proposta a tutti come trattamento di prima linea. Si discute brevemente di integratori, rimedi erboristici, cambiamenti dietetici e modifiche dello stile di vita. Viene effettuata una breve discussione introduttiva sulla chirurgia, in modo che il paziente sia a conoscenza delle varie procedure chirurgiche, ma gli autori preferiscono trattare in modo non chirurgico per almeno sei mesi. Se i sintomi persistono nei follow-up, si discutono le iniezioni di acido ialuronico (l'autore non preferisce utilizzare gli steroidi, seppur raccomandati). Si preferisce iniettare non prima di ogni 3-6 mesi e generalmente si limitano i pazienti a 2-3 iniezioni all'anno. Successivamente si propone al paziente il trattamento sperimentale autologo con tessuto adiposo. Poiché il dolore è il principale fattore determinante per decidere quando intervenire chirurgicamente, è saggio responsabilizzare il paziente affinché sia lui a decidere quando procedere con l'intervento, specialmente in assenza di lassità/ipertensione dell'MCP.

3.5 TRATTAMENTO CHIRURGICO

I trattamenti chirurgici sono consigliati per i pazienti che non rispondono alle terapie conservative e presentano dolore persistente.

3.5.1 Tecniche di conservazione dell'articolazione

Le tecniche di conservazione dell'articolazione (Spielman AF et al, Hand Clin 2022), come l'osteotomia del metacarpo basale del pollice (A), la ricostruzione del legamento volare (B), l'artroscopia dell'articolazione CMC e la sinoviectomia (C), e la denervazione dell'articolazione (D), sono utili nel trattamento dell'artrite CMC di stadio precoce di Eaton 1 e 2 (**Figura 30**). Queste tecniche consentono di ridurre il dolore preservando al contempo la biomeccanica articolare. Esse possono fungere da "ponte" per fornire sollievo dal dolore ai pazienti più giovani affetti da osteoartrite CMC precoce in cui opzioni chirurgiche più invasive possono essere controindicati.

L'Osteotomia di addizione-sottrazione del primo metacarpo è stata descritta per la prima volta da Wilson (Wilson JN, Br J Surg 1973), quest'intervento mira a correggere l'adduzione del primo metacarpo attraverso una osteotomia metafisaria prossimale di sottrazione che consente un'estensione e un'abduzione del metacarpo. Riduce le sollecitazioni sul lato anteromediale dell'articolazione, indirizzandole verso il lato posterolaterale, alleviando il dolore associato a un'eccessiva pressione articolare e proteggendo l'articolazione dal processo degenerativo. Dopo sei anni di follow-up, Hobby

et al. hanno riscontrato che il 74% dei pazienti era ancora privo di sintomi (Hobby JL et al., J Bone Joint Surg Br 1998).

La ricostruzione dei legamenti per stabilizzare l'articolazione trapeziometacarpale è un'opzione chirurgica per l'artrite precoce (stadio 1 Eaton), quando l'articolazione è dolorosa, instabile e priva di condropatia. L'assenza di condropatia è fondamentale. L'artroscopia esplorativa è essenziale per garantire che le superfici cartilaginee non siano danneggiate, poiché questo è spesso difficile da discernere tramite radiografie. La tecnica Eaton-Littler, che utilizza un lembo del tendine del flessore radiale del carpo, è stata studiata e riportata maggiormente. Questa ricostruzione produce sollievo dal dolore e riduce il tasso di deterioramento dell'osteoartrite (Athlani L, Hand Surg Rehabil 2021).

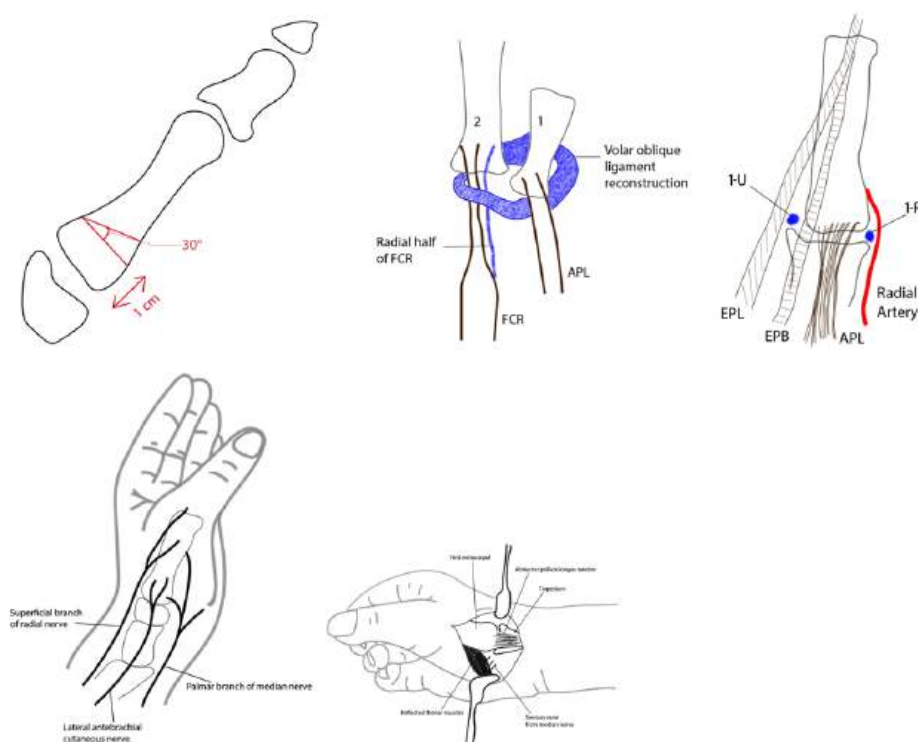


Fig. 30 (A) Osteotomia di estensione del metacarpo. Viene eseguita un'osteotomia a cuneo chiuso di 30° 1 cm al di sopra dell'articolazione carpometacarpale (CMC) per alleviare il carico sulla porzione volare dell'articolazione. (B) Ricostruzione del legamento obliquo volare. La striscia prelevata dal tendine del flessore radiale del carpo (FCR) rimane attaccata distalmente e viene guidata attraverso la base del metacarpo da palmare a dorsale, passando in profondità sotto l'inserzione del muscolo abduttore del pollice lungo (APL) e poi ripiegandosi attorno al FCR residuo per essere fissata sul lato radiale dell'articolazione. (C) Debridement artroscopico. La figura mostra i portali utilizzati per il debridement artroscopico dell'articolazione CMC. Il portale 1-R (radiale) è posizionato appena radialmente al tendine dell'APL. Questo portale viene utilizzato per valutare il legamento replica del dorso (DRL), il legamento obliquo palmare (POL) e il legamento collaterale ulnare (UCL). Il portale 1-U (ulnare) è creato appena ulnarmente al tendine dell'extensor pollicis longus (EPL) per consentire la valutazione del legamento volare a becco e dell'UCL. EPB, estensore del pollice breve. (D) Innervazione della prima articolazione carpometacarpale. (E) Esposizione chirurgica della prima ossa metacarpale, del trapezio, del tendine dell'abduttore del pollice lungo e dei muscoli thenar riflessi dalla parte volare e ulnare del trapezio e della base del metacarpo, mostrando le estremità prossimalmente sezionate dei rami sensoriali del ramo thenar del nervo mediano. In realtà, questi rami non sono visibili durante l'operazione; tuttavia, la loro presenza è stata esagerata dall'artista per enfatizzarne la posizione.

Se il trattamento conservativo fallisce, è difficile proporre un intervento chirurgico che sacrifichi l'articolazione in un adulto più giovane affetto da artrite basale precoce che causa dolore considerevole, ma che presenta solo modifiche moderate alle radiografie e una buona mobilità del pollice. La denervazione selettiva dell'articolazione TMC mira a fornire sollievo dal dolore senza compromettere la forza e la mobilità del pollice, specialmente se il lavoro del paziente richiede prese attive. In questa procedura, tutti i nervi afferenti all'articolazione sono completamente sezionati: i rami superficiali del nervo radiale, il ramo cutaneo palmare del nervo mediano, il nervo cutaneo laterale dell'avambraccio e il ramo ricorrente del nervo mediano. Questa procedura è ben tollerata, con un breve recupero postoperatorio e risultati rapidi. Tuttavia, la sua efficacia è di breve durata, con la ricomparsa dei sintomi in un lasso di tempo imprevedibile (Lorea P et al., Chir Main 2002).

3.5.2 Artrodesi

L'artrodesi (**Figura 31**) è una tecnica affidabile con indicazioni per popolazioni di pazienti specifiche: tipicamente individui più giovani e ad alta richiesta. Con una fusione di successo, i pazienti presentano un'articolazione basale priva di dolore, con un miglioramento caratteristico della forza di presa e di pinzamento, nonché mantenimento di un arco funzionale di movimento. Grazie a questa combinazione di risultati, i pazienti si mostrano soddisfatti e riportano punteggi di esito auto-riferiti migliorati. Le indicazioni per l'artrodesi della trapeziometacarpale (TM) includono pazienti con malattia di Eaton di stadio II o III che non hanno risposto a interventi non chirurgici; inoltre, il paziente dovrebbe essere giovane e avere bisogno di preservare la forza di presa e la stabilità della propria articolazione TM in relazione ai requisiti occupazionali. Il pollice verrà posizionato per la fusione in opposizione, in modo da poter essere utilizzato per le prese di pinzamento. La fissazione può avvenire tramite fili K, viti di compressione o una placca.

Esistono diverse controindicazioni relative all'esecuzione di un'artrodesi. Innanzitutto, la presenza di artrite STT o pan-trapeziale rappresenta una controindicazione relativa. In secondo luogo, una diagnosi sottostante di artrite infiammatoria, con il potenziale di aggravare un'artrite pan-trapeziale, costituisce altresì una controindicazione relativa all'esecuzione di un'artrodesi TM. In terzo luogo, dopo la fusione dell'articolazione TM, il movimento dell'articolazione metacarpofalangea (MCP) del pollice è fondamentale per mantenere la mobilità del pollice. Se l'articolazione MCP non è stabile e dolorosa, e quindi potrebbe richiedere una propria artrodesi, allora l'artrodesi TM non dovrebbe essere eseguita; questo deve essere valutato preoperatoriamente. Infine, l'artrodesi TM non

dovrebbe essere eseguita in pazienti che non accetterebbero di avere un'articolazione TM fissa, inclusa l'incapacità di posizionare la mano piatta su un tavolo, e in coloro che non possono tollerare un'immobilizzazione prolungata affinché possa avvenire la fusione ossea (London DA and Stern PJ, Hand Clin 2022). Inoltre, il 25% dei pazienti continua a soffrire di dolore, il che, insieme alla perdita di mobilità, aggrava effettivamente il deterioramento funzionale. La principale complicanza è l'assenza di unione, con un tasso compreso tra il 10% e il 30%. È importante considerare che le articolazioni sopra e sotto quelle fuse verranno caricate maggiormente, specialmente nei lavoratori manuali, con un rischio di deterioramento precoce delle superfici articolari (Mureau MA et al., J Hand Surg Am 2001). Insieme a queste considerazioni, ciò significa che l'artrodesi TM è ora considerata un'opzione di salvataggio piuttosto che una prima scelta chirurgica.



Fig 31: Preparazione delle superfici ossee (sinistra) e risultato radiografico (destra)

3.5.3 Trapeziectomia

Gervis (Gervis WH, Postgrad Med J 1948) è stato il primo a descrivere la trapeziectomia isolata completa (**Figura 32**). Per compensare il progressivo abbassamento sistematico del primo metacarpo, sono state proposte diverse tecniche chirurgiche per riempire il vuoto trapeziale, prevenendo l'elevazione prossimale del metacarpo, che potrebbe aggravare l'iperestensione dell'articolazione metacarpofalangea (MCP) e provocare una maggiore perdita di forza di pinzamento. Attualmente, nella maggior parte dei casi, viene interposto un innesto tendineo autologo (flessore radiale del carpo, palmaris longus, abditore del pollice lungo) o un innesto osteocondrale (cartilagine costale) nel sito di trapeziectomia, oppure il sito di trapeziectomia viene lasciato vuoto in modo di riempirsi di ematoma (Cohen-Shohet R and Morgan A, Hand Clin 2022).

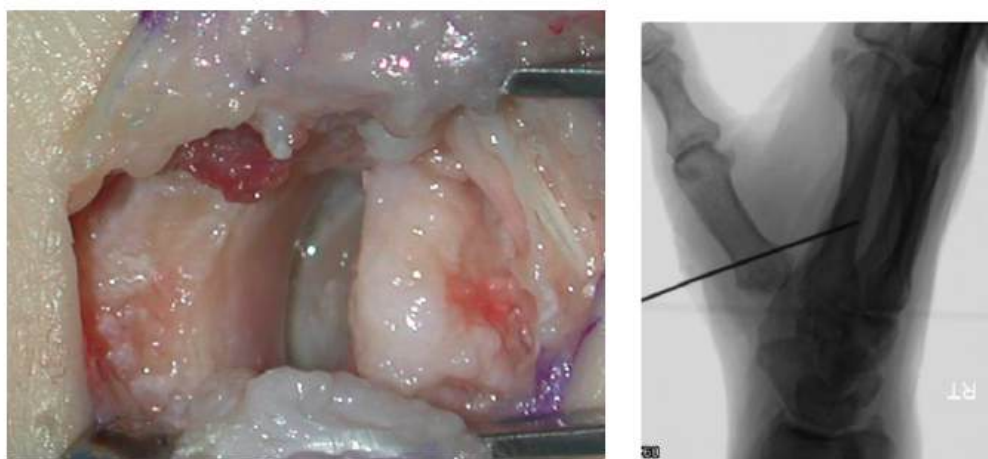


Fig. 31 (A) L'articolazione trapeziometacarpale (TM) viene raggiunta e viene eseguita la trapeziectomia. (B) Viene ora eseguita l'artroplastica da distrazione utilizzando un singolo filo di Kirschner. Sotto guida fluoroscopica diretta, il filo viene inserito alla base del metacarpo del pollice e orientato distalmente.

Sono stati provati diversi tipi di innesti sintetici – silico, polimero sintetico, poliuretano, acido polilattico, matrice acellulare – ma la maggior parte di essi non è più utilizzata a causa di numerose complicazioni, in particolare dislocazione dell'impianto e reazioni infiammatorie locali (Dellestable A et al, Orthop Traumatol Surg Res 2022). Gli impianti in pirocarbon (Figura 32) sono stati utilizzati più recentemente. I risultati sembrano essere soddisfacenti, senza reazioni infiammatorie e solo alcuni casi di instabilità (Bellemere P, Hand Surg 2021).



Fig. 31 Spaziatori da interposizione in pirocarbonio

3.5.4 Trapeziectomia con artroplastica del legamento carpometacarpale del pollice

Questa tecnica è indicata per i pazienti negli stadi III-IV secondo Eaton, per coloro che presentano concomitante artrite scafotrapeziale, per i pazienti anziani o per quelli a bassa richiesta funzionale. La trapeziectomia da sola elimina il contatto osseo carpometacarpale, ma non risolve l'instabilità dovuta alla degenerazione legamentosa tipica dell'articolazione carpometacarpale (CMC). Per questo motivo, la trapeziectomia è solitamente eseguita in combinazione con la Ricostruzione del Legamento e l'Interposizione Tendinea (LRTI). Esistono diverse tecniche di artroplastica per interposizione tendinea (Aziz KT and Ross

PR, Hand Clin 2022) per il trattamento dell'artrosi dell'articolazione trapezio-metarpale. Diverse tecniche di ricostruzione legamentosa o di sospensione plastica sono state sviluppate per stabilizzare il primo metacarpo rispetto al secondo metacarpo, ripristinando il livello del legamento intermetarpale. Eaton e successivamente Burton hanno proposto l'uso di un lembo del tendine del flessore radiale del carpo, Thompson dell'abditore del pollice lungo, Jones del palmaris longus e Atroschi dell'estensore radiale del carpo breve. La tecnica più utilizzata è la ricostruzione legamentosa con interposizione tendinea (LRTI), descritta da Burton e Pelligrini nel 1986 (Matullo KS et al, Hand 2008).

La tecnica implementata da Ceruso (**Figura 32**), che utilizza il tendine dell'abditore del pollice lungo (APL), rappresenta una soluzione ideale. Attraverso le esposizioni radiali, è possibile rimuovere il trapezio, separare il muscolo abditore del pollice lungo e procedere con l'artroplastica in sospensione. Questa tecnica chirurgica è semplice e favorisce una possibile rapida ripresa delle funzioni della mano. Le complicazioni sono estremamente rare. Sebbene questa tecnica offra una forza del pollice inferiore rispetto all'artrodesi, consente un miglior intervallo di movimento, sebbene richieda un periodo di riabilitazione più lungo (Caggiari G et al., Orthop Rev, 2021).



Fig. 32. Attraverso la stessa incisione della trapeziectomia, una parte del tendine dell'abditore del pollice lungo (APL) viene prelevata e ruotata attorno al tendine del flessore radiale del carpo (FRC) per eseguire l'artroplastica legamentosa.

3.5.5 Trapeziectomia con Artroplastica di Impianto

L'artroplastica con impianto (Bellemere P and Lussiez B, Hand Clin 2022) (**Figura 33**) rappresenta un'opzione alternativa alla trapeziectomia (con o senza ricostruzione legamentosa) per il trattamento dell'artrite dell'articolazione carpometarpale (CMC) del pollice. Attualmente, gli impianti per la CMC del pollice più comuni sono una protesi totale della CMC (TCP) o un impianto in pirocarbonio. Le indicazioni cliniche per l'uso della TCP includono: età, livello di dolore e sua tolleranza, grado di compromissione nelle attività quotidiane (lavoro, sport e hobby), diminuzione della forza, livello di attività (basso, medio e alto), perdita di autonomia per le persone anziane e diminuzione della mobilità. In rari casi, motivi estetici (deformazione a forma di Z).

Esistono controindicazioni tecniche: bassa altezza del trapezio, qualità ossea, gradazione di Eaton III o alcuni IV per pazienti con un livello di domanda funzionale medio-alta. Cambiamenti degenerativi discreti nell'articolazione scafotrapeziale non sembrano costituire una controindicazione all'uso della TCP. Il tasso di sopravvivenza delle principali tipologie di attuali protesi TM è simile a quello delle protesi delle grandi articolazioni. Gli impianti in pirocarbonio, per le loro notevoli proprietà meccaniche (elasticità, densità, rugosità, durezza e resistenza all'usura), e per la loro biocompatibilità, sono stati proposti come alternativa agli impianti in silicone e ad altri impianti sintetici, con l'obiettivo di preservare la lunghezza del pollice per consentire un movimento e una funzionalità normali senza dolore.



Fig. 33: (A) Protesi a doppia mobilità (Touch, Keri Medical); (B) Controllo radiografico; (C) Impianti di emiartroplastica in pirocarbonio; (D) Controllo radiografico; (E) Impianti interposti in pirocarbonio.

Il fissaggio del peduncolo nel corpo del metacarpo avviene mediante contatto ravvicinato (press-fit) poiché il pirocarbonio non può essere attaccato direttamente all'osso a causa della sua mancanza di osteointegrazione. Gli impianti interposti in pirocarbonio sono spaziatori piccoli e non vincolati, che articolano tra due superfici ossee; possono essere interposti dopo una trapeziectomia totale o parziale o utilizzati come interfaccia nella cavità dell'articolazione CMC. Questi impianti offrono risultati funzionali promettenti a medio e lungo termine che sembrano almeno identici a quelli di altre tecniche chirurgiche

convenzionali. Preservano la lunghezza del pollice e hanno consentito di superare complicazioni (usura, detriti, infiammazione, reazione allergica, allentamento meccanico, frattura dell'impianto e massivo riassorbimento osseo in reazione a corpi estranei), relative al materiale di base degli impianti in silicone o dei materiali in metallo o polietilene delle protesi totali. I pazienti giovani e attivi con un grado precoce di osteoartrite CMC sintomatica possono essere indicati per impianti in pirocarbonio, specialmente quelli più sottili. Le alternative convenzionali sono sempre possibili in caso di fallimento degli impianti in pirocarbonio.

CAPITOLO 4

TESSUTO ADIPOSO

4.1 TESSUTO ADIPOSO

4.1.1 Morfologia e fisiologia cellulare

Il tessuto adiposo rappresenta un organo endocrino essenziale ed estremamente dinamico, con ruoli fondamentali nel metabolismo, nella riproduzione, nella funzione cardiovascolare e nell'immunità (**Figura 34**). Il tessuto adiposo secerne numerosi fattori solubili con effetti localizzati e sistemici (Prins JB, Best Pract Res Clin Endocrinol Metabo 2002) che influenzano direttamente altri sistemi del corpo.

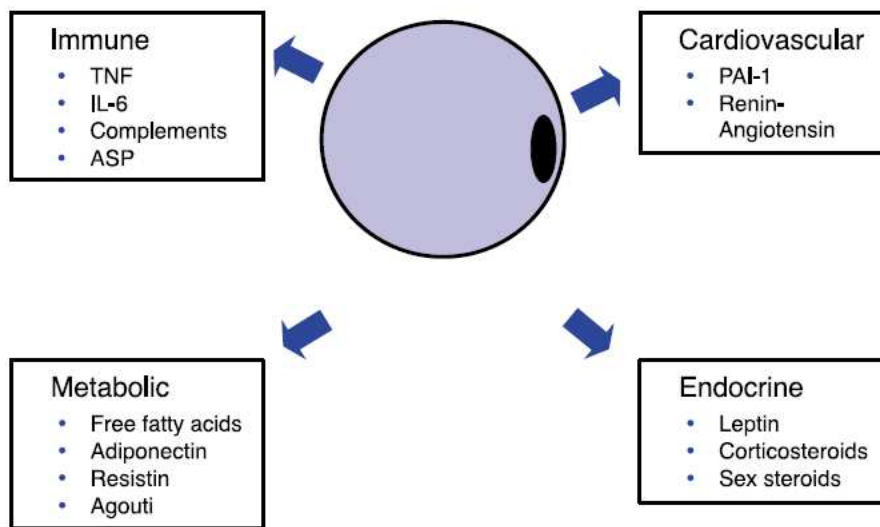


Fig. 34: Diagramma dei maggiori fattori endocrini prodotti dalle cellule adipose

Lo stato nutrizionale governa inevitabilmente la funzione endocrina del tessuto adiposo, strettamente associata all'energia che può immagazzinare. Questa relazione comporta un aumento dei lipidi, immagazzinati nelle cellule grazie alla lipogenesi, e un incremento delle cellule adipose con preadipociti in replicazione e differenziazione (Prins JB and O'Rahilly S, Clin Sci 1997). Il tessuto adiposo è classificato in tessuto adiposo bianco (WAT) e tessuto adiposo bruno (BAT). Gli adipociti bianchi sono uniloculare (**Figura 35**) e permettono agli acidi grassi di accumularsi dopo un pasto e tra i pasti, distribuendo carburante sotto forma di acidi grassi all'organismo.

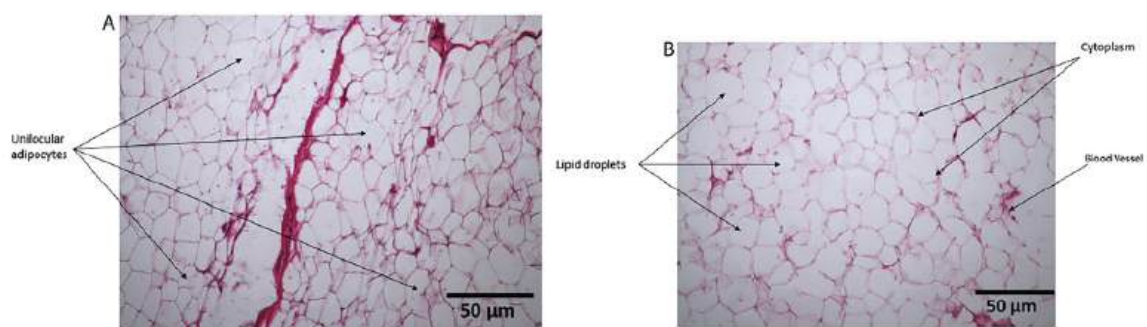


Fig. 35: Histological images of white adipocytes. Unilocular adipocyte is histologically characterized by the presence of a single large lipid vacuole within each adipocyte. These adipose cells are rounded, with the nucleus pushed

to the cell periphery due to the presence of the large lipid accumulation.

La presenza di grasso negli esseri umani adulti è principalmente attribuibile al tessuto adiposo bianco, che fornisce omeostasi energetica essenziale, segnalazione insulinica e funzioni endocrine (Rosen ED and Spiegelman BM, Nature 2006; Sarjeant K and Stephens JM, Nat Rev Rheumatol 2012). Gli adipociti bruni sono multiloculare e ricchi di mitocondri caratteristici di grandi dimensioni (**Figura 36**) e contengono la proteina UCP1, espressa unicamente in queste cellule, che attiva la funzione disaccoppiata della fosforilazione ossidativa, permettendo la produzione di calore nella cellula (Cinti S et al, Biol Cell 1989; Sbarbati A et al., Acta Anat 1987).

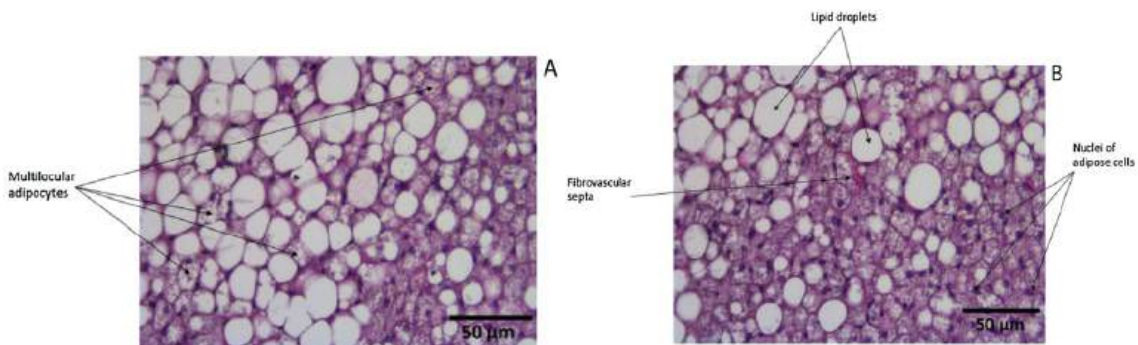


Fig. 36: Histological images of brown adipocytes. Multilocular adipocytes are histologically characterized by the presence of multiple small lipid vacuoles within each adipocyte. These adipose cells contain numerous lipid droplets of variable sizes, giving them a multilocular appearance. This type of adiposity is typical of brown adipose tissue, which functions in thermogenesis and expends energy to generate heat

Il tessuto adiposo bruno è principalmente responsabile della termogenesi non brivido. Gli adipociti bruni e bianchi differiscono morfologicamente, e tali differenze possono essere analizzate tramite microscopio ottico o elettronico osservando cellule adipose bianche sferiche con un diametro medio inferiore a 10 µm che può salire fino a 100 µm (Laforest S et al., Histochem Cell Biol 2018). Gli organuli delle cellule adipose bianche sono disposti in maniera confinata a causa delle goccioline lipidiche uniloculare localizzate nel citosol. Il nucleo è comunemente compresso all'interno della membrana plasmatica e del grasso. I mitocondri sono scarsamente distribuiti e altri organuli cellulari, come l'apparato di Golgi e il reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, sono presenti (**Figura 37**).

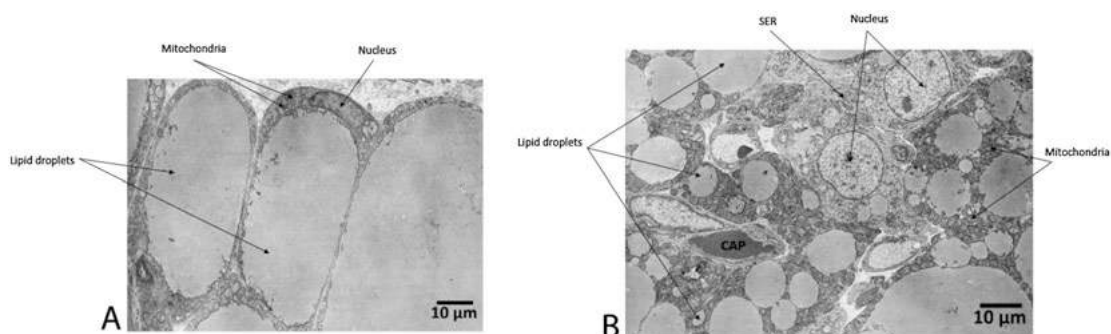


Fig. 37: Electron microscopy images of unilocular adipocytes (A) and multilocular adipocytes (B).

Il tessuto adiposo bruno è innervato dal sistema nervoso simpatico ed è ben vascolarizzato. Gli adipociti bruni si caratterizzano per una forma ellissoidale tra 15 e 50 μm contenenti goccioline lipidiche multiloculare. Il nucleo cellulare è centralizzato all'interno del citoplasma e gli organuli classici sono presenti. Gli adipociti bruni si distinguono per una distribuzione ampia di mitocondri ricchi di creste (**Figura 37**) e un'espressione unica del trasportatore protonico UCP1 (Figura 38) (Cannon B and Nedergaard J, Cell Metabol 2017; Kalinovich AV et al., Biochimie 2017; Cannon B and Nedergaard J, Physiol Rev 2004). Recentemente, indagini hanno riportato la presenza di UCP1 nel tessuto adiposo bianco (Barbatelli G et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 2010), probabilmente dovuta alla trans-differenziazione delle cellule adipose bianche in adipociti simili a quelli bruni (brown-in-white; cellule adipose brite) come conseguenza di stimolazioni al freddo o β -adrenergiche (Rosenwald M and Wolfrum C, Adipocytes 2014).

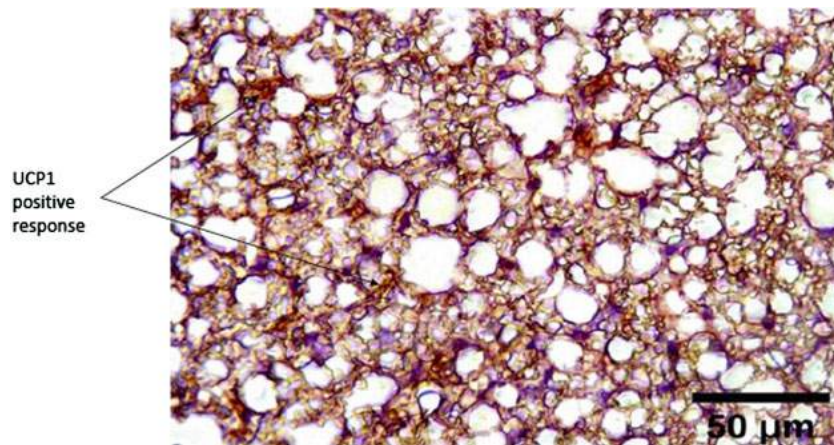


Fig. 38: Immunostaining images for UCP1. UCP1 is predominantly expressed in brown adipose tissue, particularly, in the inner membranes of mitochondria that plays a key role in thermogenesis by promoting the uncoupling of oxidative phosphorylation from ATP synthesis, resulting in heat production

Il tessuto adiposo contiene vari tipi cellulari inclusi cellule endoteliali, cellule del sangue, fibroblasti, periciti, preadipociti, macrofagi e altre cellule immunitarie (Cinti S, Proc Nutr Soc 2001) con una presenza predominante di adipociti maturi. Il tessuto adiposo bianco è considerato un organo capace di mediare l'assorbimento di glucosio stimolato dall'insulina, un processo fondamentale mediato da un percorso di segnale. In questo contesto, l'insulina innesca una cascata che porta alla traslocazione del trasportatore 4 del glucosio (GLUT4) sulla membrana plasmatica, consentendo così un aumento dell'afflusso di glucosio (Sivitz WI et al., Nature 1989). Quando stimolati dall'insulina, gli adipociti bruni non assimilano quantità significative di glucosio, ma rispondono prontamente al sistema nervoso simpatico, e l'assunzione di glucosio insulino-indipendente può essere provocata dalla

norepinefrina (Shackney SE and Joel CD, J Biol Chem 1966). Inoltre, gli adipociti bruni e bianchi immagazzinano e metabolizzano i lipidi in modo diverso. Gli adipociti bianchi accumulano trigliceridi derivati dai nutrienti e successivamente li rilasciano tramite lipolisi durante i periodi di digiuno. Gli adipociti bruni, d'altra parte, ossidano le riserve lipidiche tramite un percorso di produzione di calore con l'UCP1 come elemento predominante, grazie alla sua alta espressione negli adipociti bruni e al suo ruolo chiave nel permettere al tessuto adiposo bruno di generare calore adattativo. Studi condotti su topi knockout hanno chiaramente rivelato il ruolo dell'UCP1, mostrando l'incapacità dei topi privi di UCP1 di resistere a esposizioni al freddo prolungate (Golozoubova V et al., FASEB J 2001). Temperature sotto la termo-neutralità attiveranno questo percorso, stimolando il sistema nervoso simpatico verso il rilascio di norepinefrina che utilizza i recettori β -adrenergici per attivare fermamente la termogenesi (Bachman ES et al., Science 2002). Il tessuto adiposo bianco è ampiamente distribuito in tutto il corpo nella regione sottocutanea, negli organi, nella cavità addominale viscerale e in diversi muscoli. La funzione primaria del tessuto adiposo è immagazzinare e rilasciare grassi in risposta all'equilibrio energetico. Il tessuto adiposo serve anche funzioni immunitarie, endocrine, rigenerative, meccaniche e termiche (Trayhurn P and Wood IS, Br J Nutr 2004; Walocko FM et al., J Am Acad Dermatol 2018; Sastourné-Arrey Q et al., Nat Commun 2023; Dragoo JL et al., Cart Joint Preserv 2021; Fontanella CG et al., PRO 2022; Trayhurn P, Acta Physiol Scand 2005).

4.1.2 Anatomia del tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è localizzato in vari distretti anatomici sia nei roditori sia negli esseri umani. Il tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) si trova sotto la pelle e rappresenta circa l'80% del grasso corporeo totale, localizzandosi principalmente nella parte superiore (grasso addominale e sottoscapolare) e inferiore del corpo (grasso gluteale e femorale). Il grasso sottocutaneo della parte superiore del corpo comprende strati superficiali e profondi separati dalla fascia di Scarpa. Il grasso superficiale ha una consistenza compatta e spessa con meno attività metabolica rispetto al grasso profondo. Il grasso sottocutaneo della parte inferiore del corpo contiene principalmente tessuto adiposo situato nelle regioni glutea e femorale. Il tessuto adiposo intra-addominale include il tessuto adiposo viscerale (VAT) situato attorno agli organi digestivi (mesenterico e omentale) e al deposito retroperitoneale (reni), costituendo circa il 20% del grasso corporeo totale (**Figura 39**). Questi depositi sono eterogenei rispetto ai loro profili molecolari, morfologici e metabolici, mostrando variazioni tra maschi e femmine con funzioni metaboliche del tessuto adiposo mantenute a una certa misura in ciascun sito. Il sito principale di immagazzinamento energetico

differisce tra le specie, e possiamo osservare l'immagazzinamento energetico intra-addominale in invertebrati, come anfibi e rettili, e l'immagazzinamento energetico addominale e sottocutaneo nei mammiferi (Cinti S, Compr Physiol 2018; Pond CM, Proc Nutr Soc 1992).

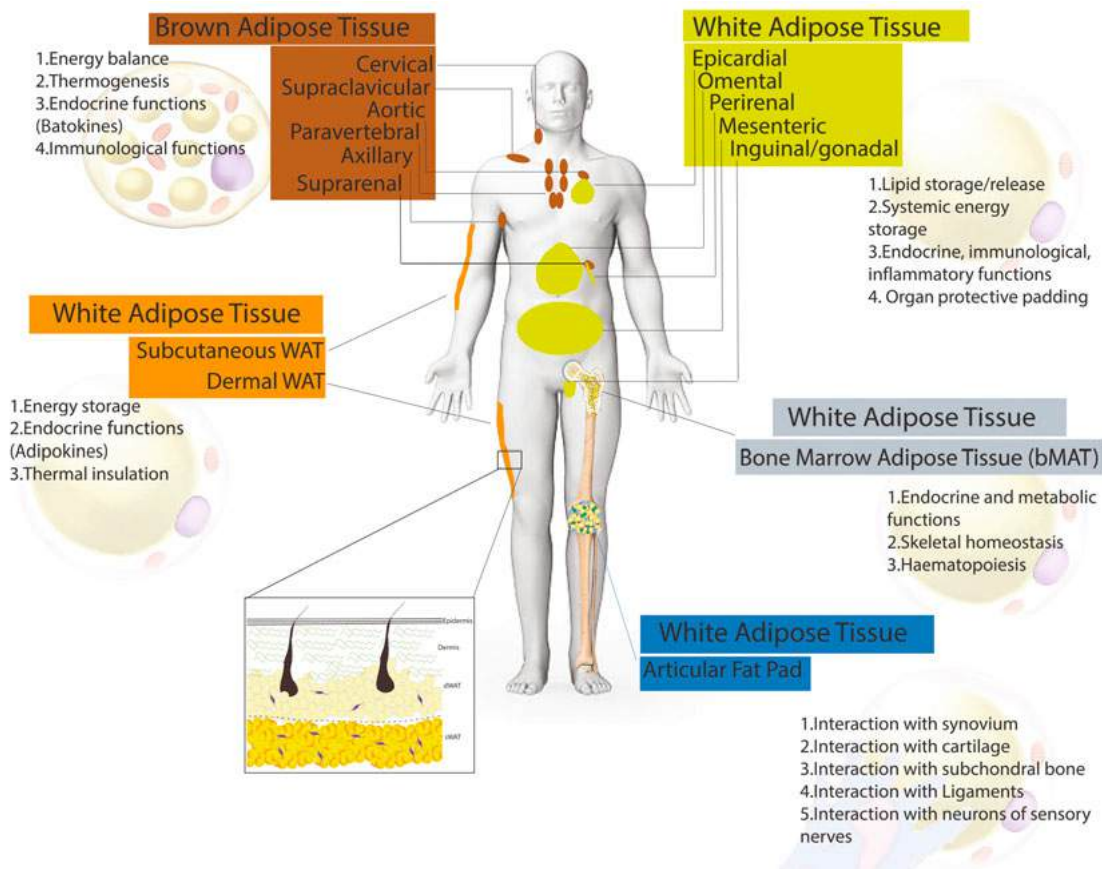


Fig. 39: Localizzazione diversa del tessuto adiposo. L'immagine mostra le diverse posizioni del tessuto adiposo bianco e bruno. Questi diversi tipi di tessuto adiposo svolgono ruoli distinti nel metabolismo e nella funzione fisiologica complessiva. WAT: Tessuto Adiposo Bianco; dWAT: Tessuto Adiposo Bianco Dermico; sWAT: Tessuto Adiposo Bianco Sottocutaneo.

Negli esseri umani, il tessuto adiposo sottocutaneo include depositi craniali, facciali, addominali, femorali e gluteali che apparentemente agiscono come barriere di protezione contro i danni meccanici e la perdita di calore. Recentemente, ricerche hanno riportato che l'isolamento è specificamente sostenuto dal tessuto adiposo dermico (Alexander CM et al., J Lipid Res 2015). Inoltre, un aumento della tolleranza al glucosio può essere attribuito all'accumulo di grasso gluteo-femorale (Booth AD et al., Adipocytes 2018), negativamente correlato alla resistenza all'insulina (Manolopoulos KN et al., Int J Obes 2010), ma positivamente correlato a una riduzione della calcificazione aortica nelle malattie cardiovascolari. I trigliceridi intra-addominali sono immagazzinati nell'omento e nelle aree retroperitoneali e viscerali, e il tessuto adiposo bianco viscerale protegge gli organi. I tessuti adiposi mesenterici e omentali drenano esclusivamente direttamente nella

circolazione portale; di conseguenza, gli acidi grassi liberi e le citochine proinfiammatorie vengono rilasciati da questi depositi ed accedono al fegato, generando lo sviluppo della steatosi epatica e della resistenza all'insulina (Liu KH et al., *Int J Obes* 2006; Wueest S et al., *Diabetes* 2016). Un eccesso di tessuto adiposo viscerale ha un effetto dannoso sugli organi circostanti. In particolare, il grasso pericardico può causare disfunzione metabolica e bassi livelli di infiammazione, portando al diabete di tipo 2 e a complicanze cardiache (Taguchi R et al., *Atherosclerosis* 2001; Rosito GA et al., *Circulation* 2008). Un eccesso di spessore perirenale e pararenale può anche dare origine a glomerulopatia (Fang Y et al., *J Diabetes Res* 2020) e ipertensione, pertinente alla compressione di strutture a bassa pressione nel seno renale (Ricci MA et al., *J Clin Hypertens* 2018). L'abbondante grasso mesenterico può provocare malattie cardiovascolari (Matsuzawa Y et al., *Obes Res* 1995), morbo di Crohn (Peyrin-Biroulet L et al., *Gut* 2007; Peyrin-Biroulet L et al., *Gut* 2012) e epatosteatosi (Liu KH et al., *J Obes* 2006). Tuttavia, il rapporto individuale di tessuto adiposo sottocutaneo su tessuto adiposo viscerale varia a seconda dell'età, del genere, della nutrizione, dell'omeostasi energetica di depositi specifici e della genetica personale (Bjorndal B et al., *J Obes* 201; Shungin D et al., *Nature* 2015). Un sovraaccumulo di tessuto adiposo sottocutaneo è solitamente osservato in donne obese e può portare a una forma corporea "a pera", ritenuta correlata a un rischio metabolico diminuito per il diabete di tipo 2 e le malattie cardiovascolari. Il tessuto adiposo viscerale è più osservato negli uomini, portando a una forma corporea "a mela", correlata a un rischio metabolico maggiore (Gesta S et al., *Cell* 2007). Gli adipociti bianchi sono il tipo cellulare predominante in questi depositi di grasso, ma adipociti simili a quelli bruni sono talvolta presenti nel tessuto adiposo sottocutaneo e nel tessuto adiposo viscerale umano. I depositi di tessuto adiposo bruno nei neonati umani sono principalmente trovati nelle regioni inter- e sottoscapolare, ascellare e cervicale (Cinti S, Springer, 2007; de Jong JMA et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015). L'attività del tessuto adiposo bruno può aumentare in caso di esposizione al freddo e stimolazione noradrenergica, nonché grazie all'assunzione di farmaci (Giordano A et al., *Nat Rev Drug Discov* 2016) e al digiuno (Migliorini RH et al., *Am J Phys* 1997). La presenza di tessuto adiposo bruno attivo è stata riscontrata nel collo e spalle di neonati e bambini piccoli, funzionando per mantenere la temperatura corporea in ambienti freddi per compensare la mancanza di termogenesi da brivido (Lean ME, *Proc Nutr Soc* 1989). Nel 2009, ampie indagini hanno rivelato, tuttavia, tessuto adiposo bruno metabolicamente attivo nel collo anteriore e/o nella regione toracica negli adulti umani (Cypess AM et al., *N Engl J Med* 2009) e trovato anche nelle aree paracervicale e sopraclavicolare (Van Marken Lichtenbelt WD et al., *N Engl J Med* 2009;

Virtanen KA et al., N J Engl Med 2009). Inoltre, l'accumulo di adipociti simili a quelli bruni nel tessuto adiposo bianco può verificarsi in condizioni ipotermiche insieme a stimoli noradrenergici e numerosi stimoli endocrini (Harms M and Seale P, Nat Med 2013). Questi adipociti simili a quelli bruni sono descritti come adipociti beige o brite (brown in white) (Seale P et al., Nature 2008; Wu J et al., Cell 2012). Gli adipociti beige possiedono una morfologia simile agli adipociti bruni ed esprimono la maggior parte dei geni specifici degli adipociti bruni, come l'UCP1 (Harms M and Seale P, Nat Med 2013; Ussar S et al., Sci Transl Med 2014); comunque, gli adipociti beige e bruni sembrano derivare da diverse popolazioni di precursori embrionali (Seale P et al., Nature 2008). È degno di nota che la letteratura recente ha implementato la nomenclatura anatomica del tessuto adiposo evidenziando le differenze fisiologiche dei depositi adiposi aggiungendo al tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale, altri tre diversi depositi anatomici di tessuto adiposo: tessuto adiposo bianco dermico (dWAT), tessuto adiposo del midollo osseo (bMAT) e tessuto adiposo articolare (AFP) (Zwick RK et al., Cell Metab 2018).

Il tessuto adiposo bianco dermico: il dWAT è emerso nella scienza biomedica come un tessuto adiposo ausiliario nel derma senza una funzione distinta e differente rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo. Differenze evolutive sono viste nel tessuto adiposo bianco dermico rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo. Il pannicolo carnoso separa il tessuto adiposo bianco dermico dal tessuto adiposo sottocutaneo, uno strato di muscolo striato trovato esclusivamente nei roditori e non ben definito negli esseri umani (Driskell RR et al., Exp Dermatol 2014). È, infatti, difficile discernere il tessuto adiposo sottocutaneo dal tessuto adiposo bianco dermico, e indagini sui roditori hanno evidenziato l'importanza di definire queste differenze. Specificamente, il tessuto adiposo bianco dermico e il tessuto adiposo sottocutaneo variano da un punto di vista evolutivo, morfologico, biochimico e funzionale (Chen SX et al., J Invest Dermatol 2019). Il tessuto adiposo bianco dermico umano è anatomicamente definito da coni dermici principalmente situati in prossimità dei follicoli piliferi (Schmidt B and Horsley V, Exp Dermatol 2012). È noto che il tessuto adiposo bianco dermico è correlato a varie funzioni come la formazione di cicatrici, la guarigione delle ferite e la fibrosi cutanea (Rivera-Gonzalez G et al., Cold Spring Harb Perspect Med 2014). Dal punto di vista anatomico, questo "organo adiposo" può essere suddiviso in compartimenti distinti associati ai sistemi pilosebacei, ghiandole sudoripare, e fibroblasti e tessuto connettivo (Segalla L et al., Tissue Cell 2021). Inoltre, sebbene non siamo in grado di separare questi diversi distretti del tessuto adiposo bianco dermico, possiamo speculare su una separazione "funzionale". Si sa che gli adipociti giocano anche un ruolo fondamentale nel processo di guarigione delle ferite coinvolgendo una risposta

infiammatoria. Questo meccanismo è caratterizzato da una conversione intra-adipocitaria e miofibroblastica, che sosterrà le conseguenze fibrotiche della formazione di cicatrici e malattie autoimmuni. Inoltre, il tessuto adiposo bianco dermico è essenziale nel ciclo del follicolo pilifero. Studi hanno riportato che i preadipociti nel tessuto adiposo bianco dermico possono attivare la crescita dei follicoli piliferi (Festa E et al., Cell 2011). Il tessuto adiposo bianco dermico si sviluppa indipendentemente dal tessuto adiposo sottocutaneo, verificandosi contemporaneamente allo sviluppo del follicolo pilifero nella fase embrionale (Wojciechowicz K et al., PLoS One 2013). Il tessuto adiposo bianco dermico può anche proteggere la pelle dalle infezioni batteriche e contribuire alla termoregolazione di tutto il corpo (Alexander CM et al., J Lipid Res 2015).

Tessuto adiposo del midollo osseo: per molti anni, il tessuto adiposo del midollo osseo è stato considerato un riempitivo delle cavità ossee implicato nella transizione del midollo osseo rosso in midollo osseo giallo. Ora è stato associato a varie malattie metaboliche, fragilità ossea e obesità (Meunier P et al., Clin Orthop Relat Res 1971). Il tessuto adiposo del midollo osseo è classificato in due sottotipi: costitutivo e regolato. Il tipo costitutivo è principalmente localizzato nello scheletro distale e contiene adipociti più grandi con scarso potenziale ematopoietico. Il tessuto adiposo del midollo osseo regolato è coinvolto in un'ematopoiesi attiva in siti come la colonna vertebrale e le ossa degli arti prossimali. La funzione esatta del tessuto adiposo del midollo osseo è ancora oggetto di indagine e rimane poco chiara. Per il suo microambiente unico, composto da linee cellulari ematopoietiche e scheletriche, questo tessuto fornisce regolazione del midollo osseo (Piotrowska K and Tarnowski M, Nutrients 2021).

Tessuto adiposo articolare: depositi intra-articolari di tessuto adiposo, noti come cuscinetto adiposo articolare (AFP), sono stati identificati all'interno delle articolazioni sinoviali. Il tessuto adiposo articolare condivide somiglianze strutturali con il tessuto adiposo bianco nel corpo, ma sembra essere regolato da distinti percorsi metabolici. Questa è una localizzazione di tessuto adiposo bianco affascinante e significativa che è stata ampiamente sottovalutata (Labusca L and Zugun-Eloae F, Front Vet Sci 2018). I suoi ruoli promettenti nel mantenere l'omeostasi nelle articolazioni normali rimangono inesplorati. Questo lavoro suggerisce che il tessuto adiposo articolare è un tessuto articolare specializzato che rilascia molecole bioattive implicate nella crescita cellulare, nella matrice extracellulare (ECM) e nella modulazione dell'infiammazione articolare attraverso il rilascio di citochine pro- o anti-infiammatorie oltre a un ruolo biomeccanico e protettivo (Labusca L and Zugun-Eloae F, Front Vet 2018). Il tessuto adiposo articolare è stato descritto in molte articolazioni corporee come l'articolazione del ginocchio (Leese J and Davies DC, J Anat 2020),

dell'anca (Jayasekera N et al., PLoS One 2014), radio-omerale (Mercer SR and Bogduk N, Clin Anat 2007), della faccetta lombare (Taylor JR and McCormick CC, Neuroradiology 1991), intermetacarpale (Clavert P et al., Surg Radiol Anat 2006), e della mano (Riordan DC, Orthop Clin North Am 1974). L'anatomia microscopica della sinovia è stata già descritta nel Capitolo 1.

4.1.3 Il tessuto adiposo come fonte di cellule staminali

L'iperplasia e l'ipertrofia degli adipociti aumentano la massa adipocitaria, fenomeno che è associato all'obesità. Il reclutamento di cellule staminali multipotenti per la produzione di nuovi preadipociti, insieme all'espansione clonale dei preadipociti stessi durante il processo di adipogenesi, contribuiscono all'iperplasia. La lipogenesi e l'immagazzinamento dei triacilgliceroli determinano invece l'ipertrofia degli adipociti maturi. Sia le cellule staminali che i preadipociti sono presenti nella frazione stromale vascolare del tessuto adiposo (**Figura 40**).

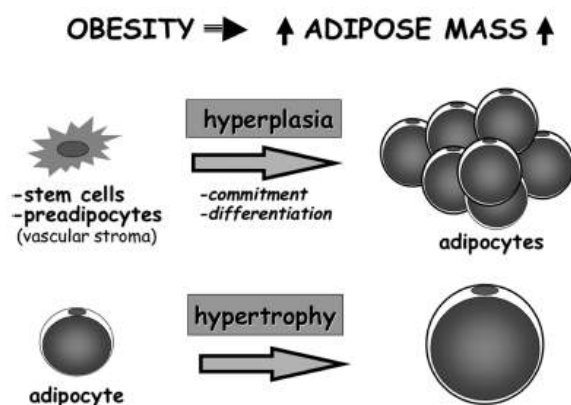


Fig 40: Iperplasia ed ipertrofia del tessuto adiposo

L'impegno delle cellule staminali verso la linea degli adipociti e la successiva differenziazione dei preadipociti in adipociti avvengono durante l'età adulta. La maggior parte delle conoscenze attualmente disponibili sullo sviluppo adiposo è stata acquisita attraverso l'uso di vari modelli di impegno e colture cellulari. In coltura, il BMP4 stimola le cellule staminali mesenchimali verso la linea degli adipociti. I preadipociti quiescenti, una volta ricevute le appropriate induzioni ormonali, avviano il programma di differenziazione (Otto TC and Lane MD, Crit Rev Biochem Mol Biol 2005). Questo processo è caratterizzato da un incremento rapido nella fosforilazione di CREB. CREB, a sua volta, attiva C/EBP β attraverso la cascata del cAMP. A questo punto, i preadipociti ritornano nel ciclo cellulare per avviare l'espansione clonale. Contestualmente all'ingresso nella fase S, C/EBP β viene fosforilato dalla MAP chinasi e successivamente da GSK-3 β

(chinasi della sintesi del glicogeno 3 beta). C/EBP β può ora attivare i due fattori di trascrizione chiave nell'adipogenesi, C/EBP α e PPAR- γ . Questi fattori, insieme, attivano i geni responsabili del fenotipo adipocitario (Cornelius P et al, Ann Rev Nutr 1994; MacDougald OA and Lane MD, Ann Rev Biochem; Aillaud G, Biochem Soc Trans 1996). Una delle caratteristiche più importanti del tessuto adiposo come fonte di cellule staminali è la sua facilità di acquisizione, insieme a un rischio estremamente basso. Inoltre, la percentuale di cellule che può essere ottenuta è approssimativamente doppia rispetto a quella realizzabile da volumi equivalenti di cellule derivate dal midollo osseo. Questo si rispecchia anche nella facilità di generare una coltura cellulare con fluente in circa 5-7 giorni grazie alla significativa quantità di cellule isolate (De Ugarte DA et al, Immunol Lett 2003). Sebbene la percentuale di cellule e il rendimento cellulare tra cellule staminali adipose e midollare possano differire, la loro biologia è fondamentalmente simile.

4.1.4 Potenzialità delle cellule staminali adipose (ASCs)

Come riportato dalla Federazione Internazionale per la Medicina Rigenerativa e le Scienze Adipose, le Cellule Staminali Adipose (ASCs) sembrano essere ideali per le applicazioni in medicina rigenerativa per molteplici motivi: possono essere raccolte, trattate e ampliate in numero in maniera non invasiva, semplice ed efficace. Rodbell e colleghi sono stati pionieri dei primi metodi di isolamento delle ASCs negli anni '60. Successivamente, questa procedura è stata modificata da Zuk nel 2001 (Zuk PA et al, Tissue Eng 2001) per consentire l'isolamento delle cellule staminali da campioni di tessuto adiposo umano. Possono comunque esserci discrepanze riguardo ai risultati provenienti dai vari laboratori a causa delle differenze nei metodi utilizzati. Per superare questo problema, Nicoletti e colleghi hanno stabilito un nuovo protocollo standard per isolare le ASCs dal tessuto adiposo umano utilizzando la digestione enzimatica (Nicoletti GF et al, J Cell Physiol 2014) (**Figura 41**). La grande novità di questo protocollo è che le cellule isolate dal tessuto adiposo vengono selezionate tramite FACS prima della loro coltura: questo protocollo garantisce una maggiore percentuale di purezza e vitalità delle ASCs. Inoltre, questa nuova procedura è stata utilizzata da altri gruppi per selezionare una sottopopolazione cellulare specifica caratterizzata da uno specifico immunofenotipo (Romagnoli C and Brandi ML, World J Stem Cells 2014; Lindroos B et al, Stem Cell Rev 2011).

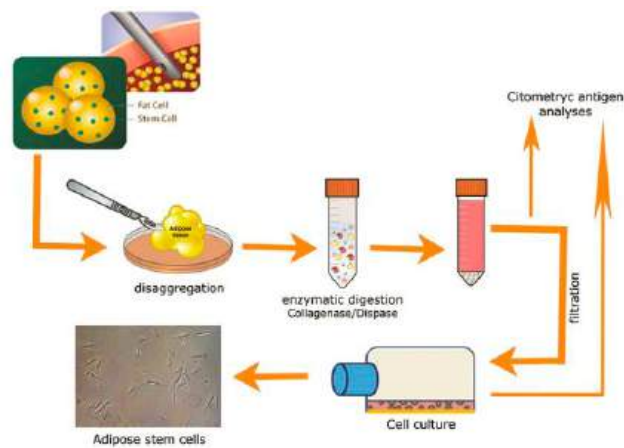


Fig 41: Rappresentazione schematica del protocollo di isolamento delle cellule staminali adipose (ASCs) descritto da D'Andrea e colleghi nel 2008 (D'Andrea F et al, Tissue Eng Part C 2008). Il tessuto adiposo ottenuto tramite liposuzione o lipectomia è stato lavato, triturato meccanicamente e digerito in una soluzione di collagene tipo I e dispasi. Il tessuto digerito è stato filtrato e centrifugato. Gli eritrociti sono stati eliminati e le cellule rimanenti sono state coltivate in DMEM con il 10% di siero fetale bovino (FBS) su piastre di plastica. Dopo tre giorni di coltura, le cellule adese hanno acquisito una morfologia simile a fibroblasti o poligonale e le cellule sono state caratterizzate mediante citometria per stabilire il grado di staminalità di questa popolazione cellulare.

Zuk e colleghi hanno riportato che le cellule staminali adipose (ASCs) esprimono più cluster di differenziazione (CD), simili a quelli osservati nelle cellule staminali mesenchimali (MSC) del midollo osseo (Zuk PA et al, Mol Biol Cell 2002). È opportuno menzionare che Gimble e collaboratori hanno osservato che i substrati di adesione e il tempo di coltura modificano lo stato di differenziazione delle ASCs: in particolare, dopo due passaggi in coltura, le ASCs mostrano peculiari molecole di adesione e recettori, enzimi di superficie e proteine della matrice extracellulare correlate al fenotipo delle cellule stromali (Kokai LE et al, Transl Res 2014). Diversi gruppi hanno effettuato confronti diretti tra ASCs umane e MSC del midollo osseo. I dati indicati da Zuk e collaboratori riportano che queste due cellule staminali erano immunofenotipicamente identiche per il 90% (Zuk PA et al, Mol Biol Cell 2002). Articoli più recenti hanno rivisto questa affermazione precedente, fornendo un pannello di identità molecolare differente (Jin HJ et al, Int J Mol Sci 2013). Ad esempio, la glicoproteina CD34 è evidente sulle ASCs umane al primo passaggio, ma non è presente sulle MSC del midollo osseo (Pittenger MF et al, Science 1999). È importante notare che la presenza dell'antigene Stro-1, un comune antigene di superficie associato alle MSC del midollo osseo, sulle ASCs umane è oggetto di dibattito (Gronthos S et al, J Cell Physiol 2001). Più recentemente, il marcatore di superficie Sca-1 è stato trovato in una sottopopolazione cellulare derivata dal tessuto adiposo bianco arricchita in cellule staminali (Zamperone A et al, Stem Cells Dev 2013; Tokunaga M et al, Matrix Biol 2014). La caratterizzazione dell'immunofenotipo di

superficie delle ASCs ha reso possibile migliorare o affinare la popolazione di cellule staminali a partire dalle cellule eterogenee del SVF. I ricercatori scientifici hanno utilizzato perle immunomagnetiche o citometria a flusso per la selezione positiva e negativa di una sottopopolazione cellulare all'interno del SVF. In particolare, Miranville (Miranville A et al, *Circulation* 2004) e Suga (Suga H et al, *Stem Cells* 2006) hanno selezionato la sottopopolazione cellulare CD34⁺/CD31⁻ che esprimeva anche CD133 e ABCG2. Questa popolazione esprimeva caratteristiche di cellule progenitrici endoteliali. Inoltre, Mitchell e colleghi (Mitchell JB et al, *Stem Cells* 2006) hanno caratterizzato il comportamento della SVF in vitro, mostrando che inizialmente i marcatori associati alle cellule stromali (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD166) avevano un numero ridotto di cellule SVF, aumentando significativamente nei passaggi successivi, mentre i marcatori delle cellule staminali (CD34 e ABCG2) diminuivano successivamente. Traktuev e collaboratori (Traktuev DO et al, *Circ Res* 2008) hanno rilevato una sottopopolazione cellulare CD34⁺/CD31⁻/CD144⁻ a livello perivascolare nel tessuto adiposo. Questa popolazione mostrava marcatori di muscolo liscio (alpha-actin, caldesmon e calponin), marcatori periciti (proteoglicano solfato di condroitina, CD140a e CD140b) e marcatore mesenchimali (CD10, CD13 e CD90). Infine, De Francesco (De Francesco F et al., *PLoS One* 2009) ha isolato dal SVF una sottopopolazione cellulare caratterizzata dalla positività per CD29, CD34, CD44, CD90, CD105 e CD117. Questa popolazione cellulare si è differenziata in vitro e in vivo in cellule endoteliali, portando alla formazione di strutture simili a capillari in un mezzo di metilcellulosa. Interessante notare che Sengenès e colleghi (Sengenès C et al., *J Cell Physiol* 2005) hanno evidenziato che la popolazione cellulare SVF positiva per CD34 includeva solo la popolazione delle ASCs. Nonostante numerosi studi che indagano i diversi marcatori raccomandati per rilevare e isolare le ASCs non esiste un consenso unanime sull'uso di una specifica combinazione di CD per selezionare le cellule staminali mesenchimali dal tessuto adiposo. La caratterizzazione del comportamento biologico utilizzando altri test di staminalità è fondamentale. Ad esempio, l'espressione dei fattori di trascrizione come OCT4, SOX2 e NANOG, coinvolti nel mantenimento delle cellule staminali; la capacità di proliferare; l'auto-rinnovamento e il potenziale di differenziazione sono tutti fattori chiave da considerare. Le ASCs e le MSC del midollo osseo sono immunoprivilegiati e tollerati immunologicamente in auto-trapianti in vivo. Diversi studi hanno indicato che sia le ASCs che le MSC del midollo osseo inibiscono la proliferazione delle cellule mononucleate ematiche periferiche (Puissant B et al, *Br J Haematol* 2005; Yoo KH et al, *Cell Immunol* 2009) e le ASCs mostrano un livello più elevato di secrezione di citochine con potenti effetti immunomodulatori come IL-12,

TNF-alfa e IFN-gamma (Melief SM et al., Stem Cells Transl Med 2013). Questi dati suggeriscono che le ASCs, così come le MSC del midollo osseo, possono essere considerate nella regolazione allogenica (Gonzales MA et al., Arthritis Rheum 2009) e possono essere utilizzate per ridurre le malattie da trapianto contro l'ospite, come riportato da Fang (Fang B et al., Transplant Proc 2007).

La multipotenza delle cellule stromali adipose (ASCs), simile a quella delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (MSC), riveste un ruolo di fondamentale importanza nella riparazione dei difetti mesodermici e nella gestione delle malattie. In particolare, sia le ASCs che le MSC del midollo osseo hanno dimostrato la capacità di differenziarsi in cellule adipogeniche (Yu G et al., Methods Mol Biol 2011; Zheng YH et al., Exp Ther Med 2013), osteogeniche (Kroeze RJ et al, Methods Mol Biol 2011; Cheng SL et al., Endocrinol 1994), condrogeniche (Stromps JP et al., BioMed Res Int 2014; Afizah H et al, Tissue Eng 2007), cellule endoteliali (Planat-Benard V et al., Circulation 2004; Janeczek Portalska K et al., PLoS One 2012). È importante sottolineare che le ASCs e le MSC del midollo osseo hanno anche mostrato la competenza di differenziarsi in altri tessuti, quali cellule simili ai neuroni (Zavan B et al., Discov Med 2010) e cellule epiteliali (Baer PC et al, Methods Mol Biol 2011; Chung HM et al., Expert Opin Biol Ther 2009).

Differenziamento adipocitario: Nella chirurgia plastica ricostruttiva, il tessuto adiposo risulta frequentemente un fattore chiave nella perdita o nel difetto tissutale (Philips BJ et al., Expert Opin Biol Ther 2012). Negli ultimi anni, il trapianto di grasso potrebbe non dipendere solamente dal trapianto di adipociti adulti, ma anche dall'uso della frazione di cellule stromali adipose (ASC) (Liu B et al., Tissue Eng Part C Methods 2013; De Francesco F et al., Adv Exp Med Biol 2024). Ormoni come il fattore di crescita, gli glucocorticoidi, l'insulina e le prostaglandine hanno un'azione stimolante sulle ASCs durante le fasi iniziali e finali della differenziazione in adipociti. Pertanto, i mezzi adipogenici sono solitamente arricchiti con l'induttore dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP), il 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), e il desametasone, l'insulina ricombinante umana e l'indometacina. Queste sostanze attivano l'espressione genica coinvolta nella differenziazione adipogenica e inibiscono l'espressione di geni che aiutano a mantenere la capacità staminale e/o nel processo di differenziazione in altri tessuti. Le condizioni adipogeniche, necessarie a conferire la morfologia specifica delle cellule cariche di lipidi, evidenziano goccioline lipidiche intracellulari e mostrano l'espressione di marcatori adipocitari come l'adiponectina e PPAR γ anche dopo 24 ore (**Figura 42**). La capacità delle ASC di differenziarsi in adipociti maturi è chiaramente evidente in mezzo di coltura. La

differenziazione delle ASCs in adipociti è indiscutibile, e la scoperta delle ASC come sorgente rigenerativa di adipociti per il trapianto di grasso è di grande interesse.

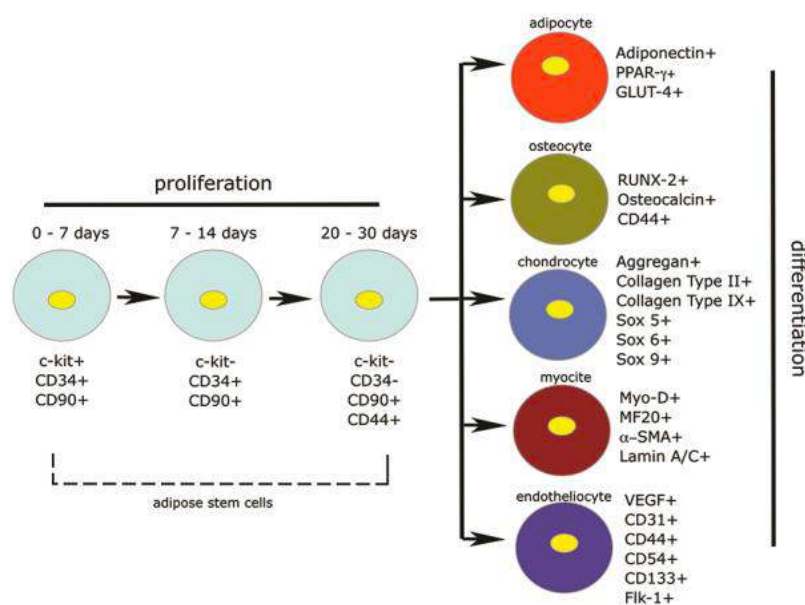


Fig. 42: Rappresentazione schematica della proliferazione e della capacità differenziativa delle ASCs

Differenziamento osteogenico: Nella pratica clinica, la differenziazione delle ASC in osteoblasti potrebbe risultare utile nella riparazione e rigenerazione delle fratture, nonché assistere il trapianto osseo per fusioni articolari (Ruetze M and Richer W, Expert Rev Mol Med 2014; Lee JA et al., Ann Plast Surg 2003). Lee e collaboratori nel 2003 hanno riportato dimostrazioni iniziali di ricostruzione ossea in vivo dopo la differenziazione in vitro delle ASCs verso la linea osteoblastica (Lee JA et al., Ann Plast Surg 2003). Nel 2004, Cowan e colleghi hanno dimostrato che le ASC, impiantate su scaffold rivestiti di apatite, erano in grado di riparare difetti ossei critici nelle calvarie dei topi (Cowan CM et al., Nat Biotechnol 2004). C'è consenso nella comunità scientifica riguardo alla necessità di desametasone e 1,25-diidrossivitamina D3 per l'induzione in vitro dell'osteogenesi (Gimble J and Guilak F, Cytotherapy 2003). L'aggiunta di acido ascorbico è anche importante perché questo coenzima funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di lisina e prolina nel collagene, accelerando la sintesi di proteine della matrice extracellulare ossea non collagene. Inoltre, il beta-glicerofosfato è necessario per calcificare e mineralizzare la matrice extracellulare ossea (**Figura 42**). È fondamentale generare osso al fine di riparare ampi difetti ossei, nel contesto clinico. Tradizionalmente, innesti ossei non vascolarizzati possono essere insufficienti per riparare difetti ossei superiori a 6 cm, mentre per aree più grandi sono necessari innesti ossei vascolarizzati. I marcatori comunemente valutati per dimostrare la differenziazione osteogenica includono RUNX2, osteocalcina, osteopontina, collagene di tipo I e ALP.

Differenziamento condrogenico: Le ASC potrebbero essere utilizzate per trattare traumi o artrite nelle articolazioni e potrebbero essere utili nella ricostruzione articolare (De Francesco F et al., Int J Mol Sci 2021). Le ASC sono state impiegate in conigli per la riparazione di difetti osteocondrali (Nathan S et al., Tissue Eng 2003). La differenziazione condrogenica è indotta in vitro mediante l'aggiunta di insulina, TGF-beta1 e acido ascorbico senza desametasone nel mezzo. Un'espressione potenziata delle proteine della matrice extracellulare della cartilagine si verifica quando viene utilizzata una tecnica di coltura 3D per sospendere le ASC (Yeon B et al., Biomacromolecules 2013). Quando le cellule crescono come monostrato, i marcatori condrogenici di differenziazione sono visibili, sebbene a concentrazioni ridotte, e la differenziazione cellulare appare incompleta (Winter A et al., Arthritis Rheum 2003) (**Figura 42**). L'uso della rigenerazione della cartilagine al posto della sostituzione articolare potrebbe costituire un trattamento alternativo con vantaggi sociali ed economici. I geni frequentemente utilizzati per la differenziazione condrogenica includono il collagene di tipo I, il collagene di tipo II, la proteina oligomerica della matrice cartilaginea e la proteina centrale dell'aggrecan.

Differenziamento endoteliale: La capacità delle ASC di supportare l'angiogenesi è oggetto di dibattito, probabilmente perché la popolazione cellulare isolata dai diversi gruppi scientifici non è omogenea e la percentuale di diversi precursori cellulari può subire lievi variazioni tra i vari laboratori. I primi studi sulla differenziazione delle ASC hanno concluso che le cellule endoteliali erano il tipo cellulare più rappresentato nel SVF, come indicato dalla presentazione di marcatori specifici delle cellule endoteliali quali CD31, CD44, CD54, Flk1 e VEGF. A nostro avviso, la sottopopolazione CD34+/CD90+ delle ASC è la migliore candidata per la differenziazione endoteliale. Ci sono buone evidenze, infatti, che tale sottopopolazione produce fattori sia anti-apoptotici che angiogenici, inclusi VEGF, HGF e TGF-beta (De Francesco F et al., PLoS One 2009). Poiché il VEGF è necessario per promuovere la differenziazione endoteliale, abbiamo trovato, coerentemente con questi dati molecolari, che le cellule CD34+/CD90+ si sono differenziate in strutture simili a capillari endoteliali. Altri autori, utilizzando un modello murino nudo in vivo di ischemia dell'arto posteriore, hanno dimostrato che l'iniezione di ASC ha migliorato notevolmente la perfusione dell'arto, coerente con un aumento del flusso sanguigno e della densità capillare nell'arto (Miranville A et al., Circulation 2004; Rehman J et al., Circulation 2004) (**Figura 42**).

Negli ultimi anni, il tessuto adiposo umano ha suscitato un crescente interesse nell'ambito della chirurgia plastica e delle applicazioni in medicina rigenerativa. La frazione vasculostromale (SVF) isolato dalle Cellule Staminali Adipose è stata impiegata con

successo in numerosi studi clinici e sperimentazioni. Tuttavia, sussistono ancora alcuni svantaggi, principalmente associati alle diverse strategie terapeutiche e alle normative vigenti nei vari paesi europei e non europei. Inoltre, per quanto concerne le tecniche di isolamento, nessun sistema attualmente sembra soddisfare i requisiti stabiliti dalla International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) e dalla International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT). Più recentemente, un'attenzione crescente è stata rivolta ai sistemi non enzimatici, in quanto rappresentano i mezzi più sicuri ed efficaci per la purificazione del tessuto adiposo. Ovviamente, ogni sistema, metodo o protocollo presenta diversi vantaggi e svantaggi. Pertanto, lo sviluppo e l'ottimizzazione continua sono essenziali, soprattutto per quanto riguarda parametri specifici come il lavaggio, il sistema di filtrazione, la centrifugazione e le dimensioni delle cannule. Tutti questi parametri devono essere studiati e confrontati con attenzione al fine di produrre sistemi che possano rendere l'uso delle terapie cellulari il più efficiente possibile.

CAPITOLO 5

OBIETTIVI DELLA RICERCA

L'Ingegneria Tissutale è stata riconosciuta da molti anni come uno dei temi più rilevanti nella medicina del ventunesimo secolo. Sebbene i primi sforzi clinicamente significativi nel campo dell'ingegneria tissutale si siano concentrati principalmente sulla bioingegneria di sostituti dermici, le applicazioni si sono successivamente ampliate a un'ampia gamma di tessuti e organi. L'emergere di cellule staminali adulte ha agevolato la transizione dall'ingegneria tissutale alla medicina rigenerativa. La medicina rigenerativa è un campo interdisciplinare emergente focalizzato sulla riparazione o rigenerazione di tessuti e organi al fine di ripristinare funzioni alterate causate da vari fattori, tra cui difetti congeniti, malattie e lesioni. Diversi tipi di cellule staminali possono essere impiegati nella medicina rigenerativa, comprese le cellule staminali adulte, in particolare quelle provenienti dal tessuto adiposo. Il tessuto adiposo rappresenta una fonte abbondante di cellule staminali utilizzabili per varie strategie rigenerative. Oltre alle applicazioni ricostruttive, rigenerative o di riprogrammazione, le cellule staminali derivate dal tessuto adiposo possono essere impiegate anche in patologie in cui sono implicate, come l'osteoartrite.

L'uso estensivo e la manipolazione delle cellule staminali in ambiente clinico sono stati ostacolati dalle norme delle Buone Pratiche di Fabbricazione relative alla "produzione di cellule" (Agostini F, Stem Cell Res, 2018; Raposio E and Ciliberti G, Ann Med Surg, 2017), che non sono applicabili secondo il Parlamento Europeo (Regolamento CE n. 1394/2007) per quanto riguarda la manipolazione minima. Tuttavia, in Europa, questi protocolli dovranno soddisfare i requisiti recentemente stabiliti dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA). L'EMA è una sezione decentralizzata dell'Unione Europea (UE) che opera a Londra dal 1995. L'Agenzia è tenuta a valutare le procedure scientifiche e a garantire le misure di sicurezza dei trattamenti e della terapia cellulare nell'Unione Europea. Sono quindi necessarie procedure adeguate e accessibili per ottenere hASC autologhi con una manipolazione minima per l'uso in ambito clinico. Come detto in precedenza, alcuni dispositivi medici rientrano tra le procedure di manipolazione minima e pertanto sono autorizzate per la processazione del tessuto adiposo e l'estrazione della frazione vasculo-stromale in ambito clinico. Numerosi studi hanno suggerito che tali sistemi sono in grado di ridurre la fibrosi, migliorare l'angiogenesi e avere effetti anti-infiammatori (De Francesco F, IJMS, 2018; Senesi L, Front Cell DevBiol, 2019; Malanga GA, J ClinOrthop Trauma, 2018; Desando G, IJMS, 2019). Per queste ragioni, l'uso di tali dispositivi medici può essere utile nel trattamento di numerose patologie in campo plastico ricostruttivo ma anche in campo degenerativo come l'artrosi trapezio-metacarpale. Per quanto di nostra conoscenza attualmente nessuno studio presente in letteratura valuta gli

effetti dell'applicazione del tessuto adiposo proveniente da questi dispositivi disponibili in commercio nell'artrosi trapezio-metacarpale, soprattutto rispetto a procedure infiltrative classiche quali applicazione di acido ialuronico intrarticolare.

Gli obiettivi di questa tesi di dottorato possono essere formulati in questo modo:

- 1. Caratterizzare in vitro i dispositivi medici per la disgregazione meccanica del tessuto adiposo:** Effettuare studi di laboratorio per caratterizzare le proprietà meccaniche, strutturali e biologiche del tessuto adiposo ottenuto dai vari dispositivi medici presenti sul mercato. Analizzare parametri come la viabilità cellulare, la presenza di fattori di crescita e la capacità di differenziazione cellulare.
- 2. Analizzare i meccanismi d'azione del tessuto adiposo:** Valutare i potenziali meccanismi biologici e biochimici attraverso cui il tessuto adiposo esercita un effetto positivo sulla degenerazione articolare, inclusi gli effetti anti-infiammatori e rigenerativi.
- 3. Condurre test in vivo su modelli animali per valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento con tessuto adiposo:** Utilizzare un modello di studio in vivo per osservare l'impatto dell'applicazione di tessuto adiposo su parametri funzionali e radiologici in cani affetti da patologie articolari simili all'artrosi trapezio-metacarpale. Documentare eventuali effetti avversi, miglioramenti e tollerabilità del trattamento.
- 4. Valutare l'efficacia terapeutica dell'applicazione del tessuto adiposo derivante da dispositivi medici nel trattamento dell'artrosi trapezio-metacarpale :** L'obiettivo principale è analizzare l'efficacia del tessuto adiposo isolato mediante disgregazione meccanica, rispetto alle tradizionali terapie infiltrative, per valutare miglioramenti clinici e funzionali nelle condizioni di artrosi trapezio-metacarpale.
- 5. Confrontare gli effetti del tessuto adiposo ottenuto da disgregazione meccanica con l'acido ialuronico:** Condurre uno studio comparativo degli esiti clinici ottenuti con l'applicazione del tessuto adiposo rispetto alle infiltrazioni di acido ialuronico in pazienti affetti da artrosi trapezio-metacarpale, esaminando variabili come il dolore, la funzionalità articolare e la qualità della vita.
- 6. Documentare gli effetti collaterali e la sicurezza del trattamento con tessuto adiposo:** Raccogliere e analizzare dati sugli eventi avversi nei pazienti e nei modelli animali, contribuendo a mettere in evidenza la sicurezza del trattamento e il profilo di rischio associato rispetto alle terapie infiltrative tradizionali.

- 7. Fornire indicazioni per futuri studi clinici e applicazioni :** I risultati finali dello studio mirano a stabilire linee guida pratiche per l'utilizzo clinico del tessuto adiposo derivato da processi di disgregazione meccanica e a suggerire percorsi di ricerca futuri nel campo delle terapie biologiche per condizioni degenerative, oltre a promuovere ulteriori studi comparativi e longitudinali.

Questi obiettivi contribuiranno a colmare una lacuna significativa nella letteratura esistente e a promuovere un approccio innovativo nel trattamento di condizioni degenerative come l'artrosi trapezio-metacarpale.

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

6.1.1 Procedura di raccolta del tessuto adiposo

Dal 2021, tutte le pazienti di età compresa tra 35 e 75 anni che hanno subito interventi di liposuzione e lipofilling per scopi plastico-ricostruttivo, hanno donato il proprio tessuto adiposo per motivi scientifici. I criteri di inclusione ed esclusione sono riassunti nella **Figura 44**.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Age < 65 aa	Diabetes mellitus type I and II
Body Mass Index > 25 kg/m ² < 30 kg/m ²	Cardiovascular or neurologic disorders
	Patients in chronic drug therapy
	Smoke
	Previous abdominal surgery (laparotomy)

Fig 44: Criteri di inclusione ed esclusione delle pazienti sottoposte a procedura di prelievo del tessuto adiposo per motivi scientifici

Le pazienti hanno fornito il consenso prima dell'intervento, in conformità con le linee guida etiche stabilite dal comitato di revisione per studi umani dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "delle Marche" di Ancona. La procedura di liposuzione è stata eseguita secondo il protocollo BEAULI, descritto da Ueberreiter (Ueberreiter et al, *Plast Reconstr Surg* 2013). È stato utilizzato un getto d'acqua pulsato per l'infiltrazione e l'aspirazione simultanea. I range di infiltrazione sono stati impostati su 1–3 da 90 mL/min \pm 15% a 130 mL/min \pm 15%. La soluzione di tumescenza di Klein è stata preriscaldata a 37–38 °C. Le cannule a punta affilata avevano un diametro esterno di 22 mm. Per ciascun paziente, abbiamo raccolto 50 mL di tessuto lipoaspirato che sono stati inviati al Laboratorio, presso il Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Ferrara, per le analisi condotte in questo studio

6.1.2 Digestione Enzimatica del tessuto adiposo

Una porzione del tessuto adiposo lipoaspirato prelevato da ciascun paziente è stata digerita con collagenasi secondo il protocollo precedente (Nicoletti GF et al, *J Cell Physiol* 2015; Ferroni et al, *Methods Mol Biol* 2022). In sintesi, i campioni di grasso sono stati digeriti con collagenasi di tipo I alla concentrazione di 1 mg/mL (GIBCO Life Technology, Monza, Italia), risospesi in Soluzione Salina Bilanciata di Hank (HBSS, GIBCO Life Technology, Monza, Italia) e albumina sierica bovina (BSA, 2%, GIBCO Life Technology,

Monza, Italia) a 37 °C per 45 min. È stato aggiunto un mezzo di coltura completo per neutralizzare l'azione dell'enzima, e il campione è stato centrifugato a 400 G per 10 min. Dopo la centrifugazione, il pellet è stato incubato con 2 mL di tampone di lisi per 10 min. La sospensione cellulare è quindi stata centrifugata e risospesa con 2 mL di mezzo di coltura completo. Un'aliquota di SVF è stata conservata per l'analisi della capacità di proliferazione e del CFU-F della porzione di cellule libere, mentre il resto è stato centrifugato a 400 G per 10 min ed un aliquota è stata utilizzata per i restanti studi.

6.1.3 Digestione Non-Enzimatica del tessuto adiposo

In questo studio preliminare sono state valutate tre tecnologie meccaniche: Rigenera (Human Brain Wave HBW, Torino, Italia), Lipogems ortho kit (Lipogems International SpA, Milano, Italia) e Hy-Tissue SVF (Fidia Farmaceutici, Abano Terme, Italia). Ogni campione di tessuto adiposo è stato decantato per rimuovere l'eccesso di olio e diviso in tre porzioni.

La prima porzione del campione di lipoaspirato è stata elaborata da diversi tecnici addestrati utilizzando la tecnologia Rigenera (Human Brain Wave HBW, Torino, Italia) tramite un processo di disaggregazione meccanica. Il dispositivo è composto da un motore in cui avviene la disaggregazione meccanica all'interno di una capsula sterile monouso, dotata di lame in acciaio che ruotano a 80 giri/minuto, seguita da una filtrazione attraverso pori di 80 µm (Figura 45).



Fig 45: Rigeneracons è un medical device di classe II e il suo motore elettrico (Sicurdrill).

Nello specifico, sono stati aggiunti nella capsula sterile 4 mL di lipoaspirato e 4 mL di mezzo di coltura completo Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) contenente il 10% di Siero Fetale Bovino (FBS), l'1% di un mix di penicillina/streptomina 1:1 (GIBCO Life Technology, Monza, Italia) e lo 0.5% di anfotericina B (GIBCO Life Technology, Monza, Italia), e il dispositivo Rigenera® è stato attivato per 1 minuto. I microinnesti ottenuti sono stati raccolti dalla capsula tramite una siringa, filtrati attraverso una rete in nylon di 70 µm, e centrifugati a 3000 giri/minuto per 7 minuti. Il surnatante è stato scartato, mentre il pellet cellulare è stato risospeso in 1 mL di mezzo completo e successivamente conteggiato.

La seconda porzione del campione di lipoaspirato è stata elaborata da diversi tecnici addestrati utilizzando il Lipogems ortho kit (Lipogems International SpA, Milano, Italia) tramite un processo di disaggregazione meccanica. Tra 40 e 130 ml di lipoaspirato (idealmente 100 ml) vengono processati ogni volta nel dispositivo standard da 225 ml. Per evitare danni cellulari, è fondamentale che non ci sia aria nel dispositivo durante tutte le fasi procedurali, e il dispositivo dovrebbe essere pre-riempito con soluzione salina prima di iniziare il processo. Il grasso aspirato deve essere sempre circondato da un ambiente liquido: ciò è essenziale per ottenere piccoli cluster di grasso sani anziché olio e detriti di tessuto adiposo. Il primo ridimensionamento dei cluster è ottenuto spingendo il grasso aspirato dalla siringa nel dispositivo e attraverso il primo filtro di riduzione delle dimensioni, consentendo contemporaneamente la fuoriuscita della quantità corrispondente di soluzione salina verso il sacchetto dei rifiuti. Quando la quantità desiderata di tessuto lipoaspirato viene posta nel dispositivo, mantenuto in posizione verticale con il filtro di riduzione delle dimensioni in alto, lo strato galleggiante di tessuto aspirato non dovrebbe occupare più della metà superiore del dispositivo. All'interno del dispositivo vengono utilizzate cinque sfere in acciaio inossidabile che vengono agitate per emulsionare i residui di olio, i quali vengono successivamente rimossi insieme ai componenti ematici contaminanti attraverso un flusso controcorrente per gravità di soluzione salina, mentre i cluster adipocitari lavati e ridotti migrano verso la parte superiore del dispositivo Lipogems. Quando la soluzione all'interno del dispositivo appare chiara e il lipoaspirato giallo, il flusso salino viene fermato e il dispositivo viene capovolto (180°). La seconda riduzione dei cluster adiposi è ottenuta facendo passare i cluster adiposi galleggianti attraverso il secondo filtro di riduzione delle dimensioni, spingendo ulteriore fluido dall'apertura inferiore del dispositivo utilizzando una siringa da 10 cc (**Figura 46**). Il tessuto disaggregato è stato raccolto con una siringa utilizzando il portello della valvola inferiore e centrifugato a 400 G per 10 minuti a temperatura ambiente, seguito dalla

risospensione in 1 mL di Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM) completo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) con il 10% di siero bovino fetale (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), 0,5% di anfotericina B (GIBCO Life Technology, Monza, Italia) e 1% di una miscela di penicillina/streptomicina 1:1 (GIBCO Life Technology, Monza, Italia) per conteggiare il numero di cellule presenti.

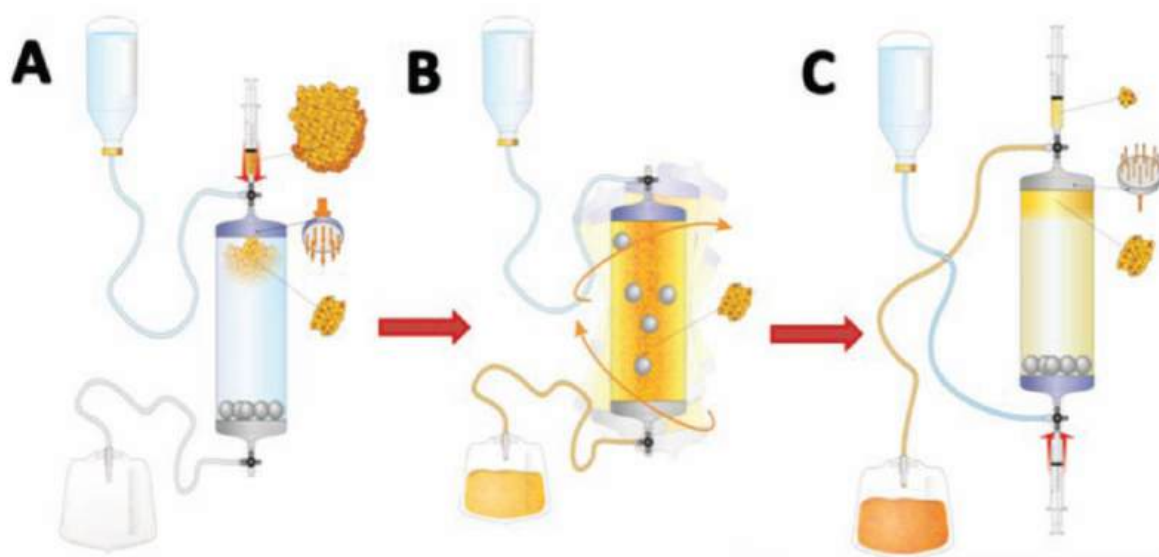


Fig 46: Lipogems è un medical device di classe II

La terza porzione del campione di lipoaspirato è stata elaborata da diversi tecnici addestrati utilizzando il kit Hy-Tissue SVF (Fidia Farmaceutici, Abano Terme, Italia) tramite un processo di disaggregazione meccanica. Il kit forniva un doppio sacchetto per la raccolta dei tessuti, sterile e monouso, dotato di un sacchetto filtrante interno con rete di 120 µm. Un volume di lipoaspirato (25–30 mL) è stato trasferito nel sacchetto interno attraverso il portello superiore. Posizionando il sacchetto verticalmente, la soluzione di Klein contenente parte delle cellule ematiche è stata recuperata nella parte inferiore del sacchetto di lavorazione e rimossa, mentre il tessuto adiposo è rimasto nel sacchetto filtrante interno. Un volume uguale di soluzione PBS corrispondente alla quantità di soluzione di Klein rimossa è stato introdotto nel sacchetto di lavorazione attraverso il portello superiore, e il grasso è stato elaborato secondo le istruzioni per l'uso. In breve, il tessuto adiposo è stato massaggiato per 5 minuti e disaggregato utilizzando un piccolo bastoncino di plastica, costringendolo a passare attraverso il sacchetto filtrante mediante massaggio manuale (**Figura 47**). Il tessuto disaggregato è stato raccolto con una siringa utilizzando il portello della valvola inferiore del sacchetto esterno e centrifugato a 400 G per 10 minuti a temperatura ambiente, seguito dalla risospensione in 1 mL di Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM) completo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) con il 10% di siero bovino fetale (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), 0,5% di anfotericina B (GIBCO Life Technology,

Monza, Italia) e 1% di una miscela di penicillina/streptomicina 1:1 (GIBCO Life Technology, Monza, Italia) per conteggiare il numero di cellule presenti.



Fig 47: Hy Tissue SVF è un medical device di classe II

La SVF ottenuta con ciascun metodo, analogamente a quello ottenuto tramite digestione enzimatica, è stato portato a un volume di 10 mL con DMEM supplementato con 10% FBS e 1% penicillina-streptomicina (tutti di Gibco R, Thermo Fisher Scientific, Paisley, Regno Unito). Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (100 μ L/pozzetto) e conservate in un incubatore umido a 37 °C con 5% di CO₂ per valutare la vitalità. Un'altra aliquota di cellule ottenute è stata seminata su un T-flask da 25 cm² e incubate a 37 °C con 5% di CO₂. Tre giorni dopo l'estrazione delle cellule, il mezzo completo è stato sostituito e successivamente cambiato ogni 48 ore fino al raggiungimento dell'80% di confluenza e utilizzato per le analisi successive.

6.1.4. Conta cellulare e vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il test PrestoBlue (Life Technologies Corporation, OR, Stati Uniti), seguendo il protocollo fornito dal produttore. Un volume di cento microlitri di sospensione cellulare ottenuta da ciascun metodo di lavorazione è stato inoculato in una piastra microtiter a 96 pozzetti. Successivamente, sono stati aggiunti 10 μ l del reagente PrestoBlue. Le variazioni della vitalità cellulare sono state analizzate tramite spettroscopia di assorbimento, e abbiamo riportato l'assorbanza a 570 nm dopo

un'incubazione di 10 minuti a 37°C utilizzando lettori di microplate multi-modali (Tecan Trading AG, Svizzera). La vitalità cellulare è stata valutata al tempo T0 e al tempo T (72 h) ed è stata eseguita in triplicato per ogni campione relativo a ciascun metodo.

6.1.5. Capacità di proliferazione cellulare

Per determinare la capacità di proliferazione cellulare delle cellule libere contenute nei campioni ottenute con le differenti procedure meccaniche, 2×10^5 cellule di ciascun prodotto sono state inoculate in una flask da 25 cm² e incubate a 37 °C in presenza del 5% di CO₂. Tre giorni dopo l'estrazione cellulare, il mezzo completo è stato sostituito e questa operazione è stata ripetuta ogni 48 ore fino a raggiungere l'80% di confluenza. I giorni necessari per raggiungere la confluenza (passaggio 1) sono stati utilizzati per determinare la capacità di proliferazione. Inoltre, per stimare il tempo necessario affinché le cellule duplicassero il loro numero, sono stati eseguiti saggi di tempo di duplicazione della popolazione. Quattro giorni dopo la semina, 5×10^4 cellule provenienti dai diversi dispositivi medici sono state inoculate in flaconi T-25 (in triplicato) e coltivate con 5 mL di mezzo completo, incubando a 37 °C e 5% di CO₂ per 24, 72 e 96 ore. A ciascun intervallo di tempo, le cellule sono state lavate con PBS 1X, dissociate con tripsina/EDTA, risospese in 1 mL di mezzo e conteggiate utilizzando un contatore CytoSMART (Contatore di cellule automatizzato basato su immagine, versione 1.5.0.16380, CytoSMART Technologies B.V., Eindhoven, Paesi Bassi). Il tempo di duplicazione della popolazione (pdt) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione: $pdt = [t(h) \cdot \log 2] / \log(N_f/N_i)$ (come riportato in Martinello T. et al., Tissue Eng Part C 2010), dove Ni e Nf rappresentano rispettivamente i numeri di cellule iniziali e finali.

6.1.6. Unità formanti colonie

Le cellule libere provenienti dai tre dispositivi medici sono state inoculate in una piastra a 6 pozzetti a densità di 1000 e 5000 cellule/pozzetto in triplicato. Le cellule sono state coltivate per 14 giorni. È stata eseguita la colorazione con Blu Toluidina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per contare le colonie, considerando solo i cluster composti da almeno 50 cellule simili a fibroblasti. La frequenza delle Unità Formanti Colonia di Fibroblasti (CFU-F) all'interno delle diverse popolazioni cellulari è stata espressa come percentuale delle cellule seminate.

6.1.7. Immunofenotipo

Al raggiungimento della confluenza, le cellule derivate da ciascuna tecnica sono state dissociate utilizzando tripsina-EDTA (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Paisley, Regno Unito). Le cellule sono state lavate con PBS e circa 2×10^5 cellule sono state trasferite in tubi di polistirene a fondo tondo da 5 mL; quindi, sono state sottoposte a colorazione per 30 minuti a 4 °C utilizzando anticorpi coniugati fluorescenti. Sono stati investigati i seguenti anticorpi monoclonali: anti-CD34 PE e anti-CD45 PE (entrambi Diaclone, Besançon, Francia), anti-CD90 FITC (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), anti-CD73 PE (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, Stati Uniti), anti-CD235a (Miltenyi Biotec, Germania) e anti-CD31 in diluizione 1:50 (Dako Agilent, Santa Clara, CA, Stati Uniti). Dopo 45 minuti, le cellule sono state lavate e successivamente colorate con anticorpo secondario di capra anti-mouse IgG FITC in diluizione 1:500 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Dopo l'immunocolorazione, le cellule sono state risciacquate in PBS, risospese in 0,5 mL di FACSCFlow e analizzate mediante il sistema di citometria a flusso FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, Stati Uniti). Per i controlli degli anticorpi coniugati a FITC e PE, è stato utilizzato IgG1 isotipico di topo, mentre è stato impiegato un anticorpo secondario solo per l'immunocolorazione indiretta. I dati sono stati raccolti e analizzati tramite il software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA, Stati Uniti).

6.1.8. Differenziamento in vitro

Il potenziale di differenziazione è stato valutato in vitro per i campioni cellulari ottenuti dai diversi dispositivi medici. La differenziazione è stata effettuata utilizzando cellule coltivate espanse provenienti dal passaggio 4. Per la differenziazione adipogenica, 7000 cellule sono state seminate in una piastra a 6 pozzetti, incubate, e dopo 24 ore, il mezzo è stato sostituito con mezzo adipogenico (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e incubato per 16 giorni. Successivamente, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% (PFA) per 30 minuti a 4 °C, lavate due volte con PBS e colorate con Oil Red O (Bio-Optica, Milano, Italia) per 20 minuti e con Ematossilina (Bio-Optica, Milano, Italia) per 1 minuto.

Per la differenziazione condrogenica, 1×10^6 cellule risospese in 5 μ L di mezzo completo sono state seminate in una piastra a 24 pozzetti; dopo 2 ore, è stato aggiunto il mezzo condrogenico (StemPro Chondrogenic Differentiation Kit - GIBCO Life Technology, Monza, Italia). Dopo 14 giorni di incubazione, con cambio del mezzo ogni 3 giorni, le cellule sono state fissate con PFA al 4% per 30 minuti a 4 °C, lavate due volte con PBS e colorate con Alcian Blue 8GX (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per identificare la matrice extracellulare mucopolisaccaridica.

Per la differenziazione osteogenica, 5000 cellule sono state seminate in una piastra a 12 pozzetti con mezzo completo, e dopo 24 ore, il mezzo è stato sostituito con mezzo osteogenico (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit – GIBCO Life Technology, Monza, Italia). Dopo 21 giorni, le cellule sono state fissate con PFA al 4% per 30 minuti a 4 °C, lavate due volte con PBS, e incubate con Alizarin Red S allo 0,2% (Sigma-Aldrich) per 5 minuti e con Ematossilina (Bio-Optica, Milano, Italia) per 1 minuto. Le immagini sono state ottenute utilizzando la microscopia ottica.

6.1.9. Microscopia Ottica

I pellet di SVF ottenuti dopo il trattamento con i tre dispositivi medici sono stati analizzati tramite il metodo del whole-mount (Larsen PL, APMIS1989) e inclusi in paraffina. In breve, i pellet sono stati lavati con soluzione salina, colorati con Ematossilina ed Eosina (Bio-Optica, Milano, Italia) e posizionati su un vetrino senza dissezione utilizzando il metodo del whole-mount. Gli altri pellet sono stati lavati in PBS e fissati con formalina al 10% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 4 ore, deidratati fino a xilene e inclusi in paraffina. Sezioni di 5 µm sono state tagliate con un microtomo. Le sezioni sono state poi essiccate a 37 °C per 24 ore e colorate con Ematossilina ed Eosina (Bio-Optica, Milano, Italia). Tutti i vetrini sono stati esaminati sotto un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Giappone) dotato di una camera digitale (DKY-F58 CCD JVC, Yokohama, Giappone). Le immagini digitali sono state analizzate con il software Image-ProPlus 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

6.1.10. Analisi SEM

Per l'analisi tramite microscopia elettronica a scansione (SEM), i pellet di SVF sono stati fissati in glutaraldeide al 2% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 4 ore, post-fissati in tetossido di osmio al 1% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 1 ora e deidratati in concentrazioni crescenti di acetone (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). I campioni sono stati trattati con un asciugatore a punto critico (CPD 030, Balzers Vaduz, Liechtenstein), montati su supporti metallici e rivestiti con oro (MED 010 Balzers). Le immagini SEM sono state acquisite con XL30 ESEM (FEI-Philips, Eindhoven, Paesi Bassi).

6.1.11 Modello Animale in vitro: Guarigione della tendinopatia in modelli ovini

6.1.11.1 Animali

Sono stati selezionati sedici pecore femmine (Appenninica) di età compresa tra 2 e 5 anni, con un peso compreso tra 50 e 60 kg per lo studio. All'inizio dello studio, quattro pecore

sono state assegnate casualmente all'analisi biomeccanica finale. Le rimanenti 12 animali hanno subito valutazioni ultrasonografiche, istologiche e immunoistochimiche. Le pecore destinate all'analisi biomeccanica sono state monitorate tramite follow-up ecografico e elastosonografico. Sette giorni prima dell'esperimento, gli animali sono stati sistemati in apposite strutture in conformità con la normativa vigente (Allegato III, DL 26/2014). Gli animali sono stati sottoposti a valutazioni cliniche (generali, ortopediche e neurologiche), nonché ad analisi ultrasonografiche ed elastosonografiche prima dell'esperimento, per garantire l'assenza di lesioni tendinee. È stata eseguita anche un'emocromocitometria per confermare lo stato di salute degli animali. I criteri di inclusione erano i seguenti: classe di rischio anestesilogico (ASA) I; assenza di malattie ortopediche e neurologiche, comprese lesioni tendinee precedenti; analisi del campione ematico normale; assenza di gravidanza o allattamento. Il protocollo è stato approvato dal Ministero della Salute italiano (numero di autorizzazione 620/2018-PR).

6.1.11.2 Disegno dello studio

Lo studio prevedeva la formazione di una lesione bilaterale iatrogena equivalente in entrambi i tendini calcanei comuni (CCT) mediante iniezione di collageneasi di tipo I (Ti) e il trattamento di un arto con SVF autologo (T0). Il processo di guarigione è stato monitorato per 8 settimane, confrontando l'arto trattato con gli arti non trattati (T1-2). I 24 tendini (CCT) sono stati assegnati casualmente al gruppo di trattamento (12) o al gruppo di controllo (12), assegnando in tal modo un tendine calcaneale comune di ciascuna pecora al gruppo di trattamento e il tendine controlaterale al gruppo di controllo. Il tessuto adiposo prelevato dalla sede sottoscapolare è stato raccolto 15 giorni dopo l'induzione della lesione (T0), e contestualmente SVF è stato somministrato al gruppo trattato. Esami clinici, ecografici ed elastosonografici sono stati effettuati prima dell'induzione della lesione (Ti), nel giorno del trattamento (T0), dopo 4 settimane (T1) e dopo 8 settimane (T2). Gli animali sono stati sacrificati al termine delle 8 settimane di trattamento e sono stati effettuati biopsie dei CCT nel gruppo trattato e nel gruppo di controllo per le valutazioni istopatologiche e immunoistochimiche. Tutte le valutazioni sono state condotte da investigatori ciechi ai dettagli dello studio.

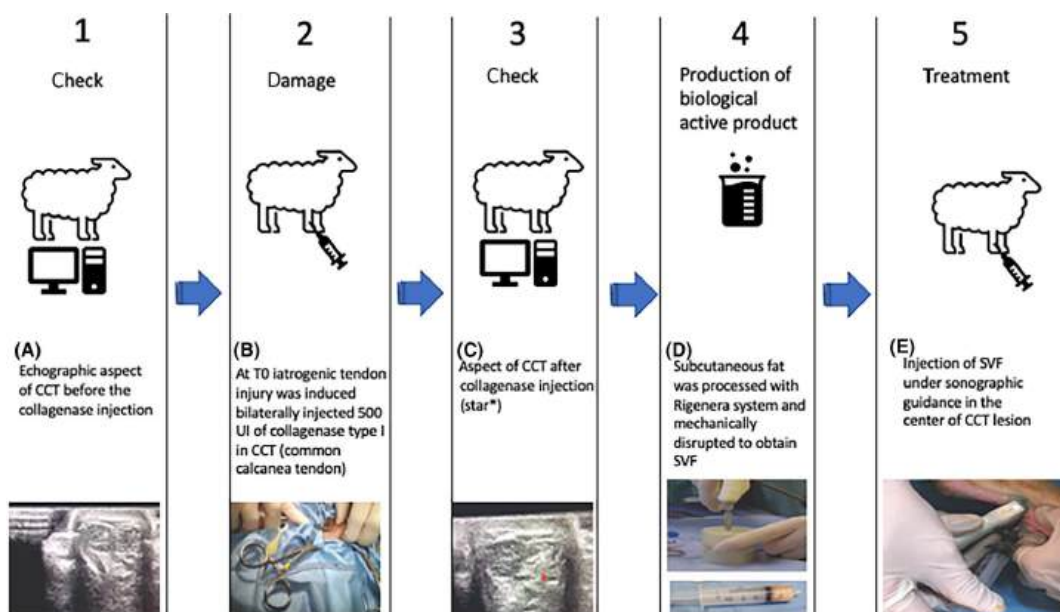
6.1.11.3 Induzione della lesione tendinea

Al Ti, le pecore sono state sedate mediante somministrazione intramuscolare di 0,3 mg/kg di Midazolam (Midazolam) e 15 µg/kg di Buprenorfina (Buprenodale), quindi poste in posizione laterale. Tutti i soggetti hanno subito un'ecografia bilaterale B-Mode e

un'elastsonografia (Mylab Class C, Esaote, Genova, Italia) dei tendini calcanei comuni e, al termine dell'ecografia, è stata indotta la lesione bilaterale al CCT mediante inoculazione di 500 U di collagenasi tipo IA (Sigma, St. Louis, Missouri) sotto controllo ecografico (Mylab Class C, Esaote, Genova, Italia) al centro del tendine interessato, 6 cm prossimali alla tuberosità calcaneale, utilizzando un ago da 22 G (**Figura 48A-C**).

6.1.11.4 Raccolta e applicazione del microinnesto adiposo

Due settimane dopo l'induzione della lesione (T0), gli animali sono stati sottoposti a procedure chirurgiche per il prelievo del tessuto adiposo. Dopo aver sedato i soggetti con Midazolam e Buprenorfina (0,3 mg/kg e 15 µg/kg, rispettivamente), è stata mantenuta l'anestesia intravenosa con propofol, quindi è stata effettuata una tricotomia locale nell'area intrascapolare sterilizzata con scrub alternati di iodopovidone e alcool, e l'area chirurgica è stata coperta con una barriera adesiva sterile. Sono stati raccolti quattro grammi di grasso sottocutaneo e immediatamente trattati con Rigenera (Human Brain Wave, Torino, Italia) (**Figura 48D**). La frazione stromale-vascolare (microinnesti adiposi autologhi) ottenuta (2,5 mL) è stata inoculata, dopo attenta disinfezione, utilizzando una siringa sterile con ago da 22 G, inserito sotto guida ecografica, al centro della lesione tendinea di ciascun arto pelvico assegnato al gruppo trattato (**Figura 48E**). I tendini del gruppo di controllo non sono stati trattati. Al termine della procedura, tutte le pecore hanno ricevuto 15.000 IU/kg di penicillina G procainica (Depocillina; Msd Animal health Srl, Segrate [MI], Italia) e 1 mg/kg di flunixin meglumine (Finadyne, Intervet Italia Srl, Segrate [MI], Italia) somministrati per via intramuscolare immediatamente dopo l'intervento e per 3 giorni consecutivi post-operatori. La procedura terapeutica è stata ripetuta una volta al giorno per i successivi 4 giorni.



6.1.11.5 Valutazione clinica

Il diametro trasversale dei tendini con gli animali in posizione ortostatica è stato misurato a 6 cm dalla tuberosità calcaneale prossimale con un calibro (Ti, T0, T1, T2) ed espresso in mm (Figura 49).

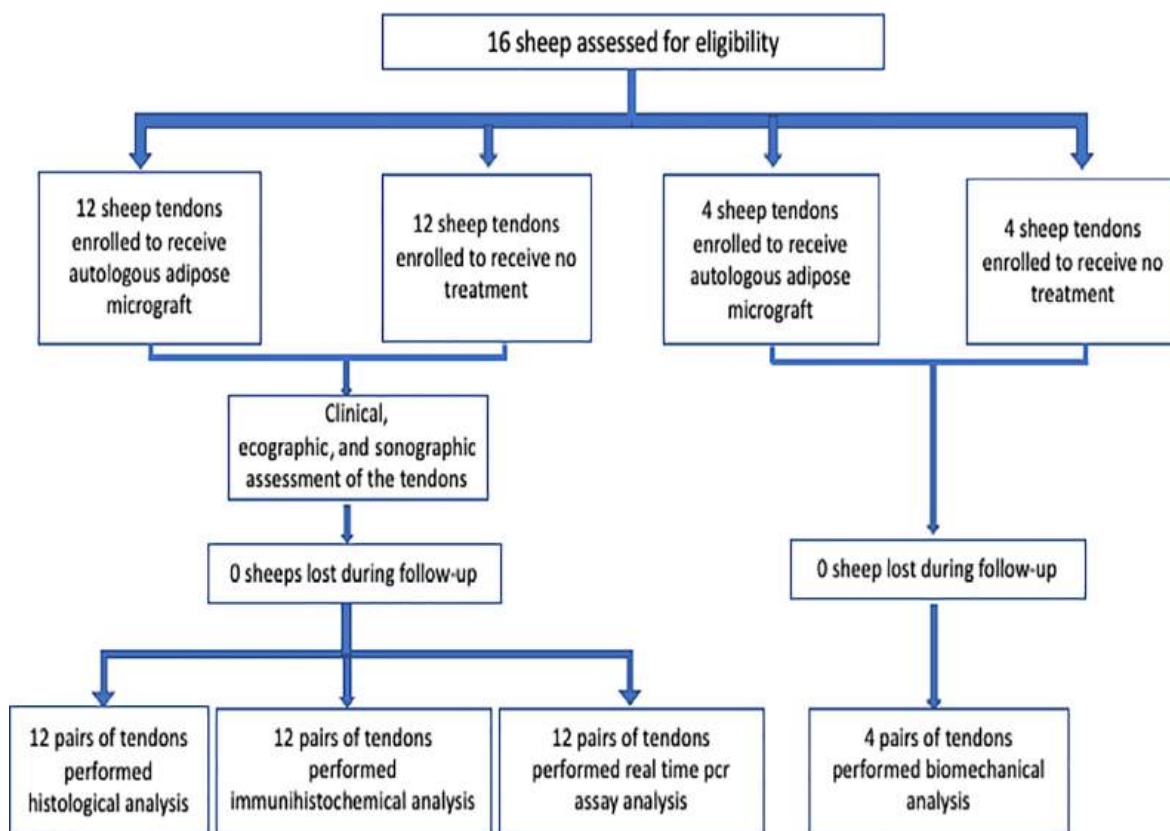


Fig 49. Rappresentazione grafica del disegno dello studio e degli animali coinvolti.

6.1.11.6 Valutazione ultrasonografica ed elastosonografica

Le valutazioni ultrasonografiche ed elastosonografiche sono state effettuate in tutti i 24 tendini, a 6 cm dal calcagno, prima dell'induzione della lesione (Ti), nel giorno del trattamento per il gruppo trattato (prima della somministrazione) (T0), dopo 4 settimane (T1) e al termine dell'esperimento (T2). L'analisi B-mode in tempo reale è stata condotta utilizzando un trasduttore lineare multifrequenza da 3 a 11 MHz impostato a 11 MHz (My Lab Class C, Esaote, Genova, Italia). Immagini longitudinali e trasversali sono state raccolte tramite ecografia B-mode per esaminare il pattern ultrasonografico del tendine e misurare il diametro del tendine. Inoltre, secondo il punteggio di Archambault 64 Tabella Supplementare 1, le lesioni tendinee sono state classificate come segue:

- Grado 1: aspetto normale del tendine (linee ecogene parallele in un pattern fibrillare, uniforme in dimensioni e struttura di eco);
- Grado 2: tendine ingrandito (margine irregolare, texture ecografica omogenea);
- Grado 3: aree ipoecogene, con o senza ingrossamento del tendine.

Nella sezione trasversale, è stata calcolata anche lo spessore del tendine, a 6 cm dal calcagno, ed espresso in millimetri. L'elastasonografia è stata eseguita utilizzando la stessa macchina ecografica dotata di proprietà elastasonografiche (software ElaXto, Esaote S.p.A., Genova, Italia), effettuata con lo stesso trasduttore lineare. I soggetti sono stati esaminati in posizione laterale con flessione del tarso a 90° e ginocchio in posizione neutra. La durezza e la guarigione del tendine nel gruppo trattato e nel gruppo di controllo sono state valutate secondo una mappa di grading colorato: blu (tessuto duro); verde (tessuto intermedio); rosso (tessuto morbido). Il software ha consentito un'elaborazione quantitativa nelle aree di interesse (ROI), per condurre successivi sondaggi statistici. Per ciascun campione, sono stati misurati due valori, tracciando la ROI sull'intera area del tendine, inclusi Elax-t% SFT, che indica la percentuale di morbidezza in una ROI; Elax-t% HRD indica la percentuale di durezza in una ROI. L'indagine è stata condotta alla cieca e completamente svolta dallo stesso operatore, un ecografista esperto.

6.1.11.7 Biopsia tendinea

Otto settimane dopo l'inizio del trattamento (T2), è stata eseguita un'exeresi chirurgica dei tendini calcaneali comuni. Dopo l'induzione dell'anestesia generale e l'eutanasia di tutte le pecore mediante sovradosaggio di barbiturico, tutti i tendini sono stati rimossi sterilmente tramite incisione ai livelli di inserzione con le rispettive basi ossee (calcagno), suturati a un'estremità con una piastra recante il numero identificativo del soggetto e opportunamente contrassegnati secondo il tendine calcaneale comune destro o sinistro, quindi conservati per 72 ore in formalina tamponata al 10% per analisi istologiche e immunoistochimiche. Successivamente, i tendini sono stati divisi in sezioni longitudinali di circa 3 cm, includendo l'area massima di lesione, ottenendo un totale di due campioni per ogni tendine prelevato. I tendini sono stati sezionati longitudinalmente, in conformità con l'arrangiamento delle fibre collagene, e posti in gabbie per la lavorazione istologica; quindi, immersi in paraffina e tagliati con un microtomo Leica in sezioni istologiche sottili di 4 µm. Le sezioni sono state quindi posizionate su vetrini elettrostatici (Histoline, Milano, Italia) per massimizzare l'adesione, lasciate asciugare e successivamente colorate con Ematossilina-Eosina. La valutazione istologica e immunoistochimica è stata condotta in cieco da un unico patologo operante. L'esame istologico delle sezioni tendinee ha incluso la valutazione delle aree di allineamento delle fibre collagene in un modello longitudinale, adottando un punteggio di orientamento delle fibre (FOS). Valori elevati di FOS indicano un maggiore grado di pattern non longitudinale o perturbato, mentre punteggi più bassi rappresentano pattern longitudinali normali delle fibre secondo il modello: 3 (>75%), 2

(50-75%), 1 (25-49%), 0 (<25%), in cui le percentuali definiscono la relazione tra la zona danneggiata e l'intera area trasversale del tendine calcaneale comune, come valutato con un ingrandimento di 10×. Considerando i seguenti parametri—percentuale predominante di fibre allineate; non allineate; vortex o fibre "fingerprint" organizzate, abbiamo analizzato cinque campi selezionati casualmente e valutato il punteggio come la media delle percentuali rilevanti dei campi. Sono stati considerati anche altri criteri di valutazione morfologica strettamente collegati: la presenza di edema/aspetto mixoide dell'area tendinea esaminata (punteggio di edema delle fibre = FES) (punteggio 0-3), la presenza di necrosi (punteggio di necrosi = NS) (punteggio 0-3) e la presenza di un processo infiammatorio infiltrativo (FIIS), valutato secondo il seguente punteggio: da 0 a 3 cellule infiammatorie per campo a 40x (punteggio 0); da 3 a 5 cellule per campo (punteggio 1); da 5 a 15 cellule per campo (punteggio 2); oltre 15 cellule per campo (punteggio 3). Il punteggio istologico finale è stato quindi espresso come somma dei tre punteggi (FOS + FES + FIIS + NS). Gli stessi parametri di valutazione sono stati adottati in conformità con studi precedenti sulla riparazione dei tendini.

Per quanto riguarda le sezioni tissutali consecutive, diversamente dalle sezioni per la valutazione con H&E, sono state eseguite analisi istochimiche utilizzando la colorazione policromatica di Herovici per la pre-collagene e la differenziazione del collagene. Tale procedura consente ai tendini normali di rivelare una composizione omogenea di collagene fibroso maturo e intensamente colorato di rosso, e un allineamento ottimale delle fibre collagene senza infiltrazione di cellule infiammatorie tra le fibre.

6.1.11.8 Valutazione immunoistochimica

Abbiamo deparaffinizzato i tagli di 4 µm di spessore con bagni successivi di xilene e successivamente risciacquati tre volte in alcool puro e lavati in soluzioni con concentrazione di alcool decrescente (95% e 85%) prima di procedere all'incubazione degli anticorpi primari per COL1, COL3, TGF-β1 e Fattore VIII. Abbiamo bloccato l'attività perossidasi endogena utilizzando perossido di idrogeno (3%) in metanolo per 20 minuti, quindi risciacquati 10 volte con acqua distillata. Dopo il blocco della perossidasi, siamo passati a bloccare il legame non specifico con 3% di latte in polvere per 1 ora in un'incubatrice a 27°C, quindi risciacquati i vetrini con soluzione TRIS. Dopo la disidratazione, abbiamo sistemato le sezioni in un tampone di EDTA, pH 9.0, e poi in un forno a microonde a 650 W per due cicli di 10 minuti per promuovere l'antigenicità. I vetrini sono stati lasciati raffreddare a temperatura ambiente per almeno 20 minuti prima di essere incubati con sieroma normale di capra (Sigma), per ulteriori processi di incubazione

degli anticorpi primari. Gli anticorpi primari erano gli anticorpi monoclonali (mAbs) e policlonali (pAbs), utilizzati in sezioni seriali: pAb anti-collagene di tipo I di coniglio (Chemicon, Temecula, California), pAb anti-collagene di tipo III di coniglio (Chemicon, Temecula, California), pAb anti-TGF- β 1 di coniglio (Abcam, Cambridge, Regno Unito; ab92486), mAb anti-vimentina di topo (Dako, Glostrup, Danimarca, clone V9) e pAb anti-antigene correlato al Fattore VIII di coniglio (CliniSciences, Guidonia, Italia, Cat# RP012-05). Anticorpi primari specifici sostituiti con TBS o sieri non immuni sono stati adottati come controlli negativi utilizzando procedure immunoistochimiche. Abbiamo posizionato le sezioni tissutali in un'incubatrice a camera umida per una notte a 4°C utilizzando diversi anticorpi primari, diluiti 1:50 in soluzione tampone Tris (TBS) con il 0,1% di albumina di siero bovino cristallina (BSA). Abbiamo rilevato il legame degli anticorpi utilizzando tecniche ABC-perossidasi (Vector Laboratories Inc, Burlingame, California) con 1:200 di biotina coniugata a IgG anti-coniglio (Vector Laboratories Incorporated, Burlingame, California) e 1:200 di biotina coniugata a IgG anti-topo (AO433; DAKO, Glostrup, Danimarca), somministrato come anticorpo secondario a temperatura ambiente per un intervallo di 45 minuti. Abbiamo generato la reazione enzimatica utilizzando diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St. Louis, Missouri) come substrato per la procedura ABC-perossidasi, con ematossilina di Meyer come controcolorante nucleare. La valutazione immunoistochimica ha incluso l'espressione predominante del collagene di tipo I o III nelle sezioni di tessuto tendineo difettoso e sano, neoformazione microvascolare positiva per FVIII, espressione di TGF- β 1 e la presenza di fibroblasti colorati positivi per vimentina, diffusi o localizzati in modo perivascolare nella zona lesionata, indicando potenziale rigenerazione/riparazione del CCT, valutata a 100 \times . Il punteggio della valutazione semiquantitativa riguardo la reazione immunoistochimica negli antigeni è stato il seguente: 0 (assenza di espressione antigenica), 1 (espressione antigenica debole e puntuale), 2 (espressione antigenica debole ma profusa in tutto il campione), e 3 (espressione antigenica profusa e marcata). Le valutazioni istologiche e immunoistochimiche sono state eseguite in cieco e condotte interamente da due operatori, un patologo esperto e un assistente.

6.1.11.9 Analisi rt-PCR

Per l'isolamento dell'RNA totale dalle biopsie è stato utilizzato il RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germania); è stata effettuata una digestione DNase utilizzando l'RNase-Free DNase Set (Qiagen). Ottocento nanogrammi di RNA totale da tutti i campioni sono stati retrotrascritti utilizzando un kit RT2 First Strand (Qiagen Sciences, Germantown,

Maryland). La PCR in tempo reale è stata eseguita seguendo le istruzioni fornite nel Rat Wound Healing RT2 Profiler PCR array (SABiosciences, Frederick, Maryland), impiegando il RT2 SYBR Green ROX FAST Mastermix (SABiosciences). Abbiamo eseguito cicli termici e rilevazione della fluorescenza tramite Rotor-Gene Q 100 (Qiagen), analizzando i dati con modelli di analisi dati per array PCR basati su Excel (SABiosciences). Abbiamo riportato i risultati come espressione di ciascun gene target nei campioni raccolti al T2 per entrambi i gruppi e confrontato i risultati con l'espressione di GPDH.

6.1.11.10 Analisi biomeccanica

I campioni ($n = 4$) di entrambi i gruppi selezionati randomicamente all'inizio dello studio sono stati analizzati (T2). Il tendine con l'osso calcaneale attaccato è stato isolato dai tessuti circostanti e rimosso. Sono stati mantenuti a -70°C fino all'inizio della procedura di test. Pertanto, l'estremità distale dell'osso è stata collocata in cemento osseo e saldamente fissata alla macchina di prova. L'estremità prossimale è stata pulita dai tessuti muscolari e quindi fissata alla macchina di prova mediante un'apposita pinza metallica. La lunghezza libera rimanente di tutti i campioni è stata regolata a 6 cm. La forza di rottura totale e specifica (N/mm^2) è stata valutata utilizzando una macchina di prova uniaxiale con strutture di documentazione analoghe (Zwick 7025-3, Zwick, Ulm, Germania). Prima che le misurazioni venissero effettuate, i campioni sono stati pre-caricati per 1 minuto con 10 N. La velocità di spostamento è stata di 6 mm/min. I campioni sono stati mantenuti umidi durante tutto il periodo del test con soluzione isotonica di NaCl.

6.1.12 Modello Animale in vitro: Trattamento dell'osteoartrite nei cani

6.1.12.1. Criteri di Idoneità e Reclutamento dei Cani

Quarantadue cani da compagnia colpiti da osteoartrite sono stati referiti dal Policlinico Veterinario dell'Università di Camerino e arruolati nello studio con il consenso dei loro proprietari. I criteri di idoneità includevano cani di età compresa tra 1 e 15 anni, senza restrizioni di peso e sesso, appartenenti alla classe di rischio anestesilogico ASA 1–2; assenza di comorbidità, gravidanza o allattamento; affetti da zoppia manifesta in una sola articolazione causata da osteoartrite; assenza di osteoartrite in altre articolazioni dello stesso arto; appartenenza a un grado radiografico di osteoartrite compreso tra 1 e 4 (secondo una scala di Kellgren-Lawrence modificata); e non aver ricevuto farmaci antinfiammatori né nutraceutici nei 15 giorni precedenti l'arruolamento nello studio. L'intera coorte di pazienti che ha concluso lo studio ha dovuto seguire una terapia di

gestione dopo aver ricevuto il trattamento, limitando le attività non controllate, favorendo passeggiate al guinzaglio ed evitando nutraceutici o farmaci antinfiammatori. I pazienti che richiedevano l'assunzione di antinfiammatori sono stati esclusi dalla ricerca. Inoltre, per evitare cambiamenti significativi nel peso corporeo durante il periodo di studio, tutti i pazienti sono stati sottoposti a una dieta controllata, favorendo la somministrazione di cibo commerciale razionato secondo le indicazioni fornite sulla confezione.

6.1.12.2 Procedure del Trial Clinico

I cani arruolati sono stati divisi casualmente in gruppi uguali di 20 pazienti, un gruppo di studio e un gruppo di controllo, che differivano solo per le terapie intra-articolari ricevute. Sono stati raccolti dati anamnestici e la percezione del dolore da parte dei proprietari, tramite il Canine Brief Pain Inventory (CBPI). Successivamente, un clinico specialista ha eseguito una visita generale e ortopedica, compilando una scheda clinica. Dopo la valutazione clinica, è stato eseguito un esame radiografico sotto anestesia per confermare e classificare l'OA. Durante la sedazione, l'articolazione interessata è stata trichotomizzata e il liquido sinoviale è stato raccolto tramite articolocentesi per un'analisi citologica qualitativa. Il residuo di liquido sinoviale è stato conservato in un congelatore a -80 °C per quantificare la concentrazione di citochine sinoviali. Ogni paziente ha seguito lo stesso protocollo anestetico per la radiografia, la terapia intra-articolare e la valutazione sinoviale, come riportato nel paragrafo appropriato. Al tempo 0 (T0), l'intera popolazione dello studio è stata trattata con un'unica iniezione intra-articolare, utilizzando prodotti diversi a seconda del gruppo designato. Le valutazioni cliniche, radiografiche e del liquido sinoviale sono state effettuate a T0 e ripetute dopo 30 (T1) e 60 (T2) giorni in entrambi i gruppi. Dopo 180 giorni (T3), la coorte di pazienti è stata riesaminata per raccogliere dati relativi alla percezione del dolore da parte del proprietario, attraverso il Canine Brief Pain Inventory (CBPI), e hanno partecipato a una successiva visita specialistica ortopedica finale. Un riepilogo delle tempistiche delle procedure terapeutiche e di valutazione è riportato nella **Figura 50**.

6.1.12.3. Terapia del Gruppo di Controllo (Gruppo Ialuronico)

Al T0, i cani arruolati in modo casuale in questo gruppo hanno ricevuto un'unica iniezione intra-articolare di acido ialuronico ad alto peso molecolare (650 kDa) (20 mg/2 mL Hyalgan®, Fidia Farmaceutici S.p.A., Abano Terme, Italia). Il dosaggio del prodotto variava tra 1 e 2 mL: questo è stato ottimizzato secondo l'articolazione interessata e la costituzione del paziente per non sovraccaricare la capsula articolare, causando dolore nei

giorni successivi al trattamento. La procedura è stata eseguita utilizzando buone pratiche igieniche e asettiche.

Trial Procedure	T0 (Start Trial)	T1 (30 Days)	T2 (60 Days)	T3 (180 Days)
Canine Brief Pain Inventory	X	X	X	X
Specialistic clinician assessment	X	X	X	X
Radiographic examination	X	X	X	
Synovial fluid examination	X	X	X	
Synovial Assay Test	X	X	X	
Intra-articular injection control group	X			
Intra-articular injection study group	X			

Fig. 50: Riepilogo e tempistiche delle procedure dello studio clinico.

6.1.12.4. Terapia del Gruppo di Studio (mFAT)

Al T0, i pazienti di questo gruppo di studio hanno ricevuto il trattamento Rigenera® (HBW, Torino, Italia). Dopo l'anestesia, è stata eseguita una tricotomia nella regione della colonna lombare, prendendo la quinta vertebra lombare come punto di riferimento anatomico. Ogni cane è stato posizionato in posizione sternale, e la pelle del sito chirurgico è stata preparata in modo antisettico. Dopo una normale medicazione sterile, il chirurgo ha effettuato un'incisione con una lama di scalpello #15, che ha consentito l'introduzione di un cannula di infiltrazione smussa. L'infiltrazione preparatoria del tessuto adiposo è stata eseguita utilizzando una tecnica a ventaglio su piani diversi, facendo attenzione a distribuire omogeneamente la soluzione di Klein nel grasso sottostante. Dopo alcuni minuti, è stata utilizzata una cannula per lipoaspirazione smussa, dotata di una siringa Luer-Lock da 50 mL sotto aspirazione. La stessa tecnica a ventaglio è stata utilizzata durante la lipoaspirazione. Una volta ottenuto il tessuto adiposo, questo è stato disgregato mediante il dispositivo RigeneraCons® (HBW, Torino, Italia), ottenendo un tessuto adiposo microframmentato (mFAT). Il mFAT è stato successivamente utilizzato intra-articolare nell'articolazione patologica del paziente; sono stati utilizzati approssimativamente 1–2 mL di mFAT per ciascuna articolazione.

6.1.12.5. Canine Brief Pain Inventory

Il Canine Brief Pain Inventory (CBPI) (Brown D et al., J Am Vet Med Assoc 2008) consente ai proprietari di valutare la gravità del dolore che percepiscono nel loro cane e il grado di influenza che questo dolore ha sulla qualità della vita dell'animale. Questo questionario contiene quattro voci relative alla gravità del dolore del cane e sei voci che descrivono come quel dolore interferisce con le attività quotidiane del cane, per un totale di 10 voci a cui il proprietario deve rispondere. Ogni voce del dolore del CBPI viene

presentata con scale di valutazione numerica da 0 a 10, dove 0 rappresenta nessun dolore e 10 rappresenta un dolore estremo.

6.1.12.6. Esame Clinico

Quest'area dell'esame è stata effettuata dal capo chirurgo ortopedico dell'Università di Camerino, il quale richiedeva la compilazione di un modulo clinico specifico basato sul sistema di classificazione della zoppia modificato da Vesseur (Vesseur PB et al, J Am Vet Med Assoc 1995). Questa scheda clinica contiene diversi campi da compilare utilizzando una scala numerica da 1 (assenza di evidenze cliniche di zoppia) a 5 (zoppia non portante). I campi sono divisi in zoppia durante la fase di camminata, in stazionamento, dolore alla palpazione e valutazione dell'arto controlaterale. Per ciascun cane, lo specialista ha compilato la sensazione di dolore del paziente durante un'ispezione preliminare utilizzando la scala del dolore analoga visiva (VAS) (Hudson JT et al, Am J Vet Res 2004), che ha la stessa scala di severità numerica del CBPI, da 0 a 10. L'esame della scheda clinica ha incluso anche una misurazione del range di movimento dell'articolazione interessata, misurata tramite un goniometro ortopedico; la circonferenza dell'arto, misurata con un metro a nastro; e il Body Condition Score (BCS) di ciascun paziente.

6.1.12.7. Esame Radiografico

L'esame radiografico viene utilizzato per confermare la diagnosi di osteoartrite e ottenere proiezioni ortogonali dell'articolazione coinvolta nel processo patologico. Lo studio è stato riportato dal capo dell'Unità di Radiologia del Policlinico Veterinario dell'Università di Camerino, il quale ha attribuito in cieco a ciascun paziente un grado di osteoartrite secondo una scala di Kellgren–Lawrence modificata (Kohn MD et al, Clin Orthop Relat Res 2016), considerando diversi segni radiografici, inclusa la presenza di osteofiti, sclerosi ossea, restringimento e/o incongruenza articolare e presenza di ectasia capsulare (Figura 51).

Radiographic Sign	0	1	2	3	4
Osteophytes	Absence	<1 mm	1–2 mm	2–3 mm	>3 mm
Bone sclerosis	Absence	Localized	Pervasive		
Joint narrowing and/or incongruence	Absence	Mild <25%	Moderate 25–50%	Serious >50%	Joint deformity
Capsular ectasia	Absence	Evident			
Final Score	0	1–3	4–6	7–9	>10
Oa Grade	0	1	2	3	4

Fig. 51: Scala radiografica modificata

Il grado di osteoartrite è stato attribuito mediante una scala numerica da 0 (assenza di osteoartrite) a 4 (massimo grado di osteoartrite), stabilita sulla base dell'intervallo determinato dal calcolo del punteggio totale.

6.1.12.8 Esame del Liquido Sinoviale

Al momento del trattamento (T0) e dopo 30 (T1) e 60 (T2) giorni, è stata prelevata un'aliquota di liquido sinoviale per l'analisi citologica. Nell'Unità di Patologia Veterinaria dell'Università di Camerino, dopo una valutazione generale delle concentrazioni e dell'aspetto del liquido, è stata eseguita un'analisi citologica in cieco nel tentativo di ottenere un grado di osteoartrosi, considerando la concentrazione citologica, i tipi cellulari infiammatori e la presenza e le modifiche delle cellule appartenenti a sinovia, cartilagine e, eventualmente, osso. Per generare un punteggio citologico, sono stati considerati vari parametri, inclusa la prevalenza di cellule infiammatorie, la presenza e la morfologia delle cellule sinoviali, e frammenti di cartilagine, contaminazione ematica e pattern di scorrimento relativo alla qualità della matrice. Per ciascun parametro valutato è stato assegnato un punteggio numerico da 1 a 3 in base alla severità progressiva del parametro.

Cytologic Sign		1	2	3
Inflammatory cells		Absence	Average prevalence	High prevalence
Synovial cells		Absence	Average prevalence	High prevalence
Cartilage fragments		Absence	Average prevalence	High prevalence
Blood contamination		Absence	Average prevalence	High prevalence
Matrix		Absence	Average prevalence	High prevalence
Final Score	1-2	3-5	6-9	>10
Synovial Score of OA	1	2	3	4
	Paraphysiological synovial fluid	Mild inflammation of the synovial fluid	Medium inflammation of the synovial fluid	Severe inflammation of the synovial fluid

Fig. 55: Punteggio citologico per la valutazione del liquido sinoviale nei cani con artrosi (OA).

Come riportato nella **Figura 52**, una combinazione di queste diverse classificazioni ha prodotto un punteggio finale per ciascun campione variabile da 1 a 4. In breve, ciascun valore rifletteva la descrizione del liquido sinoviale valutato secondo la seguente interpretazione: 1 = parafisiologico; 2 = lieve; 3 = moderato; e 4 = grave infiammazione della sinovia.

6.1.12.9 Dosaggio delle Citochine Sinoviali

Dopo la valutazione citologica, le aliquote rimanenti di liquido sinoviale, ottenute dai cani campionati a T0, T1 e T2, sono state utilizzate per valutare la concentrazione di tre citochine (TNF α , IL-6 e IL-1 β) tramite kit ELISA canini Nori® (Genorise Scientific Inc., Glen Mills, PA, USA), secondo i protocolli del produttore. Questi tre biomarcatori sono stati scelti sulla base della letteratura precedente che sostiene la presenza costante di queste tre citochine e la loro concentrazione in relazione alla gravità dell'OA (Haraden CA et al, *Arthritis Res Ther* 2019; Udomsinprasert W et al, *Sci Rep* 2020; Watkins A et al, *BMC Vet Res* 2021). Nel nostro studio, ciascuna aliquota di liquido sinoviale è stata prima utilizzata per la valutazione del TNF- α e successivamente per l'IL-6 e l'IL-1 β .

6.1.13 Isolamento di Esosomi derivati da ASCs

Le cellule Staminali Mesenchimali derivate da Adiposo umano (hMSCs; ScienCell Research Laboratories, Inc., CA, USA) alla passaggio 2 (p2) sono state seminate a una densità di 5×10^5 cellule in bioreattori 3D portatili (VITVO®; Rigenerand Srl, Medolla, MO, Italia). I bioreattori sono stati mantenuti a 37 °C e 5 % di CO₂ per un periodo di 14 giorni. Il mezzo di coltura è stato costituito dal Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific), integrato con siero bovino fetale privato di esosomi (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germania). Il mezzo condizionato è stato raccolto a intervalli regolari fino ai 14 giorni. Questo è stato centrifugato a 300 \times g per 10 minuti, filtrato attraverso un filtro da 0,22 μ m, trasferito in dispositivi centrifughi Amicon Ultra-15 da 100 kDa (filtro centrifugo Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-PL PLGC da 100 kDa; Millipore, MA, USA) e centrifugato a 2000 \times g per 20 minuti a +4 °C. Il filtrato è stato lavato con soluzione salina tamponata con fosfato sterile (PBS; Euroclone, Milano, Italia) attraverso un'ulteriore centrifugazione a 2000 \times g per 20 minuti a +4 °C. Gli hMSC-EXOs sono stati infine recuperati dall'unità di filtrazione e immediatamente conservati a -80 °C.

6.1.14 Analisi di Maratori di superficie esosomiale tramite citometria a flusso

La sospensione di esosomi è stata incubata con perline magnetiche CD81 (Exosome-Human CD81 Flow Detection (da coltura cellulare); Thermo Fisher Scientific). Gli esosomi isolati, positivi per CD81, sono stati successivamente etichettati con anticorpi monoclonali murini anti-umani CD63 (anticorpo monoclonale PE murino anti-umano CD63; eBioscience™, Thermo Fisher Scientific) o con anticorpi monoclonali murini anti-umani CD81 (anticorpo monoclonale PE murino anti-umano CD81, BD Pharmingen™,

BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Un controllo negativo è stato eseguito colorando PBS (veicolo) invece degli esosomi. Gli esperimenti di citometria a flusso sono stati condotti utilizzando il citometro a flusso Attune™ NxT Acoustic Focusing (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e i dati sono stati analizzati mediante il software Attune NxT versione 2.5 (Life Technologies) [Gardin C et al., *Nanomaterials*, 2021].

6.1.15 Distribuzione della dimensione delle particelle e concentrazione

Il diametro medio degli hMSC-EXOs è stato valutato tramite Sensing a Pulsazione Resistiva Regolabile (TRPS). Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando lo strumento qNano (IZON Science, Oxford, Regno Unito) dotato di membrana NP150, mantenendo una pressione di 20 mbar. L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state effettuate utilizzando il software Izon Control Suite versione V3.3 [Chachques JC et al., *Biomedicines*, 2021]. Per misurare la concentrazione delle proteine esosomiali, è stato utilizzato un BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), seguendo il protocollo del produttore.

6.1.16 Incorporazione e rilascio degli hMSC-EXOs

Per rilevare la presenza di hMSC-EXOs nei fibroblasti dermici umani (HDF), gli esosomi sono stati etichettati con il colorante fluorescente verde PKH67 (eccitazione 490 nm, emissione 502 nm; PKH67 Green Fluorescent, Sigma-Aldrich) prima dell'incorporazione. I campioni sono stati poi analizzati mediante microscopia confocale Nikon A1 (Nikon Corporation) con un obiettivo 63×. Il profilo di rilascio degli hMSC-EXOs dalle HDF è stato valutato posizionando i patch funzionalizzati in una piastra a 24 pozzetti contenente mezzo di coltura privo di siero per un massimo di 12 giorni. Successivamente, i campioni sono stati prelevati a tempi prestabiliti e conservati a -80 °C fino al completamento della raccolta. Gli esosomi rilasciati dalle HDF sono stati quantificati utilizzando il BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), seguendo le istruzioni del produttore.

6.1.17 Misurazioni di Ca²⁺

Misurazione dell'aequorina. Le misurazioni delle concentrazioni di Ca²⁺ mitocondriali sono state effettuate come precedentemente descritto [Pinton P et al., *Methods Cell Biol*, 2007]. In sintesi, le cellule sono state seminate su vetrini di vetro da 13 mm e lasciate crescere fino al 75% di confluenza. A questo punto, si è proceduto alla trasfezione con 4 mg di aequorina mirata ai mitocondri. Dopo 36 ore dalla trasfezione, per ottenere la forma attiva dell'aequorina, le cellule sono state incubate per 2 ore a 37 °C in KRB (Krebs-Ringer modified buffer: NaCl 125 mM, KCl 5 mM, Na₃PO₄ 1 mM, MgSO₄ 1 mM,

glucosio 5,5 mM, HEPES 20 mM, pH 7.4) integrato con 5 mM coelenterazina. Tutte le misurazioni sono state eseguite utilizzando un luminometro automatizzato (MicrobetaJET, PerkinElmer, CA, USA). È stata quindi iniettata una soluzione di KRB contenente acido ialuronico (HA) e ASCs-EXO, e la luminescenza è stata registrata per 60 s. Per terminare gli esperimenti e scaricare l'aequorina residua ai fini della normalizzazione dei valori ottenuti, è stata iniettata una soluzione ipotonica contenente 500 mM digitonina e 50 mM CaCl₂. I risultati sono espressi come percentuale di sonda scaricata ± errore standard (SE). Questo è possibile in quanto, quando gli ioni di Ca²⁺ si legano a tre siti ad alta affinità (tipo EF-hand), l'aequorina subisce una reazione irreversibile, in cui viene emesso un fotone e la proteina risultante diventa inattiva (scaricata). Per convertire i dati di luminescenza dell'aequorina in valori [Ca²⁺], è stato utilizzato un algoritmo informatico basato sulla curva di risposta al Ca²⁺ dell'aequorina, come precedentemente descritto [Pinton P et al., Methods Cell Biol, 2007]. Misurazioni di Fura-2/AM. Le concentrazioni di [Ca²⁺] citosolico libero sono state valutate utilizzando l'indicatore fluorescente di Ca²⁺ Fura-2/AM (Molecular Probes, Inc.). Brevemente, le cellule sono state incubate in mezzo integrato con 2,5 mM Fura-2/AM per 30 minuti, lavate con KRB per rimuovere la sonda extracellulare e collocate in una camera di incubazione termostatica a 37 °C sulla piattaforma di un microscopio a fluorescenza invertito (Zeiss Axiovert 200). L'imaging dinamico è stato eseguito utilizzando il software MetaFluor (Universal Imaging Corp.). La [Ca²⁺] è stata calcolata come precedentemente descritto [Grynkiewicz G et al., J Biol Chem, 1985].

6.1.18 Saggio di proliferazione cellulare

La proliferazione di fibroblasti e cellule endoteliali è stata valutata tramite saggio MTS (Colorimetric MTS Assay Kit; Abcam, Cambridge, Regno Unito). In sintesi, i fibroblasti dermici umani (HDF) e le cellule endoteliali umane (HUVEC) sono state seminate in piastre di coltura tissutale a 96 pozzetti a una densità di 1×10^5 cellule/cm² e 4×10^5 cellule/cm², rispettivamente. Dopo una notte di privazione nutrizionale, le cellule sono state trattate con il mezzo condizionato dai patch per 24 e 48 ore. Il reagente MTS è stato aggiunto a ciascun pozzetto e incubato per 3 ore in condizioni di coltura standard. L'assorbanza ottica (OD) è stata misurata a 490 nm utilizzando un lettore di piastre (MultiskanTM FC, Thermo Fisher Scientific).

6.1.19 Analisi dell'espressione genica

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania). La qualità e la concentrazione dell'RNA dei campioni sono state misurate con il NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Per la sintesi del cDNA a doppio filamento, 500 ng di RNA da HDF e HUVEC sono stati trascritti inversamente utilizzando il QuantiNova™ Reverse Transcription Kit (Qiagen) in un SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). La PCR in tempo reale è stata quindi eseguita per analizzare i livelli di espressione dei geni codificanti per i marcatori di fibroblasti o cellule endoteliali. La PCR in tempo reale è stata condotta utilizzando primer a una concentrazione di 700 nM e QuantiNova SYBR Green PCR (Qiagen) su un sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il metodo $2\Delta\Delta C_t$ avvalendosi del recettore della transferrina (TFRC) come riferimento interno. I dati sono presentati come cambiamento medio rispetto alla condizione di controllo (patch MeHA privi di esosomi).

6.2 IN VIVO

6.2.1 Design dello studio, popolazione e valutazione

È stato condotto uno studio prospettico, monocentrico e non comparativo in conformità con gli standard etici previsti dalla legislazione istituzionale e nazionale e in accordo con la Dichiarazione di Helsinki riguardo alla sperimentazione umana. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato e il presente studio è stato approvato dal Comitato Etico della Regione Marche (protocollo n. 154/2021). L'artrosi dell'articolazione basale del pollice è stata definita secondo i criteri dell'American College of Rheumatology per l'artrosi delle mani (Altman R et al., *Arthritis Rheum*, 1990) o come la presenza di anomalie strutturali. Tra il 2020 e il 2022, i pazienti sono stati arruolati consecutivamente se diagnosticati con osteoartrite della base del pollice non necessitante trattamento chirurgico e che fornivano consenso informato scritto. Lo studio ha incluso pazienti di età compresa tra i 45 e i 70 anni, con segni clinici di osteoartrite basale del pollice, confermati da radiografie di stadio Eaton I o Eaton II, e con una storia di trattamento conservativo non efficace per almeno 6 mesi. I criteri di esclusione includevano: 1. Iniezioni intra-articolari di steroidi o di viscosupplementazione; 2. Chirurgia pregressa sull'articolazione basale del pollice; 3. Malattie sistemiche non controllabili e non gestibili; 4. Malattie reumatiche; 5. Patologie concomitanti (ad esempio, tendinopatie adiacenti, sindrome del tunnel carpale).

6.2.2 Procedura chirurgica per il prelievo dei microinnesti adiposi

Il paziente è stato posizionato supino. Dopo l'anestesia locale, è stata effettuata una piccola incisione per inserire una cannula a punta smussata (collegata a una siringa Luer-lock da 60 cc), e una soluzione sterile di Klein (contenente soluzione salina e lidocaina) è stata iniettata nel tessuto adiposo sottocutaneo (della regione addominale o della regione della coscia). È stato quindi prelevato un volume di tessuto adiposo (circa 30 ml). La procedura chirurgica richiede due fasi: liposuzione e disaggregazione del tessuto in microinnesti adiposi. Il tessuto lipoaspirato di 4 ml è stato triturato con lame usando Rigeneracons® (Human Brain Wave S.r.L., Via Pinerolo, Torino, Italia), aggiungendo 4 ml di soluzione salina, ottenendo circa 6-7 ml di tessuto adiposo micro-frammentato, pronto per l'uso.

6.2.3 Procedura chirurgica per l'iniezione del tessuto adiposo micro-frammentato

Prima dell'iniezione, la pelle è stata sterilmente preparata e l'iniezione di 2-3 ml di microinnesti adiposi è stata eseguita nell'articolazione CMC con un approccio superolaterale, sotto guida fluoroscopica e utilizzando un ago monouso da 20G e una siringa Luer-Lock da 3 ml.

6.2.4 Valutazione radiografica

Le proiezioni radiografiche antero-posteriori, laterali e oblique del pollice aiutano a confermare la diagnosi (Batra S e Kanvinde R, Orthopaedics and Trauma, 2007). I risultati coerenti con l'artrosi includono il restringimento dello spazio articolare (JSN) e osteofiti, oltre a sclerosi subcondrale e cisti, che possono essere utilizzati per classificare la malattia secondo la classificazione di Eaton e Littler (Cook GS and Lalonde DH, Plast Reconstr Surg, 2008).

6.2.5 Protocollo post-operatorio

Alla fine della procedura chirurgica e prima della dimissione, tutti i pazienti sono stati valutati per l'ispezione delle ferite e muniti di un tutore termoplastico, immobilizzando il primo metacarpo per due settimane. Successivamente, sono stati sottoposti a un tutore in neoprene morbido per una durata di 14 giorni. Sono stati iniziati esercizi di mobilizzazione leggera sotto la supervisione di terapisti della mano. Ai pazienti è stato chiesto di evitare farmaci anti-infiammatori non steroidei per 14 settimane. Gli appuntamenti di follow-up presso la clinica di mano sono stati programmati per 6 settimane, 6 mesi e 1 anno dopo l'intervento.

6.2.6 Misure di esito

Gli esiti, prima e dopo un singolo trattamento, sono stati valutati da un unico team di terapia della mano (composto da terapeuta della mano e chirurgo della mano). Gli esiti riferiti dai pazienti includevano: (i) Il punteggio numerico (NRS) per il dolore è stato ampiamente utilizzato per valutare l'intensità del dolore clinico (Haefeli M e Elfering A, Eur Spine J, 2006).

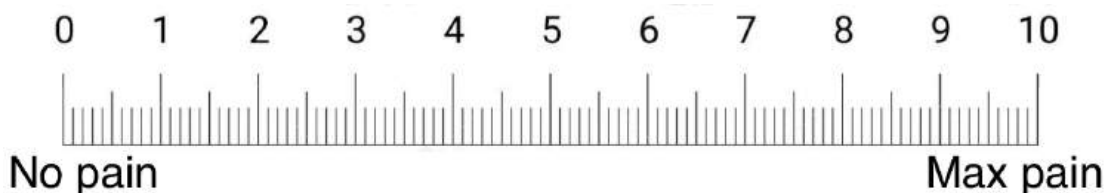


Fig 56. Sistema di punteggio NRS. I pazienti segnano un punto da 0 a 10, dove 0 indica nessun dolore e 10 rappresenta il dolore peggiore possibile.

L'intensità del dolore articolare è stata valutata su una scala di 100 mm al baseline, dopo 6 e 12 mesi di follow-up, dove 0 indica nessun dolore e 100 indica dolore estremo (**Figura 56**); (ii) Il Michigan Hand Outcomes Questionnaire (MHQ) è un questionario validato, in cui i pazienti valutano il proprio stato di salute della mano (Chung KC, J Hand Surg Am, 1998), le principali voci includono sei categorie (soddisfazione, dolore, lavoro, vita quotidiana, estetica, funzione). Il punteggio MHQ variava da 0 a 100, con punteggi più elevati che indicano una migliore funzione della mano. La flessione e l'estensione attiva dell'articolazione TMC sono state misurate con un goniometro e il range di movimento totale (ROM) è stato calcolato insieme al punteggio di opposizione di Kapandji (**Figura 57**). La misura della massima forza di presa è stata effettuata in posizione seduta standardizzata utilizzando un dinamometro Jamar per la valutazione dei test di pinza laterale, a punta e palmare (**Figura 58**).



Fig 58. Test di Kapandji. La misurazione utilizzando l'Indice di Kapandji prevede l'uso di punti di riferimento anatomici sulle dita e sul palmo, dove il clinico attribuisce un punteggio da 0 a 10.



Fig 59. (A) La pinza a punta è dal pollice alla punta dell'indice. (B) La pinza a chiave è dal falange pad del pollice all'aspetto laterale della falange media dell'indice. (C) La pinza a tre dita è dal falange pad del pollice ai pad dell'indice e del medio.

6.2.7 Analisi statistica

Le variabili continue sono state riportate come medie e deviazioni standard o mediane e intervalli interquartili (IQR) secondo la loro distribuzione, valutata tramite il test di normalità di Shapiro-Wilk. Le variabili categoriche sono state riportate come frequenze assolute e percentuali. Sono stati eseguiti modelli misti lineari (LMM) per stimare l'effetto longitudinale delle covariate sulla valutazione della forza con i test Tripod, Key, Tip e NRS. Il modello di regressione ad effetti misti utilizza tutti i dati disponibili e può contare correttamente la correlazione tra misurazioni ripetute. Le covariate incluse nel modello erano il gruppo di trattamento (cioè, gruppi trattati e controlaterali) e i punti temporali come variabile categorica e la loro interazione. Per il test dell'effetto dei gruppi, è stato eseguito il test post-hoc di Tukey. Per il NRS sull'attività, il punteggio di opposizione del pollice (cioè, punteggio di Kapandji) e i punteggi MHQ, è stato utilizzato un modello ANOVA per misure ripetute con p-valore rettificata secondo l'approccio di Bonferroni.

CAPITOLO 7

RISULTATI

7.1 IN VITRO

7.1.1 Saggio di vitalità cellulare

La vitalità cellulare al tempo T0 e T72h per ciascun metodo è riassunta nella **Figura 60**.

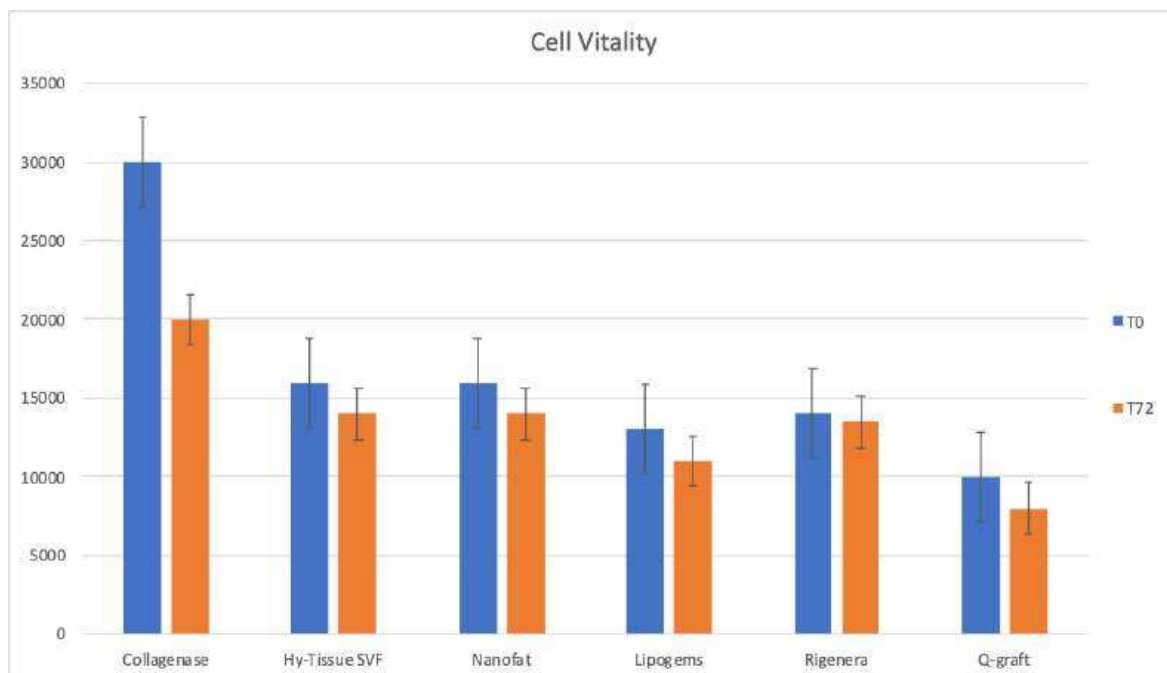


Fig. 60: Valori di vitalità cellulare (media dei campioni) a T0 e T72h. La vitalità cellulare del SVF ottenuto mediante collagenasi era significativamente superiore rispetto a quella dei metodi meccanici. Tuttavia, la procedura enzimatica è stata l'unico metodo caratterizzato da una significativa diminuzione della viabilità cellulare a 72 ore. Il mezzo di coltura è stato sostituito due volte a settimana con DMEM supplementato con il 10% di Siero Fetale Bovino (FBS) e l'1% di penicillina-streptomicina (tutti Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Paisley, Regno Unito), seminate in piastre a 96 pozzetti (100 µl/pozzetto) e conservate in un'incubatrice umidificata a 37°C con il 5% di CO2 per valutare la viabilità.

Sono stati riportati i valori medi di viabilità cellulare ottenuti da ogni metodo. Al tempo T0, il conteggio cellulare risultava statisticamente superiore per la tecnica di isolamento enzimatica rispetto agli altri metodi meccanici. Inoltre, al tempo T72h, la vitalità cellulare risultava statisticamente inferiore solo per il metodo Collagenasi rispetto a T0, mentre la differenza negli altri gruppi risultava statisticamente non significativa.

7.1.2 Capacità di proliferazione cellulare

Il tasso di replicazione era inferiore utilizzando i dispositivi meccanici: le cellule estratte hanno raggiunto la confluenza in 20 ± 1.6 , 21 ± 1.4 e 27 ± 3.7 giorni rispettivamente per il kit Rigenera, il kit Hy-Tissue SVF e il kit Lipogems, mentre, utilizzando il metodo enzimatico, ci sono voluti 12 ± 2.3 giorni come riportato nella Figura 4. Confrontando i diversi dispositivi enzimatici, la resa cellulare per Rigenera era superiore rispetto agli altri metodi meccanici, ma inferiore rispetto al metodo enzimatico (Rigenera +66.67% rispetto al metodo enzimatico; Hy Tissue SVF: +75% rispetto al metodo enzimatico; Lipogems:

+125% rispetto al metodo enzimatico), il quale ha dimostrato una resa cellulare più elevata e un tempo di raggiungimento della confluenza significativamente ridotto. In particolare, Rigenera ha richiesto un tempo maggiore per il raggiungimento della confluenza rispetto al metodo enzimatico, il quale ha permesso alle cellule di proliferare più rapidamente (**Figura 60ABC**).

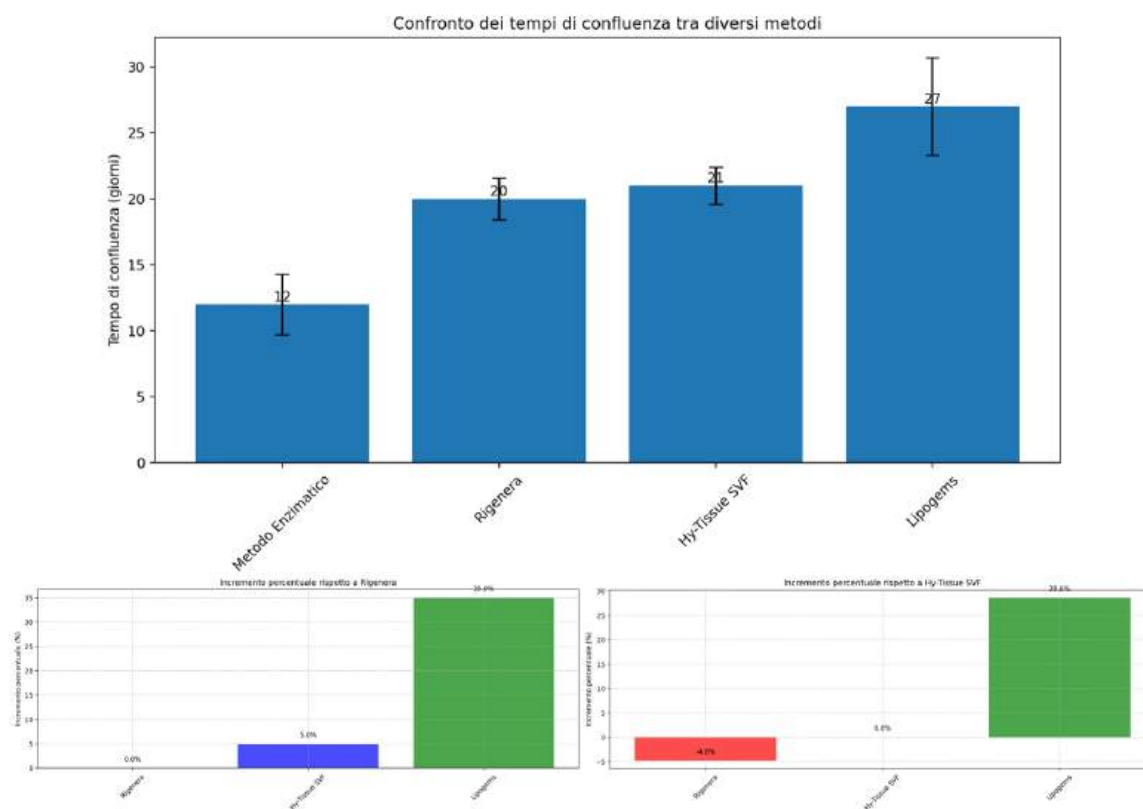


Fig.60: (A) Dal grafico si può chiaramente vedere come il Metodo Enzimatico sia significativamente più rapido rispetto agli altri metodi, mentre Lipogems richiede il tempo più lungo per raggiungere la confluenza. (B,C) Dal grafico si può osservare chiaramente che rispetto a Rigenera, Hy-Tissue SVF richiede un 5% di tempo in più, mentre Lipogems richiede un 35% di tempo in più; rispetto a Hy-Tissue SVF, Rigenera è più veloce del 4.76%, mentre Lipogems richiede un 28.57% di tempo in più. Questo visualizza efficacemente come Lipogems sia significativamente più lento rispetto agli altri due metodi, mentre Rigenera e Hy-Tissue SVF hanno performance temporali molto simili tra loro.

I risultati della capacità di proliferazione sono stati confermati da un saggio di tempo di raddoppiamento della popolazione (**Figura 60D**). Gli istogrammi mostrano che il tempo di raddoppiamento delle cellule ottenute dai dispositivi meccanici era comparabile (55.41 ± 2.8 h, 57.38 ± 3.9 h, 59.35 ± 2.8 h, , rispettivamente Rigenera, Hy Tissue SVF e Lipogems), mentre le cellule ottenute con digestione enzimatica hanno richiesto meno tempo per duplicare il loro numero (45.31 ± 3.95 h).

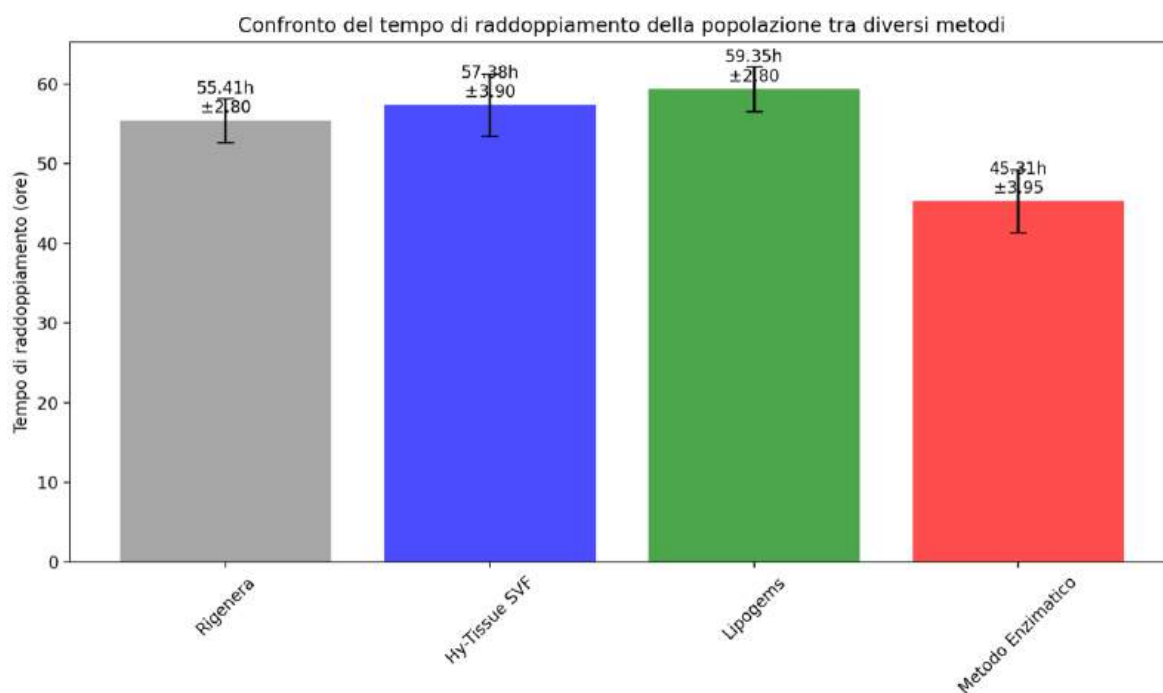


Fig.60D: Tempi di duplicazione delle cellule ottenute con i dispositivi meccanici e con la digestione enzimatica

I dati mostrano una chiara relazione tra i tempi di confluenza e i tempi di raddoppiamento della popolazione cellulare nei diversi metodi di processazione del tessuto adiposo. Questa correlazione è particolarmente significativa, con un coefficiente di correlazione di 0.97 (p-value < 0.05), indicando una forte associazione positiva tra le due misure (**Figura 61**).

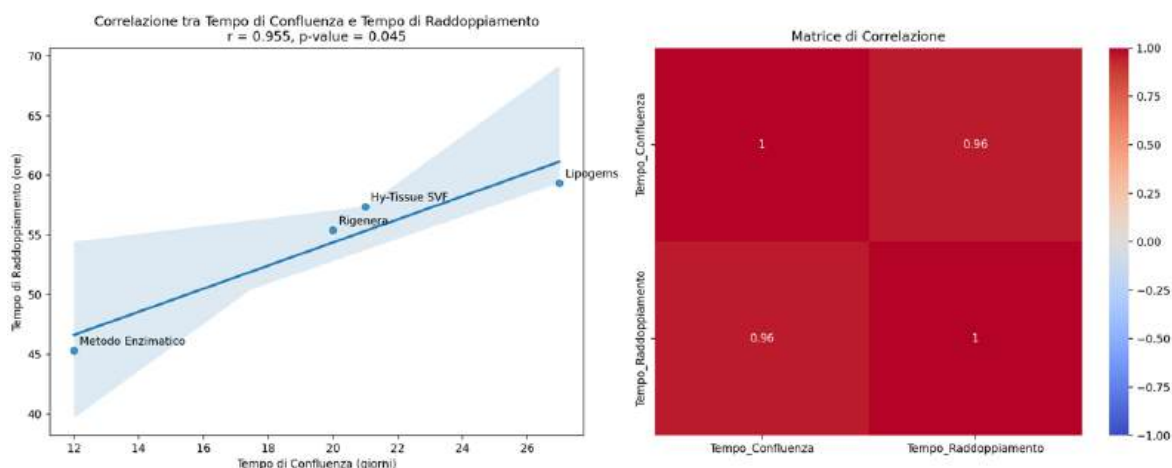


Fig 61: L'analisi mostra una forte correlazione positiva tra i tempi di confluenza e i tempi di raddoppiamento ($r = 0.97$, p-value < 0.05), come si può vedere nel grafico di dispersione a sinistra e nella matrice di correlazione a destra.

Confrontando i diversi metodi si evince che il metodo enzimatico si distingue come il metodo più efficiente che richiede solo 12 giorni per raggiungere la confluenza ed ha il tempo di raddoppiamento più rapido (45.31 ± 3.95 ore). Tale metodo serve come punto di riferimento per valutare l'efficienza degli altri metodi. Il kit Rigenera mostra performance intermedie tra i metodi meccanici, richiede il 66.7% di tempo in più per la

confluenza rispetto al metodo enzimatico ed il tempo di raddoppiamento aumenta del 22.3% (55.41 ± 2.8 ore), rappresentando un buon compromesso tra i metodi meccanici. Il kit Hy-Tissue SVF mostra performance simili a Rigenera, anche se leggermente più lente, necessita del 75% di tempo in più per la confluenza rispetto al metodo enzimatico ed un tempo di raddoppiamento aumentato del 26.6% (57.38 ± 3.9 ore), mostrando una variabilità leggermente maggiore nei tempi di raddoppiamento. Il kit Lipogems risulta il metodo più lento tra quelli analizzati, richiede il 125% di tempo in più per la confluenza rispetto al metodo enzimatico con un tempo di raddoppiamento aumentato del 31% (59.35 ± 2.8 ore), mostrando la maggiore variabilità nei tempi di confluenza (± 3.7 giorni). In generale, si osserva un graduale aumento dei tempi procedendo dal metodo enzimatico ai metodi meccanici con un incremento percentuale che è più marcato nei tempi di confluenza rispetto ai tempi di raddoppiamento

7.1.3 Immunofenotipo

L'analisi citofluorimetrica di un campione elaborato mediante metodo enzimatico e metodi meccanici è riportata di seguito. Curve non sovrapposte indicano una marcatura positiva, mentre curve sovrapposte indicano un valore negativo (Figura 62). L'analisi mediante citometria a flusso per Rigenera ha riportato un'alta positività per i marcatori delle cellule staminali mesenchimali (MSCs) includendo CD34 (35%), CD73 (60%), CD105 (70%), CD90 (70%), CD117 (29%) e CD29 (78%), mentre le cellule risultano negative per CD31 e CD45 (marcatori ematopoietici) rispetto alla digestione enzimatica. L'analisi mediante citometria a flusso per Hy-Tissue SVF ha riportato una percentuale di cellule CD34+ nella frazione SVF pari al $9.9 \pm 1.5\%$ rispetto alle cellule ottenute dopo digestione enzimatica del tessuto adiposo ($3.7 \pm 1.3\%$). Inoltre, è stata analizzata la frequenza delle cellule positive per CD73 e CD105 (marker delle cellule staminali mesenchimali) con una percentuale di espressione del $7.61 \pm 2.59\%$ e del $6.28 \pm 2.40\%$ per CD73 e CD105, rispettivamente. Per caratterizzare più a fondo la composizione cellulare della SVF ottenuta con il kit Hy-Tissue SVF, è stata effettuata la citometria a flusso, etichettando le cellule SVF con CD146 ($2.6 \pm 0.2\%$), CD116 ($0.7 \pm 0.1\%$), CD68 ($3.5 \pm 1.5\%$) e CD45 ($5.5 \pm 1.34\%$). Come previsto, la maggior parte delle cellule presenta un'espressione bassa per CD45, così come per CD34, e positive per marcatori associati alle MSC come CD105, CD90, CD73, CD29 e CD44 (Figura 63).

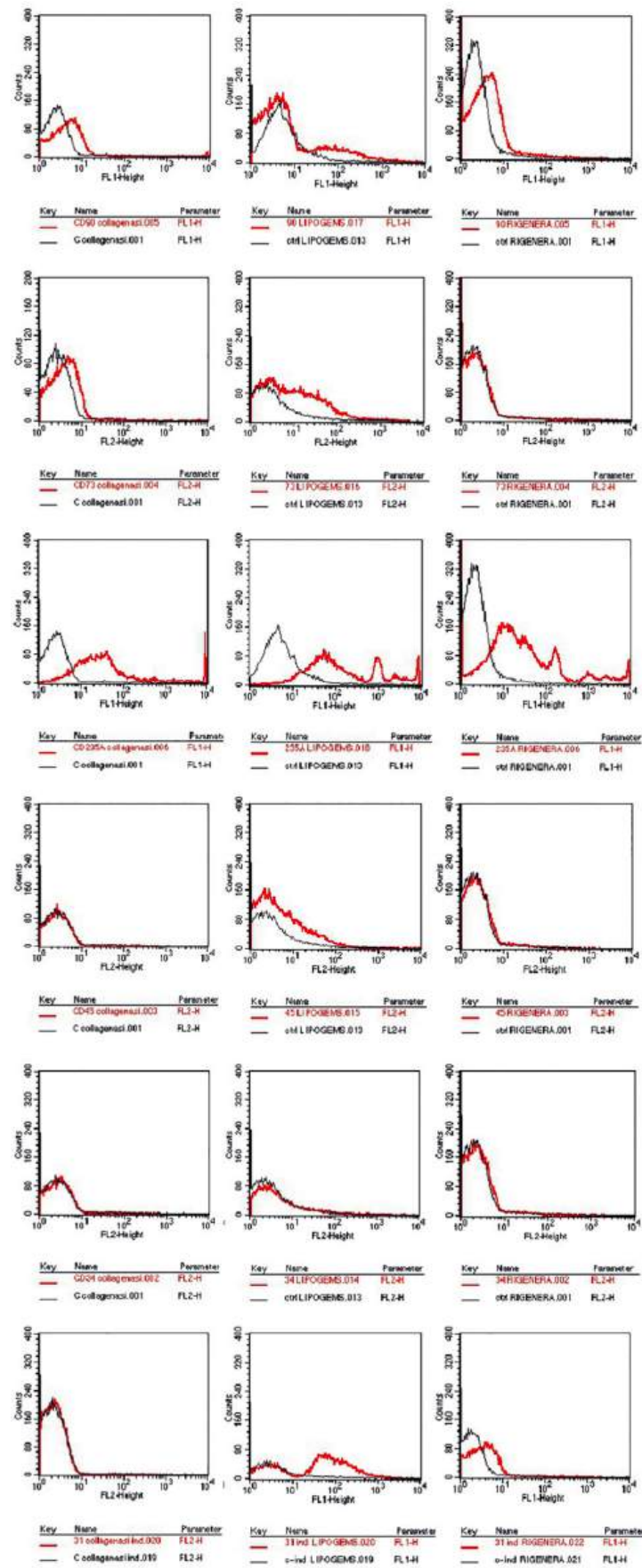


Fig 62: CD expression marker of one sample chosen randomly, showed as exemplification. In the first column the enzymatic technique reveals CD90, 73, 235a+, and CD45, 34, 31-. For the mechanical techniques, in the second Lipogems system CD90, 73, 235a, 45, 31+, and CD34-. Rigenera system in the last column CD90+, 73-, 235a+, and CD45-, 34-, 31+.

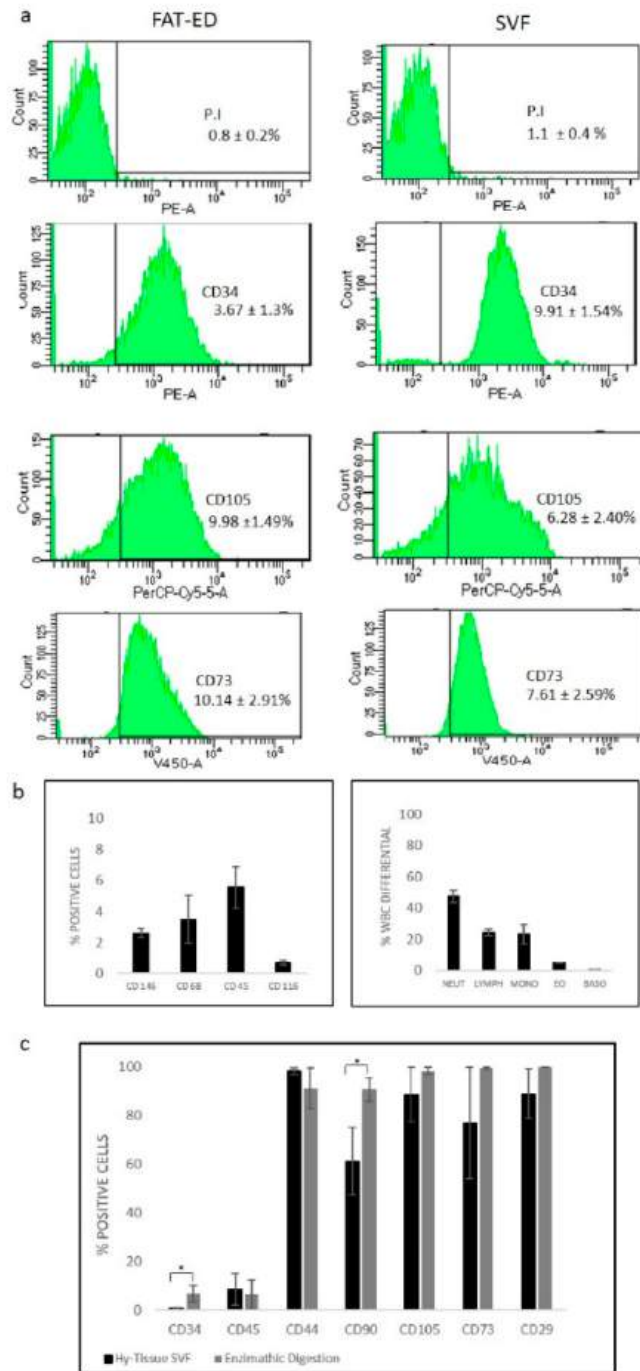
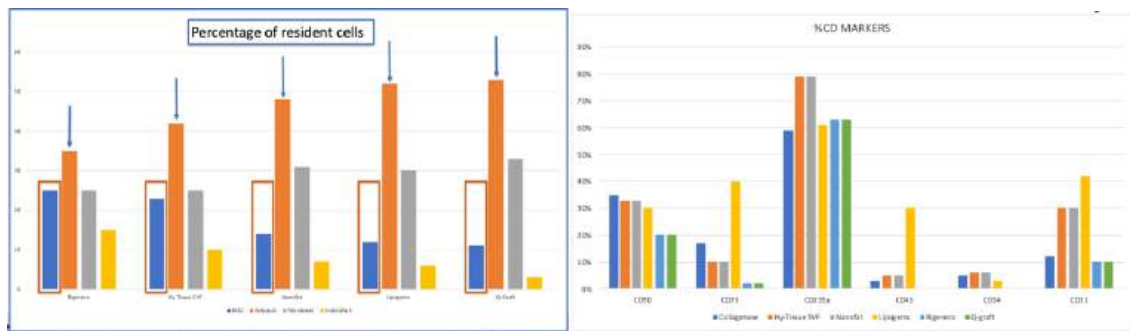


Fig. 63 Espressioni dei marcatori superficiali rilevati mediante analisi citometrica a flusso (A) di cellule libere provenienti da Hy-Tissue SVF o digestione enzimatica. (B) Percentuale di cellule positive ai marcatori CD per caratterizzare le subpopolazioni cellulari in Hy-Tissue SVF (a sinistra). (C) Percentuale di cellule positive ai marcatori CD (come media dei campioni) dopo l'espansione cellulare in vitro per Hy-Tissue SVF o digestione enzimatica. I risultati sono presentati come media e barre di errore di una deviazione standard; le differenze statistiche significative sono indicate con “*”, p-value < 0.05.

La percentuale di marcatura dei marker CD è riportata per ciascun metodo (come media dei campioni) nella **Figura 64AB**.



Analizzando nel dettaglio questi valori, ciò suggerisce che la heatmap e il boxplot mostrano (**Figura 65A**) che vi è una forte correlazione positiva tra CD90, CD73 e CD235a (marcatori di staminalità) ed una correlazione negativa tra questi e i marcatori CD45, CD34 e CD31. La distribuzione dei valori mostra una chiara separazione tra i due gruppi di marcatori

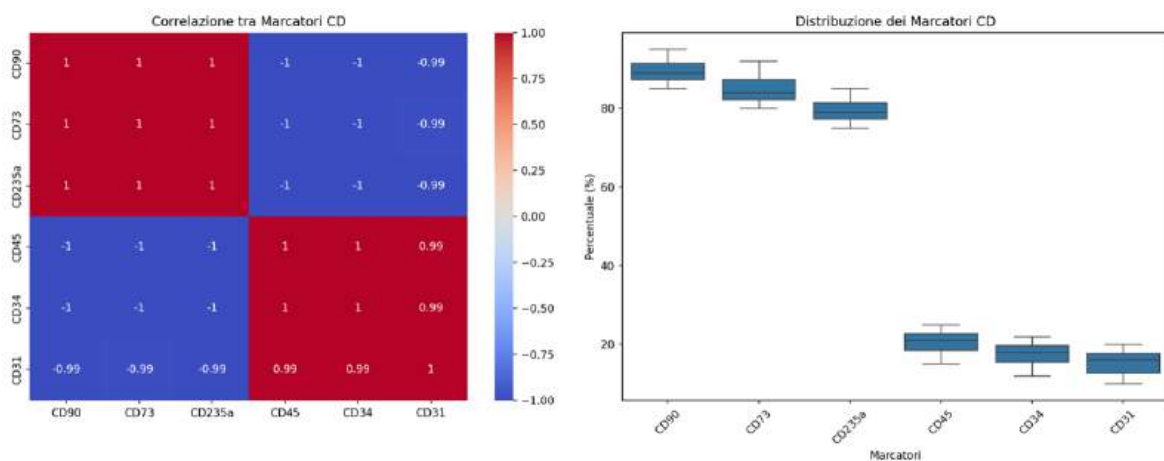


Figura 65A. Analisi della correlazione tra marcatori CD e loro distribuzione nei diversi metodi di processazione del tessuto adiposo. **(A)** Heatmap della matrice di correlazione tra i marcatori CD. La scala cromatica va dal blu (correlazione negativa) al rosso (correlazione positiva), con i valori numerici riportati in ogni cella. I marcatori di staminalità (CD90, CD73) e il CD235a mostrano una forte correlazione positiva tra loro ($r > 0.95$, $p < 0.05$), mentre presentano una correlazione negativa con i marcatori CD45, CD34 e CD31. Quest'ultimo gruppo di marcatori mostra invece una correlazione positiva reciproca ($r > 0.90$, $p < 0.05$). **(B)** Boxplot della distribuzione dei valori percentuali dei marcatori CD nei diversi metodi di processazione. Il grafico evidenzia una chiara stratificazione dei marcatori in due gruppi principali: i marcatori di staminalità (CD90, CD73) e CD235a con valori percentuali elevati (75-95%), e i marcatori CD45, CD34 e CD31 con valori percentuali inferiori (10-25%). Le barre rappresentano la mediana, i box il primo e terzo quartile, e i whiskers l'intervallo di distribuzione dei valori.

I marcatori di staminalità (CD90, CD73, CD235a) mostrano una correlazione negativa con i tempi di crescita, suggerendo che una maggiore espressione di questi marcatori è associata a tempi di crescita più rapidi, mentre i marcatori CD45, CD34 e CD31 mostrano una correlazione positiva con i tempi di crescita, indicando che una maggiore espressione di questi marcatori è associata a tempi di crescita più lunghi (**Figura 65B**). Questi risultati suggeriscono che l'espressione dei marcatori di staminalità potrebbe essere

un buon predittore della velocità di crescita cellulare e che i metodi meccanici che preservano meglio l'espressione di CD90, CD73 e CD235a offrendo vantaggi in termini di tempi di crescita esistendo una chiara distinzione tra il comportamento dei marcatori di staminalità e gli altri marcatori in relazione alla crescita cellulare.

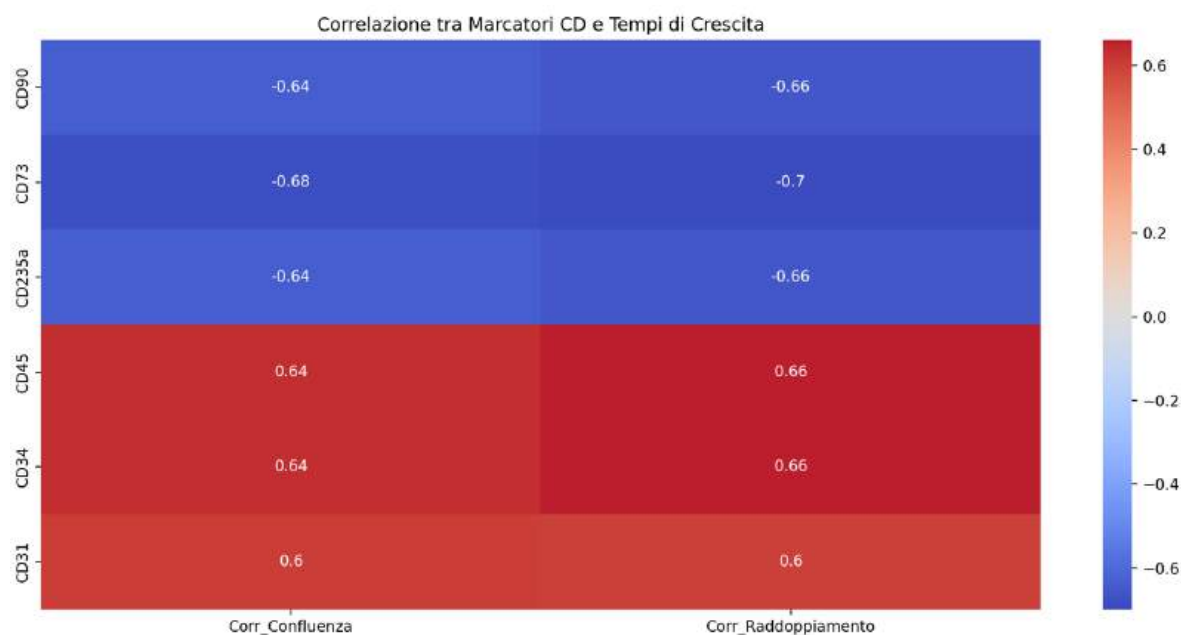


Fig 65B. Correlazione tra l'espressione dei marcatori CD e i tempi di crescita cellulare. La heatmap mostra le correlazioni tra i marcatori CD (CD90, CD73, CD235a, CD45, CD34, CD31) e i tempi di confluenza e raddoppiamento della popolazione cellulare. I marcatori di staminalità (CD90, CD73, CD235a) presentano correlazioni negative con entrambi i tempi di crescita, suggerendo che una maggiore espressione di questi marcatori è associata a una crescita più rapida. Al contrario, i marcatori CD45, CD34 e CD31 mostrano correlazioni positive, indicando che una maggiore espressione è associata a tempi di crescita più lunghi. Sebbene le correlazioni siano consistenti, i p-value superiori a 0.05 indicano che non raggiungono la significatività statistica, probabilmente a causa della dimensione limitata del campione. Questa analisi suggerisce che l'espressione dei marcatori di staminalità potrebbe essere un buon predittore della velocità di crescita cellulare.

E' stata altresì eseguita un'analisi di correlazione tra i marcatori staminali (CD34, CD90, CD73, CD235a) e i marcatori endoteliali (CD31, CD45) al fine di determinare quale metodo risulti più efficace nell'isolamento dei marcatori staminali. I risultati sono presentati in una matrice di correlazione e in un grafico a barre che mostra il rapporto tra marcatori staminali e marcatori endoteliali per ciascun metodo (**Figura 66AB**). Il kit rigenera presenta una ratio del 3.44 tra i due score (67% vs 19.50%), il kit Hy tissue SVF presenta una ratio del 4.62 (69.25% vs 15%) ed infine il kit lipogems presenta un a ratio del 2.91 (65.50% vs 22.50%). Da questi dati si evince che i kit Rigenera e Hy Tissue SVF sono risultati i migliori nell'isolamento di marcatori staminali, presentando il rapporto più elevato tra marcatori staminali e marcatori endoteliali, ciò indica la sua efficacia nel fornire una popolazione di cellule staminali più pura.

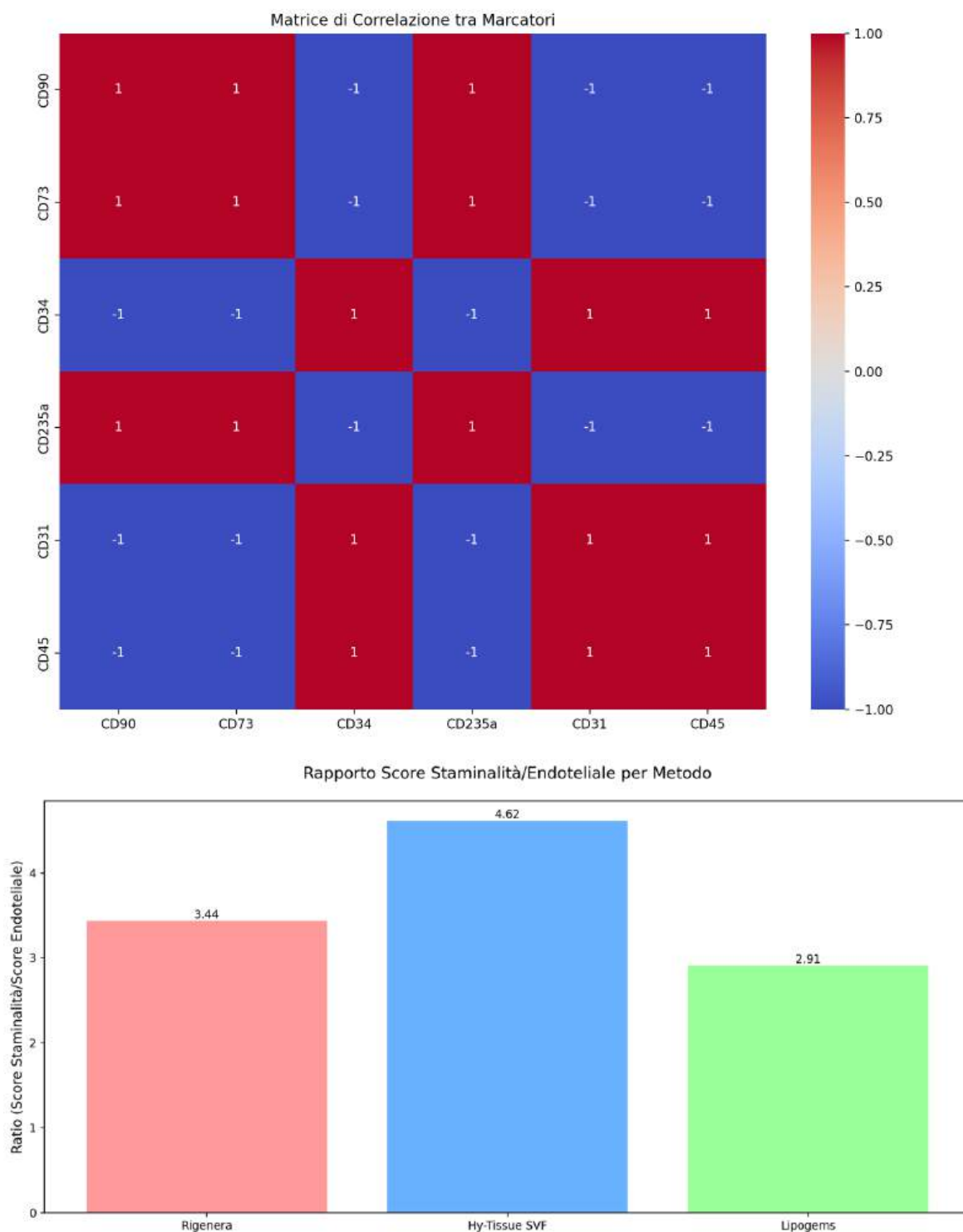


Fig. 66: (A) La matrice di correlazione mostra le relazioni tra i marcatori staminali (CD90, CD73, CD34, CD235a) e i marcatori endoteliali (CD31, CD45). I colori indicano la forza e la direzione delle correlazioni, con valori che vanno da -1 (correlazione negativa perfetta) a +1 (correlazione positiva perfetta); (B) Il grafico a barre rappresenta il rapporto tra i marcatori staminali e endoteliali per ciascun metodo. Un rapporto più alto indica un migliore isolamento delle cellule staminali, con "Hy-Tissue SVF" che mostra il rapporto più elevato, suggerendo un'ottima efficacia nel mantenere una popolazione di cellule staminali pura.

7.1.4 Unità formanti colonie

Per confrontare la capacità di formare colonie delle cellule stromali derivate da adiposo (ASCs) ottenute dai due dispositivi meccanici (Rigenera e Hy Tissue SVF), sono stati eseguiti saggi per le unità formanti colonie-fibroblasti (CFU-F). La **Figura 67** mostra micrografie rappresentative delle CFU-F rilevate mediante colorazione con blu di Toluidina dopo 15 giorni di trattamento con il dispositivo meccanico Rigenera rispetto alla digestione enzimatica. Le immagini mostrano che le ASCs trattate con Rigenera® sia quelle isolate dalla coscia che quelle isolate dall'addome erano capaci di crescere formando aggregati, ma si osservavano colonie più grandi (formate da un numero maggiore di cellule) nei campioni ottenuti dalla coscia rispetto a quelli provenienti dall'addome (**Figura 67**). Queste differenze non sono evidenti nei campioni trattati con digestione enzimatica (**Figura 67**). Inoltre, quando sono stati conteggiati i numeri di CFU-F, sono state rilevate più colonie nei campioni isolati dalla coscia (16.17 ± 1.8) rispetto all'addome (8.83 ± 1.1), come riportato in figura. Non sono state riscontrate differenze statistiche nel numero di CFU-F tra i campioni di coscia e addome trattati con digestione enzimatica.

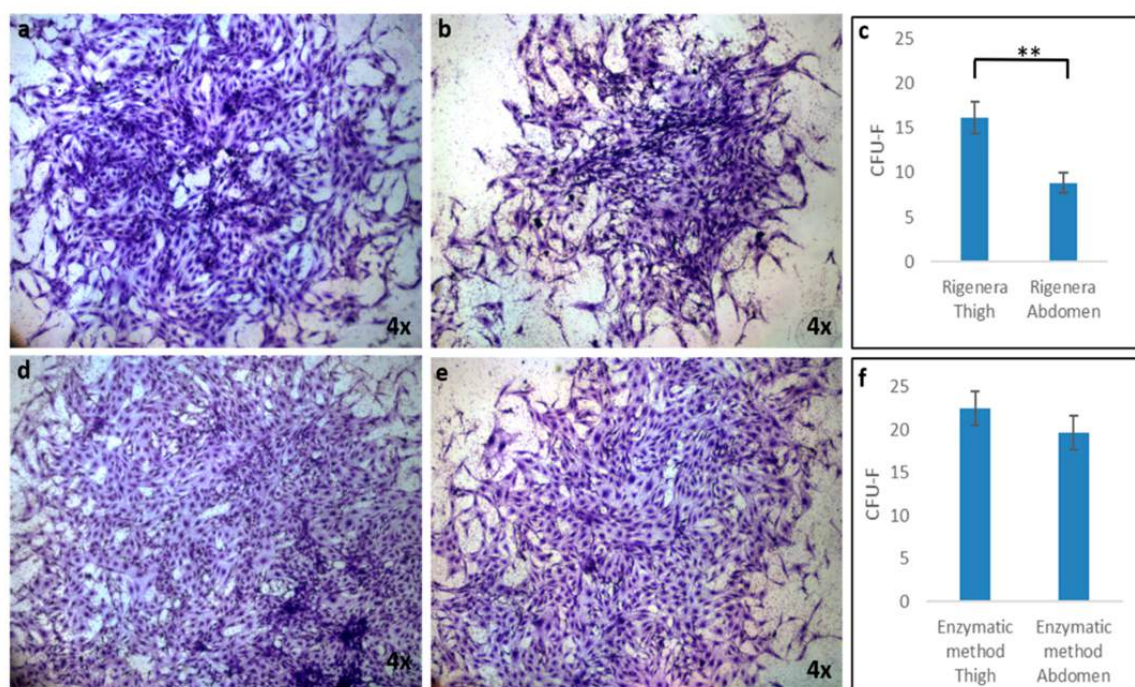


Fig 67. Il saggio delle unità formanti colonie-fibroblasti (CFU-F) delle cellule staminali adipose (ASCs) ottenute mediante Rigenera ((a) coscia e (b) addome) e il metodo enzimatico ((d) coscia e (e) addome). Le ASCs estratte dalla coscia (a–d) hanno formato colonie più grandi contenenti un numero maggiore di cellule rispetto a quelle estratte dall'addome (b–e); (c) numeri di CFU-F al giorno 15 ottenuti dal dispositivo Rigenera; i numeri di CFU-F hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi (coscia e addome). (f) Numeri di CFU-F al giorno 15 ottenuti attraverso il metodo enzimatico; i numeri di CFU-F non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi (coscia e addome). I dati sono presentati come media \pm errore standard (** $p < 0.01$).

Invece, il saggio CFU-F ha rivelato che la resa CFU-F del Hy-Tissue SVF era di 178 ± 49 CFU-F/mL di grasso e, dopo la digestione enzimatica dei micro-frammenti di SVF, è aumentata di oltre 2.4 volte (424 ± 181 CFU/mL di grasso, **Figura 68c**). La proporzione relativa di CFU-F in Hy-Tissue SVF SVF ($0.3 \pm 0.2\%$) non è aumentata in modo significativo dopo la digestione enzimatica dei micro-frammenti (**Figura 68d**), suggerendo che i micro-frammenti fossero composti non solo da cellule con potenziale di adesione, ma anche da altri tipi di cellule non aderenti.

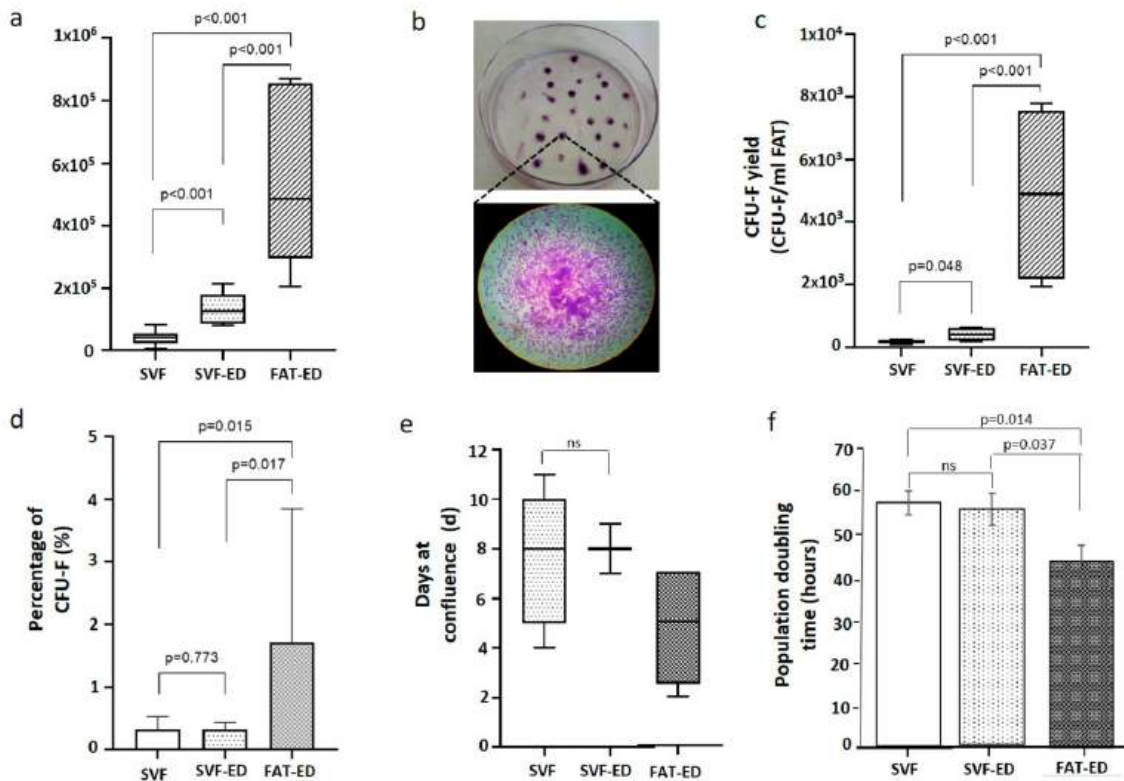


Fig 68. (a) Cellule della SVF ottenute dopo il trattamento con Hy-Tissue SVF e della SVF dopo la digestione enzimatica dei micro-frammenti (SVF-ED). Il tessuto adiposo digerito enzimaticamente (FAT-ED) è stato utilizzato come controllo. (b) T-flacone rappresentativo del saggio CFU-F e un'immagine ingrandita di un CFU-F osservato con un microscopio ottico dopo colorazione con Blu di Toluidina (ingrandimento 4×). (c) Rendimento di CFU-F della SVF ottenuto dopo il trattamento con Hy-Tissue SVF e della SVF dopo la digestione enzimatica dei micro-frammenti (SVF-ED). Il tessuto adiposo digerito enzimaticamente (FAT-ED) è stato utilizzato come controllo. (d) Percentuale di digestione dei micro-frammenti (SVF-ED). Il tessuto adiposo digerito enzimaticamente (FAT-ED) è stato utilizzato come controllo. (e) Percentuale di CFU-F contenuti in SVF, SVF-ED o FAT-ED. I risultati sono presentati come media con barre di errore che rappresentano una deviazione standard. (f) Tempo di raddoppiamento della popolazione di SVF, SVF-ED e FAT-ED. I risultati sono mostrati come media con barre di errore che rappresentano la deviazione standard.

Il rendimento di cellule libere e le CFU-F delle cellule libere della SVF sono stati comparati con il tessuto adiposo digerito enzimaticamente (FAT-ED), utilizzato come controllo. FAT-ED ha prodotto 12 volte più cellule nucleate ($5 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$ cellule/mL di tessuto adiposo) e 27 volte più CFU-F (4877 ± 2477 CFU-F/mL di tessuto adiposo) rispetto al componente SVF basato sulla frazione di cellule libere ottenute tramite

procedure meccaniche. Inoltre, la frequenza di CFU-F del tessuto adiposo trattato con enzimi (FAT-ED) era 5,6 volte superiore rispetto al prodotto SVF (FAT-ED: $1,7 \pm 1,9\%$; SVF: $0,3 \pm 0,2\%$; SVF-ED: $0,3\% \pm 0,1$). Infine, per analizzare la capacità di proliferazione delle cellule aderenti nel prodotto SVF, le cellule derivate da SVF, SVF-ED o FAT-ED (controllo) sono state seminate in T-flaconi fino a raggiungere la confluenza (**Figura 68e**). Le cellule di SVF e SVF-ED non hanno mostrato differenze statisticamente significative per raggiungere la confluenza (8 ± 2 giorni; 8 ± 1 giorni, rispettivamente; $p > 0,05$). FAT-ED (controllo) ha richiesto meno tempo per raggiungere la confluenza (5 ± 2 giorni), probabilmente a causa della maggiore frequenza di contenuto cellulare aderente. I risultati della capacità di proliferazione sono stati confermati con un saggio sul tempo di raddoppiamento della popolazione (**Figura 68f**). Gli istogrammi mostrano che il tempo di raddoppiamento delle cellule SVF e SVF-ED era comparabile ($59,35 \pm 2,8$ e $57,38 \pm 3,9$ ore, rispettivamente), mentre le cellule di FAT-ED richiedevano meno tempo per duplicare il loro numero ($45,31 \pm 3,95$ ore).

7.1.5 Differenziamento

Al fine di determinare la multipotenza delle cellule staminali adipose (ASCs) isolate da campioni trattati con Rigenera, è stato effettuato un saggio di differenziazione per adipociti, condrociti e osteociti. In questo esperimento, abbiamo osservato la differenziazione cellulare a livello macroscopico e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante il metodo enzimatico e con cellule non indotte (**Figura 69**). La differenziazione adipogenica delle ASCs è stata confermata mediante colorazione con Oil Red O dopo 14 giorni di induzione. Rispetto alle cellule non indotte (**Figura 69A (a-d)**), le cellule colorate con la soluzione di Oil Red O hanno mostrato la formazione di gocce lipidiche all'interno del citoplasma (**Figura 69A (e-h)**). Inoltre, non sono state riscontrate differenze significative tra le ASCs isolate dalla coscia e dall'addome. Il potenziale osteogenico è stato valutato mediante colorazione con Alizarin Red (**Figura 69B (e-h)**), utilizzata per indicare la calcificazione della matrice extracellulare. Entrambi i campioni (coscia e addome) hanno mostrato una colorazione positiva nelle cellule osteo-indotte, in contrapposizione alle cellule non indotte, indicando così la differenziazione osteogenica delle ASCs. Infine, le ASCs sono state coltivate in condizioni condrogeniche per 3 settimane e colorate con blu di Alcian. La condrogenesi è stata osservata in tutti i campioni attraverso la deposizione di una matrice ricca di proteoglicani solfati (**Figura 69C (e-h)**). Il potenziale di differenziazione tra le cellule ottenute con Rigenera e quelle ottenute tramite digestione enzimatica è risultato comparabile. Questo risultato evidenzia che le

ASCs ottenute mediante trattamento con Rigenera sono capaci di differenziarsi verso destini cellulari multilineari.

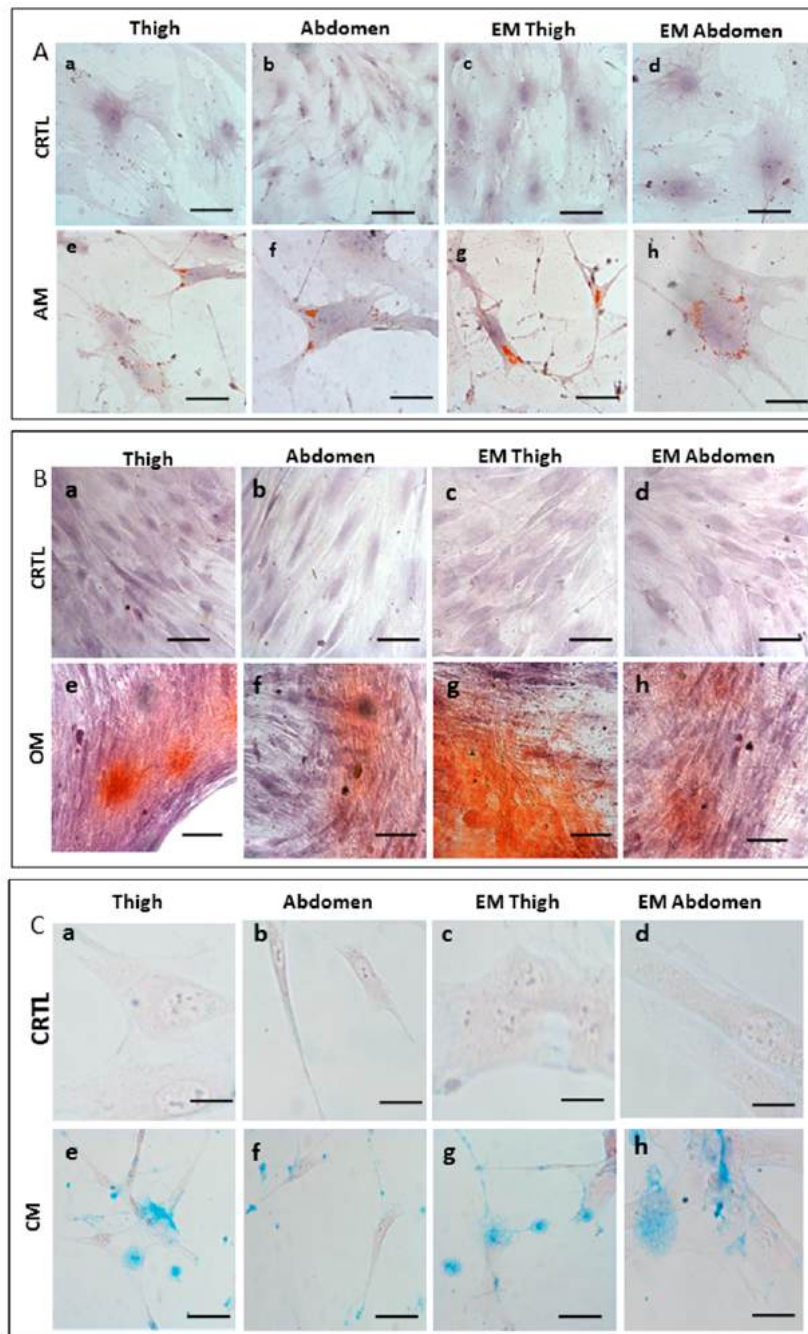


Fig 69: Saggio di differenziazione cellulare. Potenziale di differenziazione multilineare delle ASCs dalla coscia e dall'addome dopo trattamento con Rigenera rispetto ai metodi enzimatici (EM). **(A)** Le cellule sono state coltivate in mezzo completo per ASCs (CRTL) e in mezzo adipogenico (AM). Nel mezzo adipogenico, l'adipogenesi è stata indicata dall'accumulo di vacuoli lipidici neutri colorati con Oil Red O, mentre il nucleo è stato colorato con ematossilina. **(B)** Le cellule sono state coltivate in mezzo completo per ASCs (CRTL) e in mezzo osteogenico (OM). Nel mezzo osteogenico, l'osteogenesi è stata indicata dalla colorazione con Alizarin Red S della calcificazione della matrice extracellulare, mentre il nucleo è stato colorato con ematossilina. **(C)** Le cellule sono state coltivate in mezzo completo per ASCs (CRTL) e in mezzo condrogenico (CM). Nel mezzo condrogenico, la condrogenesi è stata evidenziata dalla deposizione di una matrice ricca di proteoglicani solfati colorati con blu di Alcian, mentre il nucleo è stato colorato con ematossilina.

Il potenziale di differenziazione multilineare delle SVF ottenuto con Hy-Tissue SVF è stato valutato testando la capacità delle cellule aderenti ottenute dalla SVF di differenziarsi

in adipociti, condrociti e osteociti, utilizzando le cellule espanse da tessuto adiposo digerite enzimaticamente come controllo. I contaminanti ematici periferici e altre cellule stromali non aderenti del SVF sono stati rimossi, e solo le cellule aderenti con morfologia fibroblastoidale sono rimaste nel flacone. I risultati della multipotenza della SVF sono mostrati nella **Figura 70**. Le cellule aderenti ottenute con Hy-Tissue SVF sono in grado di differenziarsi nelle tre linee mesodermiche, analogamente alle cellule estratte enzimaticamente (FAT-ED). Le colorazioni con Oil Red O, Alizarin Red e Blu di Alcian sono risultate positive rispetto al controllo per la differenziazione adipogenica, osteogenica e condrogenica, rispettivamente.

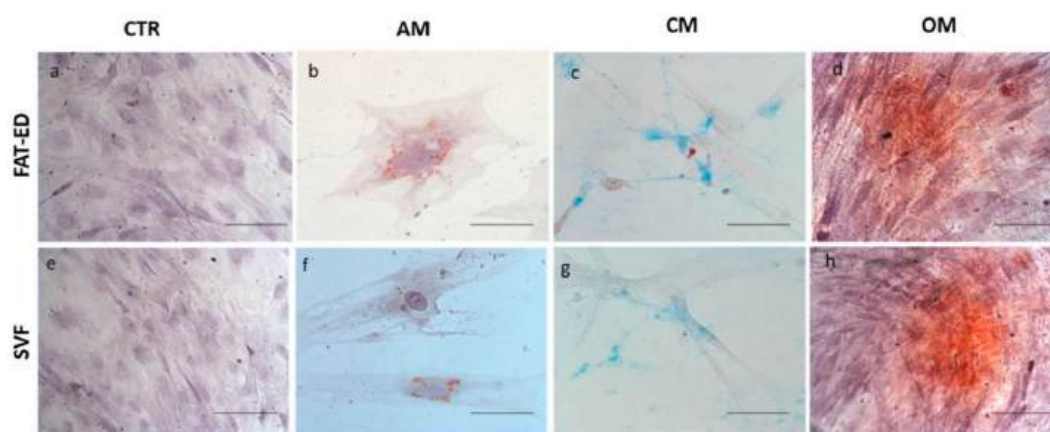


Fig 70. Differenziazione delle cellule stromali derivate da adiposo isolate con metodo meccanico ed enzimatico. AM: Mezzo adipogenico; CM: Mezzo condrogenico; OM: Mezzo osteogenico. (a–h): Immagini di microscopia ottica delle cellule indotte o non indotte (controllo; a,e) con il mezzo di differenziazione; (b,f) l'adipogenesi è stata indicata dall'accumulo di vacuoli lipidici neutri che si colorano con Oil Red O; (c,g) la condrogenesi è stata indicata dalla deposizione di una matrice ricca di proteoglicani solfati che si colora con Blu di Alcian; (d,e) l'osteogenesi è stata indicata dalla colorazione con Alizarin Red S della calcificazione della matrice extracellulare.

7.1.6. Analisi microscopica della SVF

L'analisi microscopica del sedimento ottenuto mediante il processo di dissociazione meccanica del tessuto adiposo (SVF) ha rivelato la presenza di un pellet cellulare (**Figura 71**) composto da cellule libere (**Figura 71B**) e micro-frammenti di tessuto connettivo stromale (**Figura 71C**). Tra le cellule libere, è stata chiaramente osservata una popolazione cellulare eterogenea, in cui si evidenziano differenze di dimensione e forma dei nuclei e del citoplasma (stelle nella Figura 71B). I micro-frammenti apparivano come cilindri allungati con un diametro medio di circa 30–70 μm e una lunghezza variabile, presentando un assemblaggio fibrinoide con strutture tubulari (colorate di un profondo viola), che rappresentano elementi microvascolari consistenti in capillari di lunghezza variabile contenenti cellule endoteliali e perivascolari (**Figura 71D,E**). Le evidenze della

microscopia ottica sono state supportate da immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) (**Figura 71F,H**). I micro-frammenti erano composti da tessuto connettivo denso con la presenza di fibre di collagene strutturate come fibrille isolate (**Figura 71F**, freccia) o bande grossolane (**Figura 71G**, freccia) contenenti cellule aderenti (**Figura 71F,G**, asterisco). Inoltre, le immagini SEM mostrano la presenza di adipociti (**Figura 71H**), che appaiono di piccole dimensioni (10-20 μm), riconducibili a adipociti che hanno perso il loro contenuto lipidico o che non sono completamente differenziati.

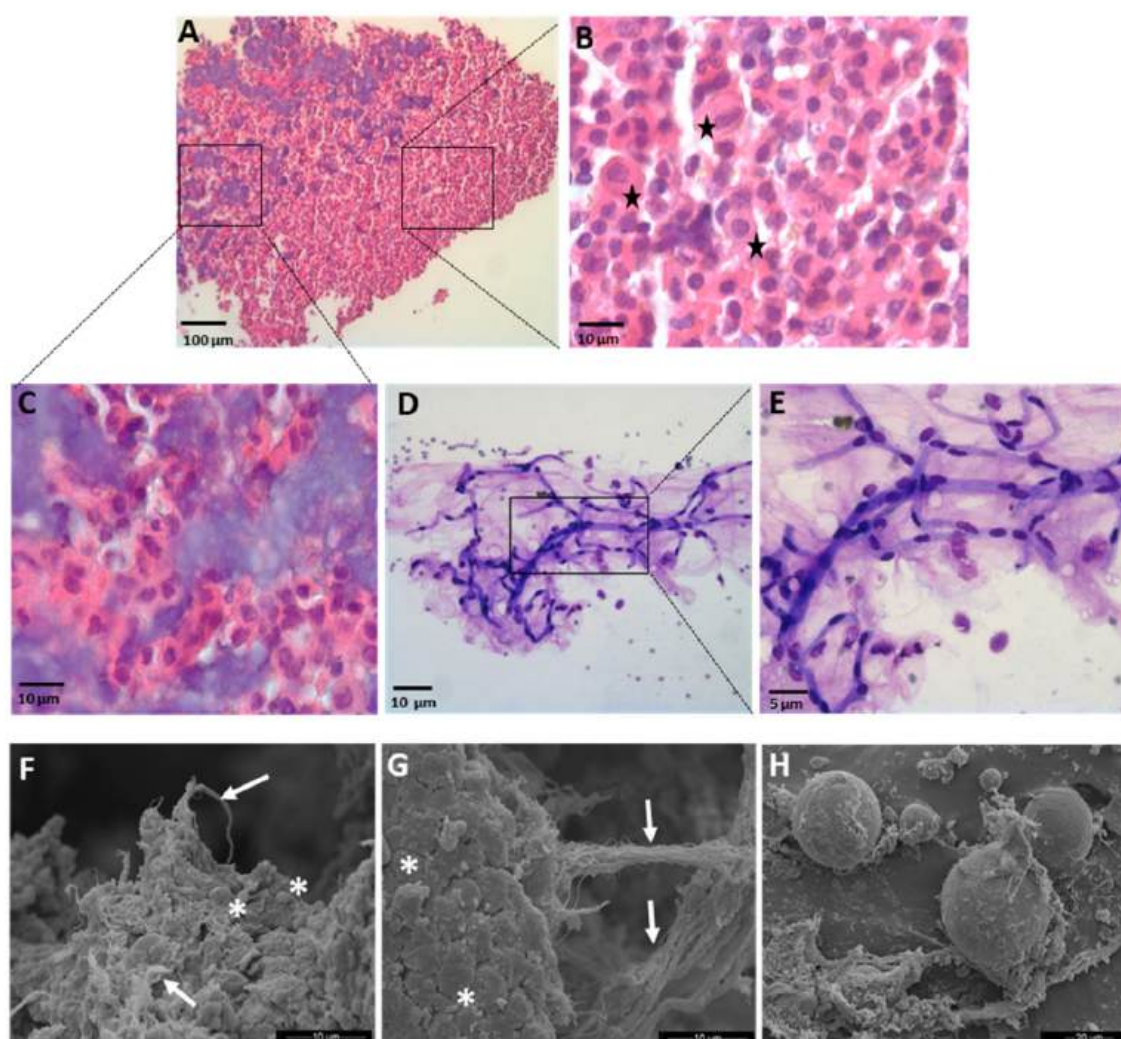


Fig 71. Analisi morfologica e ultrastrutturale della SVF ottenuta meccanicamente. (**A-C**) Microscopia ottica di una sezione a singolo strato di pellet colorato con ematossilina ed eosina. Le stelle nere in (**B**) evidenziano l'eterogeneità cellulare. I quadrati indicano la posizione dell'immagine ad alta magnificazione in (**B,C**). (**D,E**) Colorazione con ematossilina ed eosina dei microframmenti di tessuto connettivo. Elementi microvascolari preservati appaiono come strutture tubulari (colorate di viola scuro) contenenti cellule endoteliali e perivascolari. Il rettangolo indica la posizione dell'immagine ad alta magnificazione in (**E**). (**F-H**) Immagini SEM di microframmenti di tessuto connettivo. Freccie: fibre di collagene; asterischi: cellule aderenti. La SEM consente di identificare anche piccoli adipociti.

7.1.7. Modello Animale in vitro: Guarigione della tendinopatia in modelli ovini

7.1.7.1 Valutazione clinica mostra un miglioramento della zoppia e dello spessore tendineo nei gruppi trattati

Tutti gli animali, 24 ore dopo l'induzione della lesione, hanno mostrato zoppia di II-III grado. Nel corso delle settimane, indipendentemente dal gruppo, la zoppia è migliorata gradualmente, stabilizzandosi a I/II grado tre settimane dopo l'induzione della lesione. A quattro settimane, un grado di zoppia di I grado persisteva in entrambi gli arti, ma a otto settimane si è osservato che gli animali caricavano l'arto pelvico trattato e scaricavano leggermente l'arto non trattato, il quale continuava a mostrare zoppia di primo grado.

Al Ti (tendini sani), lo spessore medio \pm SD era di 8.6 ± 1.1 mm nel gruppo trattato, mentre 8.5 ± 1.2 mm nel gruppo di controllo. Al T0, lo spessore tendineo nel gruppo trattato era in media 12.3 ± 1.8 mm, rispetto a 13.7 ± 2.1 mm nel gruppo di controllo. Al T1, il gruppo trattato mostrava uno spessore tendineo medio di 13.1 ± 1.9 mm, mentre nel gruppo di controllo lo spessore era di 14.1 ± 2.0 mm. Al T2, lo spessore tendineo di entrambi i gruppi era in media 9.1 ± 1.4 mm e 9.5 ± 1.7 mm, rispettivamente. Non sono state osservate differenze statistiche tra i due gruppi in nessun dei punti temporali ($P > .05$). Inoltre, abbiamo eseguito un'analisi statistica confrontando la modifica dello spessore tendineo nel gruppo trattato e nel gruppo di controllo, in quattro diversi punti temporali (Ti, T0, T1, T2). Lo spessore medio del tendine calcaneare comune variava considerevolmente sia nel gruppo trattato ($F = 103.4$; $P < .0001$) sia nel gruppo di controllo ($F = 107.1$; $P < .0001$), con un aumento significativo del diametro tendineo all'interno di ciascun gruppo fino a T1. Alla fine dello studio (T2, otto settimane dopo il trattamento), lo spessore tendineo era diminuito significativamente rispetto a T0 ($P < .0001$) e T1 ($P < .0001$) in entrambi i gruppi. Tuttavia, il gruppo trattato non ha mostrato ulteriori differenze ($P = .1224$) rispetto alla condizione iniziale del tendine sano (Ti), mentre nel gruppo di controllo era ancora osservabile una differenza statistica dal Ti al T2 ($P = .0297$), come riportato in **Figura 72**.

7.1.7.2 Valutazione ecografica in modalità B mostra una diminuzione dello spessore tendineo nel gruppo trattato, nonostante l'assenza di misurazioni temporali valide sulla progressione.

L'esame ecografico in modalità B effettuato ai tempi Ti, T0, T1 e T2 ha evidenziato le lesioni indotte e monitorato il processo riparativo. Le aree della lesione, progressivamente, a T1 e T2 apparivano leggermente meno ipoecogene, sebbene l'esame non consentisse una valutazione oggettiva e quantitativa della progressione riparativa. I risultati riguardanti le

misurazioni dello spessore dei tendini, misurati in sezione trasversale nel sito della lesione (6 cm dalla tuberosità calcaneare prossimale), sono mostrati nella **Figura 72B**.

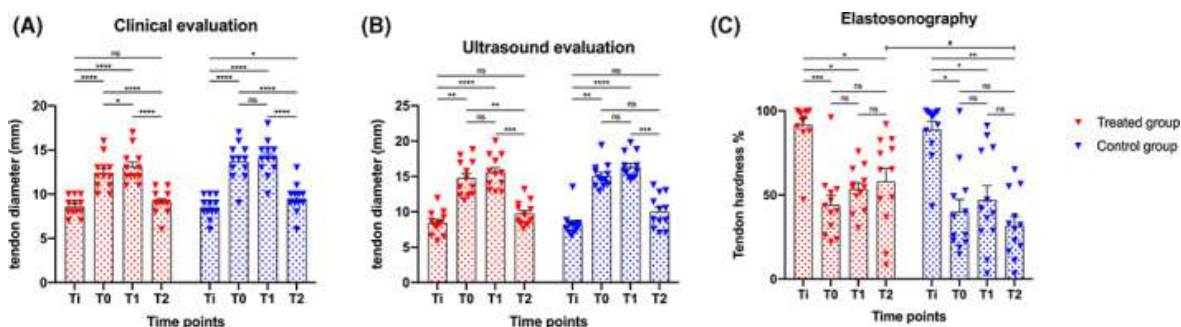


Fig 72: A, Diametro tendineo misurato clinicamente nel gruppo trattato e nel gruppo di controllo in ciascun punto temporale, espresso in millimetri (mm). B, Diametro tendineo (mm) misurato ecograficamente nel gruppo trattato e nel gruppo di controllo in ciascun punto temporale. C, Durezza tendinea (%) nella valutazione elastosonografica in entrambi i gruppi in ciascun punto temporale. Triangoli rossi e blu indicano le singole misurazioni disperse nei gruppi; i riquadri indicano i valori medi; le barre indicano gli errori standard; T_i: condizione iniziale del tendine sano immediatamente prima dell'induzione della lesione tendinea sperimentale; T₀: 14 giorni dopo l'induzione della lesione tendinea (il gruppo trattato ha ricevuto terapia con frazione vascolare stromale); T₁: 4 settimane dopo T₀; T₂: fine dello studio, 8 settimane dopo T₀. P-valori, ns: non significativo; *P < .05; **P < .01; ***P < .001; ****P < .0001; # indica l'unica differenza significativa (P < .0342) riscontrata tra i gruppi.

Nella valutazione ecografica, non sono state riportate differenze statistiche nello spessore tendineo tra i due gruppi in nessun punto temporale (P > .05). Entrambi i gruppi hanno mostrato differenze nel confronto ai punti temporali dello studio all'interno di ciascun gruppo (gruppo trattato, Fr = 29.67, P < .0001; gruppo di controllo, Fr = 29.62, P < .0001). Nel gruppo trattato, lo spessore tendineo è aumentato significativamente dopo l'induzione della lesione, passando da T_i (media ± SD, 8.4 ± 1.7 mm) a T₀ (14.7 ± 2.5 mm, P = .0012); lo spessore ha continuato ad aumentare significativamente fino a T₁ (15.5 ± 2.4 mm, P < .0001), ma al termine dello studio (T₂) non è stata osservata alcuna differenza significativa (9.7 ± 1.7 mm, P > .05) considerando il tendine sano pre-infortunio. Il gruppo di controllo ha mostrato una tendenza simile a quella del gruppo trattato in relazione alla condizione iniziale pre-infortunio e agli altri punti temporali. Tuttavia, abbiamo confrontato lo spessore del tendine inizialmente lesionato prima del trattamento (T₀) e alla fine dello studio (T₂) con il tendine trattato con SVF e abbiamo osservato che lo spessore tendineo era diminuito significativamente (P = .0071); nel gruppo di controllo non sono state osservate differenze statistiche da T₀ a T₂ (P = .0855) (**Figura 72B**).

7.1.7.3 Valutazione con elastosonografia mostra cambiamenti nella durezza tendinea nel gruppo trattato con misurazione della progressione temporale.

Le percentuali di durezza (Elax-t%HRD) dei tendini ai tempi T_i, T₀, T₁ e T₂ sono illustrate nella **Figura 72C**. In entrambi i gruppi, le percentuali di durezza (Elax-t%HRD) sono cambiate significativamente considerando i punti temporali dello studio (gruppo trattato, Fr = 16.30, P = .0010; gruppo di controllo, Fr = 15.70, P = .0013). Nella valutazione elastosonografica, il tendine sano (T_i) presentava proprietà di tendine duro significative (**Figura 73**).

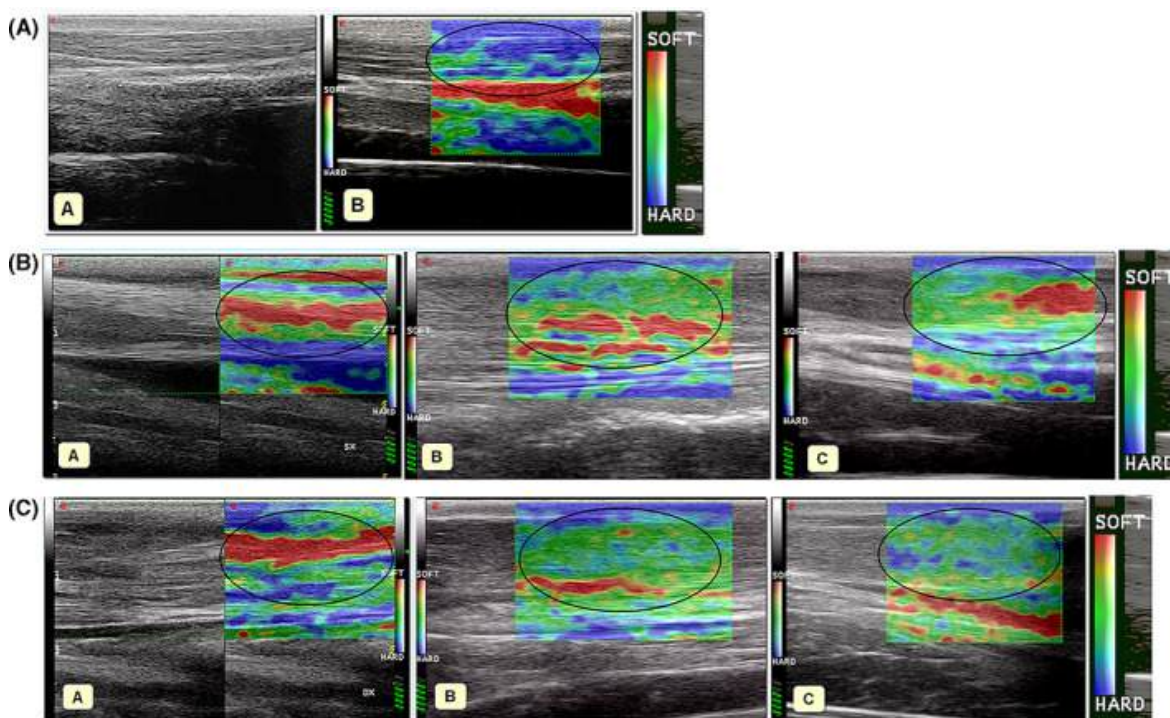


Fig 73: A, Aspetto in modalità B (A) e sonoelastografico (B) del tendine calcaneare comune normale. Il tendine calcaneare comune normale è per lo più duro, come rappresentato nella mappa codificata a colori in blu (cerchiato in nero); B, caratteristiche in modalità B e sonoelastografiche del tendine calcaneare comune 15 giorni dopo la lesione iatrogena in un soggetto del gruppo non trattato (A). L'elastogramma del tendine calcaneare comune era per lo più rosso (morbido). Lo stesso tendine al follow-up di 1 mese (B) e al follow-up di 2 mesi (C): l'elastogramma era per lo più verde (caratteristiche elastografiche intermedie) con aree rosse (morbide, cerchiato in nero). C, Caratteristiche in modalità B e sonoelastografiche del tendine calcaneare comune 15 giorni dopo la lesione iatrogena in un soggetto del gruppo trattato (A). L'elastogramma era per lo più rosso (aree morbide, cerchiato in nero). L'elastogramma dello stesso tendine al follow-up di 1 mese (B) era per lo più verde (caratteristiche elastografiche intermedie, cerchiato in nero). L'elastogramma dello stesso tendine al follow-up di 2 mesi (C) era verde (caratteristiche sonoelastografiche intermedie) con diverse aree blu (aree di durezza, cerchiato in nero).

Quattordici giorni dopo l'induzione della lesione (T₀), i tendini apparivano notevolmente più morbidi. La durezza del tendine è cambiata significativamente in relazione alla condizione del tendine sano (T_i) e agli altri punti temporali in entrambi i gruppi. Non sono state osservate differenze significative tra T₀ e i punti temporali successivi all'interno dei

gruppi ($P > .05$), ma è stata accertata una tendenza dissimile nei due gruppi durante lo studio. Al T0, il gruppo trattato ha mostrato un aumento progressivo della durezza del tendine fino al completamento dello studio, mentre il gruppo di controllo ha mostrato un aumento della durezza tra T0 e T1 e una diminuzione alla fine dello studio (T2), raggiungendo una media della percentuale di durezza del tendine inferiore a quella di T0. Non sono state osservate differenze significative confrontando i due gruppi a T_i ($P = .8501$), T0 ($P = .6221$) e T1 ($P = .5693$). Tuttavia, a T2, è stato osservato un significativo recupero di durezza nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo ($W = -54.0$; $P = .0342$).

7.1.7.4 L'analisi istologica mostra un miglioramento dei parametri FOS, FES, FIIS e NS nei gruppi trattati.

I punteggi morfologici e istologici sono stati valutati per ciascun campione a T2, dimostrando che i parametri FOS, FES, FIIS e NS erano generalmente migliorati nei tendini appartenenti al gruppo trattato, rispetto ai controlli non trattati. In particolare, nel gruppo trattato, il punteggio medio di FOS, FES, FIIS e NS era di 4.3 ± 3.3 , mentre nel gruppo non trattato il punteggio era di 8.8 ± 2.9 . Un'importante differenza complessiva tra il grado di riparazione tissutale nel gruppo trattato, rispetto al gruppo non trattato, è emersa dall'analisi statistica ($W = 66.0$; $P = .0010$). Confrontando le stesse aree nei tendini calcaneiari comuni (CCT), il gruppo trattato ha mostrato un modello longitudinale delle fibre che rivelava un miglioramento nell'allineamento e meno danni (FOS—gruppo trattato: 1.2 ± 1.1 ; gruppo di controllo: 2.5 ± 0.7 ; $W = 45.0$; $P = .0039$), così come i parametri relativi alla presenza di necrosi (NS, gruppo trattato: 0.7 ± 1.2 ; gruppo di controllo: 2.1 ± 0.8 ; $W = 55.0$; $P = .0020$), il processo infiltrativo infiammatorio (FIIS—gruppo trattato: 1.3 ± 1.0 ; gruppo di controllo: 2.2 ± 0.9 ; $W = 36.0$; $P = .0078$) e la presenza di edema/aspetto mixoide (FES—gruppo trattato: 1.2 ± 0.7 ; gruppo di controllo: 2.0 ± 0.8 ; $W = 36.0$; $P = .0078$). In generale, tutti i parametri erano significativamente inferiori ($P < .5$) nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo (**Figura 74A**).

7.1.7.5 L'analisi immunoistochimica mostra un'alta espressione di COL1, FVIII e un'espressione significativamente bassa di COL3 nei gruppi trattati.

I risultati immunoistochimici hanno rivelato differenze significative in tutti gli antigeni valutati nei tendini appartenenti al gruppo trattato con SVF rispetto ai controlli non trattati. Riguardo all'espressione del collagene, il punteggio medio degli animali trattati era di 2.3 ± 0.6 , rispetto a 1.2 ± 0.7 osservato nei tendini non trattati ($W = -42.0$; $P = .017$). Al

contrario, COL3 era sovraespresso nel gruppo di controllo (media 2.3 ± 0.6 rispetto a 1.3 ± 0.6 osservata nel gruppo trattato con SVF; $W = 56.0$; $P = .0098$), indicando, a T2, una formazione di tessuto cicatriziale fibroso nell'area della lesione. Questi risultati mostrano la stessa tendenza espressa da TGF β 1, sovraespresso nei fibroblasti e nelle cellule infiammatorie del gruppo di controllo (media 2.2 ± 0.7) rispetto ai tendini trattati con SVF (1.1 ± 0.9) ($W = 36.0$; $P = .0078$). Nel gruppo trattato, la presenza di un tessuto meno fibroso e un'attività di rimodellamento maggiore è stata caratterizzata anche da una neoangiogenesi più attiva, indicata da un'espressione maggiore di FVIII (media 2.3 ± 0.6) rispetto all'espressione media osservata nei tendini di controllo (1.2 ± 0.9) ($W = -59.0$; $P = .0161$) (**Figura 74B**).

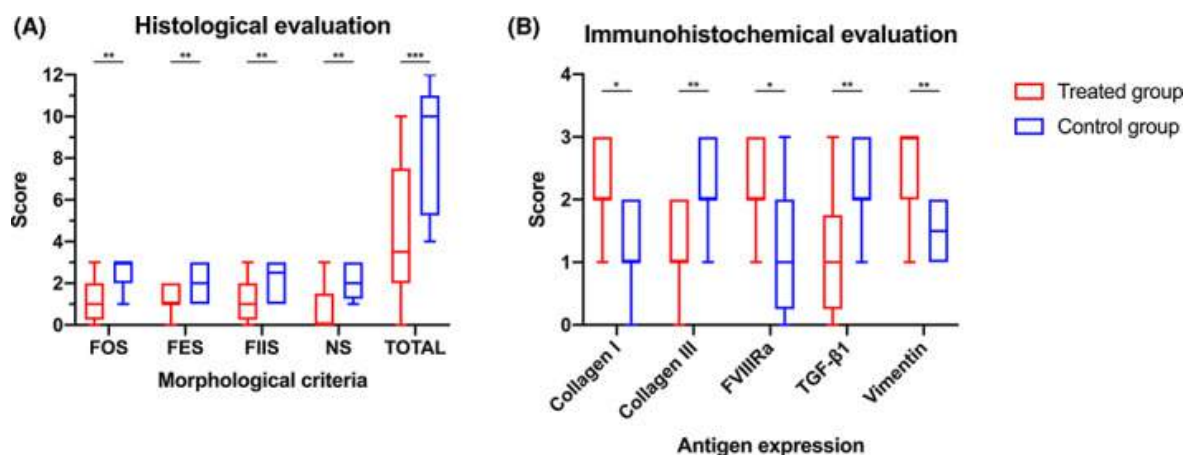


Fig 74: A, Punteggio istologico dei tendini escisi alla fine dello studio (T2) nel gruppo trattato e nel gruppo di controllo. FOS: punteggio di orientamento delle fibre; FES: punteggio di edema delle fibre; FIIS: punteggio infiltrativo-infiammatorio; NS: punteggio di necrosi; TOTALE: punteggio totale; **B**, Punteggio immunohistochemico dei tendini escisi alla fine dello studio (T2) nel gruppo trattato e nel gruppo di controllo. Le estremità delle baffi mostrano i valori minimi e massimi dei punteggi; i riquadri mostrano la mediana, il primo e il terzo quartile; P-valori, ns: non significativo; * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$.

Questi risultati sono stati osservati anche a ingrandimenti minori, nelle sezioni istologiche colorate utilizzando il metodo istochimico di Herovici. Nel gruppo trattato a T2, queste sezioni mostrano chiaramente un tessuto connettivo più giovane (colorato di blu o azzurro) in combinazione con un tessuto di collagene più maturo e organizzato (di colore rosso). Il gruppo di controllo, invece, presentava nel contempo una lesione centrale ancora modificata con fenomeni ipossici e necrosi tissutale, apparendo di colore giallo/arancione. Il tessuto connettivo sembrava notevolmente maturo e organizzato in un tessuto cicatriziale fibroso maturo, di un rosso brillante attorno alla maggior parte dell'area centrale gialla (**Figura 75**).

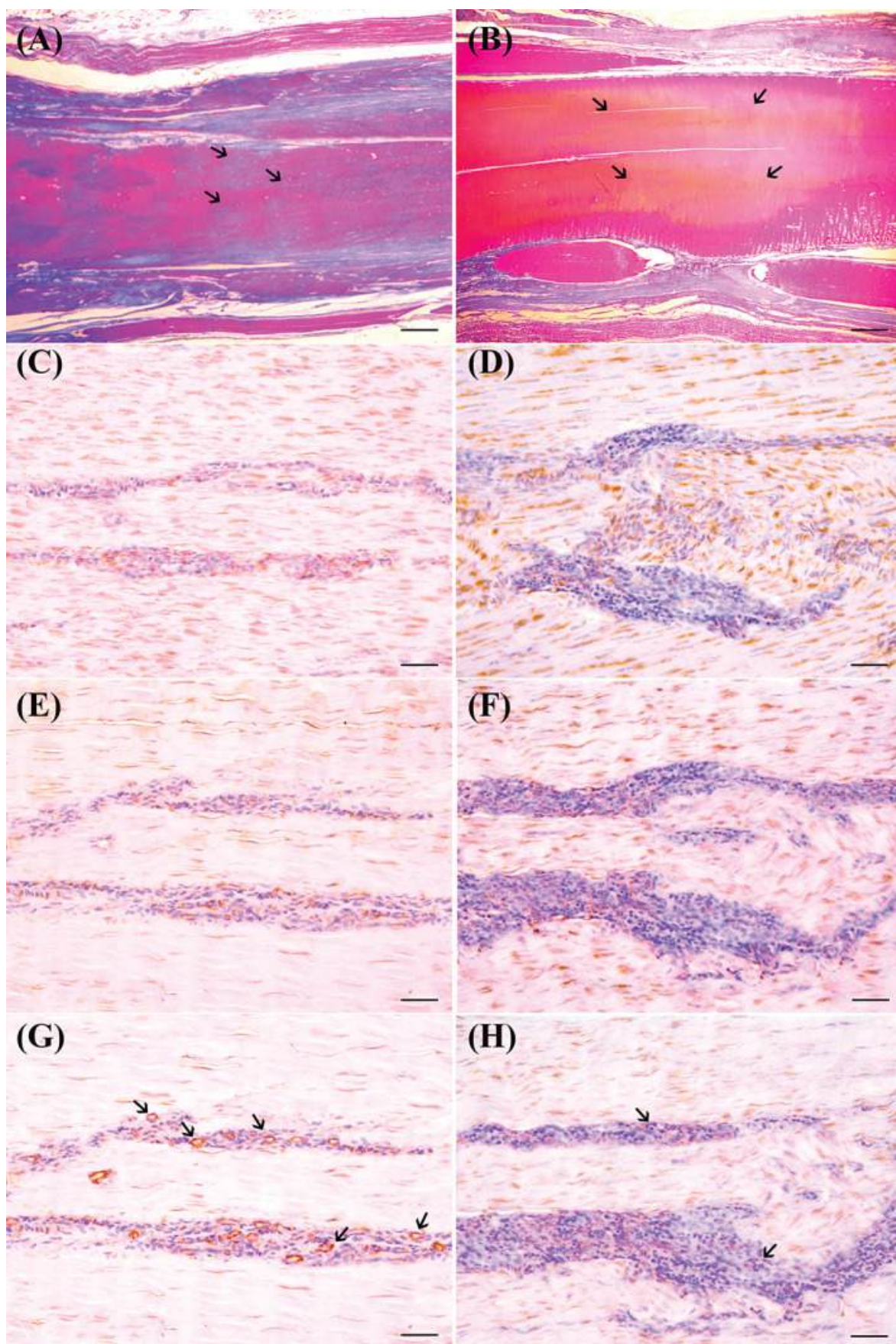


Fig. 75: Sezioni tissutali ottenute da tendini calcaneiari comuni (CCT) di pecora, dopo l'induzione di lesioni iatrogene con collagenasi di tipo I, iniettate o meno con cellule SVF, e campionate 8 settimane dopo la terapia. I tendini, colorati con la colorazione policromatica di Herovici, evidenziano l'orientamento longitudinale delle fibre di collagene dopo il

trapianto delle cellule SVF, senza aspetto necrotico e/o edematoso (A, barra di scala = 13.3 μm); si nota che, nella zona centrale del tendine trattato, non completamente maturo, le fibre di collagene disposte in modo longitudinale sono identificate come fibre colorate in blu miscelate con quelle rosse. Nel tendine di controllo (B, barra di scala = 13.3 μm), la colorazione di Herovici mostra la presenza di fibre di collagene mature e orientate longitudinalmente (cioè, principalmente fibre di collagene di colore rosso intenso nella sezione tendinea) nella periferia dell'area iniettata con collagenasi (freccie). Nella parte centrale del CCT, la lesione (colorata di giallastro-arancione) è circondata da fibre di collagene completamente mature e configurate a impronta digitale, identificate come fibre colorate di rosso senza fibre miscelate in blu di pre-collagene. Le colorazioni immunostochimiche per il collagene di tipo I (CI) e il collagene di tipo III (CIII) mostrano un'alta espressione di CI (C, barra di scala = 250 μm) e una molto bassa espressione di CIII (E, barra di scala = 250 μm) nel tendine trattato con cellule SVF. Al contrario, si osserva una tendenza opposta nel tendine di controllo non trattato, in cui si osservano una bassa espressione di CI (D, barra di scala = 250 μm) e una alta espressione di CIII (F, barra di scala = 250 μm). Le colorazioni IHC per FVIIIra rivelano un numero elevato di micro-vasi positivi di dimensioni piccole e medie nel CCT trattato con cellule SVF (freccie) (G, barra di scala = 250 μm). Sebbene alcune rare cellule endoteliali siano positive, si osserva una sostanziale assenza di neoangiogenesi nel tendine di controllo, dove è osservata sporadicamente solo la presenza di alcuni piccoli capillari (H, barra di scala = 250 μm).

7.1.7.6 L'espressione genica mostra un'alta espressione di COL1, VEGF e una significativa diminuzione dei geni MMP1, COL3 e sclerodermina.

L'espressione genica correlata alla tenogenesi e alla rigenerazione tendinea mostra che i prodotti AAMG contengono un'alta espressione di COL1, fondamentale per l'organizzazione strutturale del tendine, VEGF e per l'angiogenesi. Inoltre, abbiamo osservato una evidente riduzione dell'espressione delle metalloproteasi (principalmente MMP1) e dei geni del collagene di tipo 3 (COL3) e sclerodermina, che sono tipici delle cicatrici. Per quanto riguarda le variazioni epigenetiche, abbiamo inoltre notato che i miRNA correlati alla tenogenesi nei prodotti derivati da AAMG erano sovraespressi rispetto al gruppo di controllo. Nello specifico, il contributo stromale ha indotto un aumento di miRNA205, miRNA 145-5, miRNA 100, miRNA 195 e let-7, correlati alla guarigione tendinea, principalmente durante l'angiogenesi efficace, e una riduzione di miRNA29 è stata associata alla presenza di lesioni (**Figura 76**).

7.1.7.7 Analisi biomeccanica

Per quanto riguarda l'analisi biomeccanica, sono state considerate la forza di rottura specifica e la forza totale di rottura. La forza di rottura specifica media era di 28.3 N/mm² nel gruppo trattato e di 27.8 N/mm² nel gruppo di controllo (P = .79). La forza totale di rottura a T2 era di 10.2 kN nel gruppo trattato e di 9.87 kN nel gruppo di controllo. La differenza non era statisticamente significativa (P = .89).

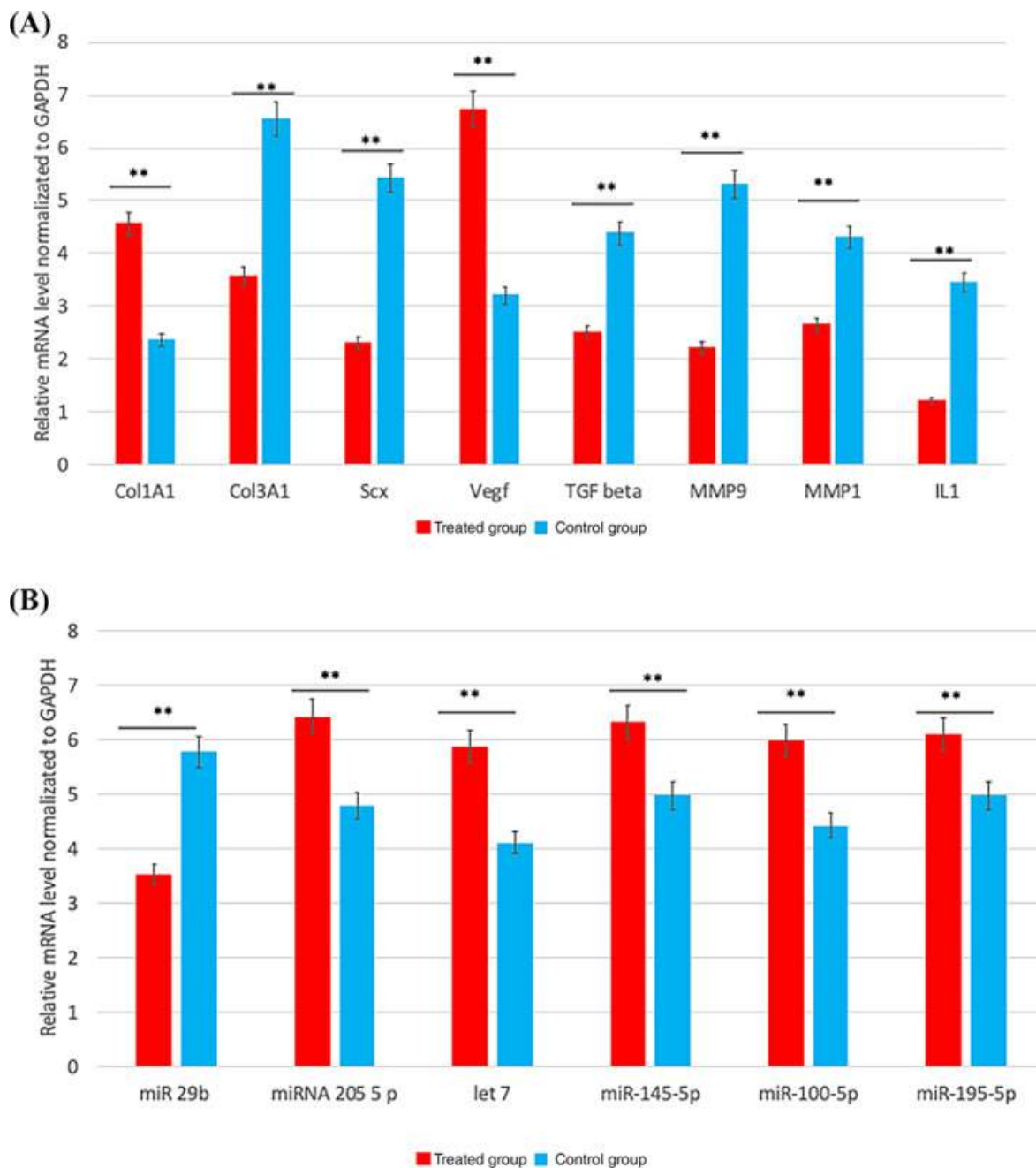


Fig 76: Analisi semiquantitative dell'espressione genica di Col1a1 (collagene di tipo I), Col3a1 (collagene di tipo III), Scx (sclerodermina), Vegf (fattore di crescita endoteliale vascolare), TGF beta (fattore di crescita trasformante), Mmp1 (metalloproteinasi 1), Mmp9, interleuchina 1 (IL1), gruppo di miRNA coinvolti nella xenogenesi come miR 29b, miRNA 205-5p, let 7, miR-145-5p, miR-100-5p, miR-195-5p nei gruppi trattati (gruppo A in rosso) e non trattati (gruppo B in blu). I dati sono stati quantificati e normalizzati utilizzando la procedura di reazione a catena della polimerasi in tempo reale quantitativa (RT-qPCR). Ogni barra rappresenta il cambiamento in valore rispetto alla norma (fold change, FC) SD dei valori normalizzati. È stata effettuata un'ANOVA con misure ripetute con un'analisi post hoc utilizzando il confronto multiplo di Bonferroni. I test T sono stati utilizzati per determinare differenze significative ($P = .05$). * $P = .05$; ** $P = .01$; *** $P = .001$. La ripetibilità è stata calcolata come la deviazione standard (SD) della differenza tra le misurazioni.

7.1.8 Modello Animale in vitro: Trattamento dell'osteoartrite nei cani

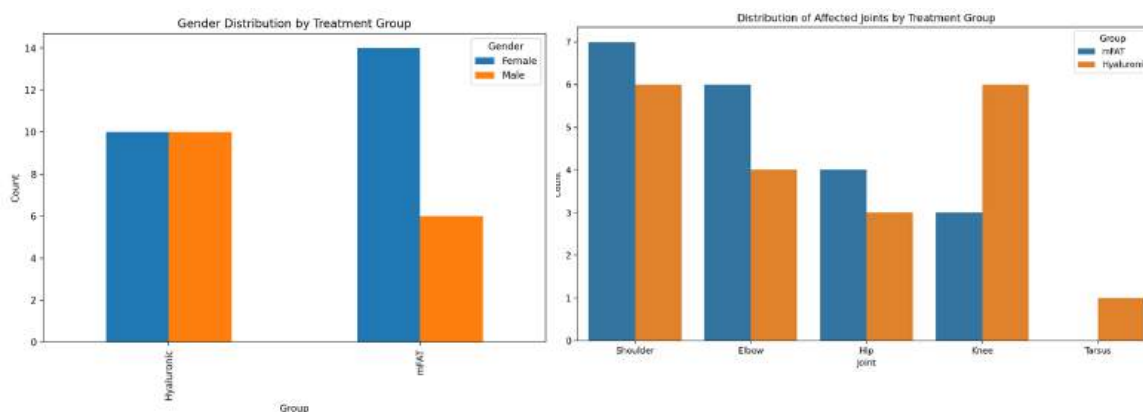
7.1.8.1 Animali arruolati

Quaranta cani da compagnia appartenenti a razze diverse e affetti da osteoartrite hanno soddisfatto i criteri di ammissibilità e sono stati divisi casualmente in due gruppi: il gruppo mFAT che ha ricevuto il trattamento Rigenera e il gruppo ialuronico che ha ricevuto acido ialuronico (Figura 77).

Patient	QuickCalcks (Random Generator)	Bread	Weight (kg)	Sex	Age	BCS	Joint Affected by OA
1	A	Mixed breed	17	F/OE	7	7	Left shoulder
2	B	Pit bull	27	M	4	5	Right shoulder
3	A	Mixed breed	21	F/OE	6	8	Right shoulder
4	B	Mixed breed	18	M/N	13	6	Left elbow
5	A	Armstaff	25	F/OE	6	5	Left stifle
6	B	Maremma shepherd	47	M	6	7	Right tarsus
7	A	Mixed breed	31	F/OE	5	8	Right stifle
8	B	German sheperd	32	F	10	5	Left elbow
9	A	Labrador retriever	41	F	7	8	Right shoulder
10	B	Mixed breed	26	M	11	3	Left stifle
11	A	Mixed breed	10	M	12	8	Right hip
12	B	Labrador retriever	39	M	12	8	Right shoulder
13	B	Mixed breed	15	F/OE	10	5	Left stifle
14	B	Golden retriever	36	F/OE	3	6	Left hip
15	A	Mixed breed	12	F	7	8	Left hip
16	B	Golden retriever	40	M	5	7	Right hip
17	B	Labrador retriever	36	F	8	8	Right shoulder
18	B	Mixed breed	27	F	7	6	Right stifle
19	A	Chow-Chow	31	F/OE	9	8	Right elbow
20	A	Samoyed	37	M	10	8	Left elbow
21	B	Mixed breed	31	M	10	6	Right stifle
22	A	Labrador retriever	41	M/N	12	8	Left stifle
23	B	Parson terrier	9	F/OE	7	7	Left stifle
24	B	Golden retriever	27	F	5	5	Right elbow
25	A	Labrador retriever	38	F/OE	5	6	Left elbow
26	A	Mixed breed	33	M	6	6	Left elbow
27	A	Fox terrier	10	M	8	6	Right shoulder
28	B	Labrador retriever	25	M	7	3	Right elbow
29	B	Mixed breed	35	F/OE	11	3	Right shoulder
30	A	Duchshound	7	F/OE	8	6	Left shoulder
31	A	Mixed breed	31	F	9	3	Right elbow
32	A	Mixed breed	35	M	7	3	Left elbow
33	B	Boxer	27	F	8	3	Left hip
34	B	Australian shepherd	18	M/N	7	3	Right shoulder
35	A	Dalmatian	23	F	5	3	Right shoulder
36	A	German shepherd	24	F/OE	9	2	Right hip
37	B	Maremma shepherd	42	M	8	5	Left shoulder
38	A	Border collie	15	F	4	2	Left hip
39	B	Mixed breed	25	F/OE	8	3	Left stifle
40	A	Mixed breed	40	F/OE	8	3	Right shoulder

I cani selezionati per ciascun gruppo avevano un'età compresa tra 3 e 13 anni, con una media di 7,5 per il gruppo mFAT e 8 per il gruppo ialuronico; il peso medio era di 29,1 kg, associato a un punteggio di condizione corporea (BCS) di 5,2, per il gruppo mFAT, e 26,1 kg, associato a un BCS di 5,8 per l'acido ialuronico. Non sono state imposte restrizioni sul sesso né sull'articolazione interessata. Il genere è stato distribuito in modo casuale come segue: 6 maschi (1 castrato) e 14 femmine (9 castrate) per il gruppo mFAT e 10 maschi (2 castrati) e 10 femmine (5 castrate) per il gruppo ialuronico. Le articolazioni interessate erano, rispettivamente, sette spalle, sei gomiti, quattro anche e tre ginocchia per il gruppo

mFAT e sei spalle, quattro gomiti, tre anche, sei ginocchia e un tarso per il gruppo ialuronico (**Figura 77**).



Non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi per i criteri di inclusione di peso, BCS, età e sesso e non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i gruppi per quanto riguarda l'esame clinico, CBPI e la valutazione radiografica. L'artrocentesi ha prodotto un volume adeguato di liquido sinoviale per la valutazione citologica in 35 dei 40 cani a T0. Tuttavia, il volume è stato molto impegnativo per il test delle citochine, essendo adeguato solo per alcuni dei 40 pazienti per TNF α , IL-6 e IL-1 β . Non sono state rilevate differenze statisticamente significative per il punteggio citologico a T0 tra i gruppi e la dimensione del campione per il test delle citochine non era adeguata per l'analisi statistica.

7.1.8.2 Esame clinico: esito a breve termine

Abbiamo identificato 35 pazienti su 40 (87,5%) che hanno completato il periodo di valutazione a breve termine dopo 60 giorni a T2: 19 su 20 (95%) per il gruppo mFAT e 16 su 20 (80%) per il gruppo ialuronico. I pazienti esclusi (uno per il gruppo mFAT e quattro per il gruppo ialuronico) avevano già richiesto l'uso di FANS sistemici dopo trenta giorni a causa di un aggravamento del dolore. L'analisi statistica dei 35 pazienti per il punteggio di zoppia in deambulazione ha mostrato differenze significative tra i gruppi A e B dopo 30 giorni ($p = 0,0338$) e dopo 60 giorni ($p = 0,0037$). Il test di Friedman all'interno dei gruppi ha mostrato una differenza statistica per il gruppo ialuronico solo tra T0 e T1 ($p = 0,0077$), mentre per il gruppo mFAT, il test di Friedman ha rivelato un'importante differenza statisticamente significativa tra T0 e T1 ($p = 0,0027$) e tra T0 e T2 ($p = 0,0001$) (**Figura 78d**). Per il punteggio di zoppia in appoggio, l'analisi statistica ha mostrato differenze significative tra il gruppo mFAT e il gruppo ialuronico dopo 30 giorni ($p = 0,0247$) e dopo 60 giorni ($p = 0,0087$). Un'analisi statistica all'interno dei gruppi ha mostrato una differenza significativa solo per il gruppo MFAT ($p = 0,0006$) tra T0 e T2 (**Figura 78c**).

Un test statistico di Mann-Whitney per il punteggio del dolore alla palpazione ha mostrato lievi differenze significative tra i gruppi mFAT e ialuronico dopo 60 giorni ($p = 0,0372$) e ha anche mostrato una forte differenza statistica ($p = 0,0002$) all'interno del gruppo mFAT tra T0 e T2 (**Figura 78b**). Un'analisi statistica del punteggio analogico visivo del dolore ha dimostrato che c'era una differenza significativa tra i gruppi a T2 ($p = 0,0149$) associata a una forte significatività all'interno del gruppo mFAT tra T0 e T2 ($p < 0,0001$) e T0 e T1 ($p = 0,0094$) (**Figura 78a**). Non sono state notate differenze statisticamente significative tra i gruppi per BCS, con una sola differenza all'interno del gruppo ialuronico ($p = 0,0047$) tra T0 e T2. Per l'analisi statistica della circonferenza e del ROM, non sono state segnalate differenze statistiche nella variazione relativa né tra né all'interno dei gruppi.

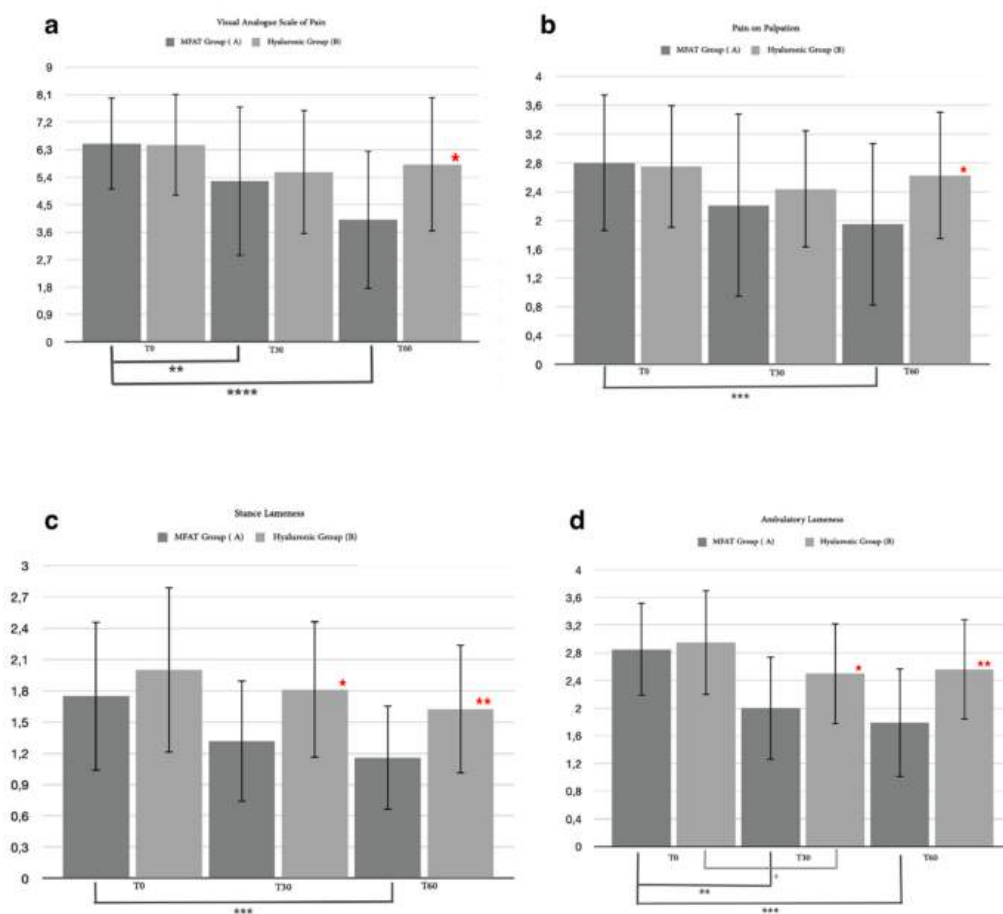


Fig 78: Questi grafici mostrano le differenze nei dati dell'analisi statistica tra il gruppo di acido ialuronico e il gruppo mFAT per (a) punteggio visivo analogico del dolore dopo 30 e 60 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0149$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (**: $p = 0.0094$; ***: $p = 0.0001$); (b) dolore alla palpazione dopo 30 e 60 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0372$) indicano forti differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (***: $p = 0.0002$); (c) zoppia in stazione dopo 30 e 60 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0247$; **: $p = 0.0087$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (***: $p = 0.0006$); e (d) zoppia ambulatoriale dopo 30 e 60 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0338$; **: $p = 0.0037$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (*: $p = 0.0077$; **: $p = 0.0027$; ***: $p = 0.0001$).

7.1.8.3 Canine Brief Pain Inventory Index (CBPI): esito a breve termine

Oltre all'esame clinico, 35 pazienti su 40 hanno completato il periodo di follow-up a breve termine per CBPI: 16 per il gruppo ialuronico e 19 per il gruppo mFAT. I dati risultanti derivati dal questionario sono stati suddivisi in due domini, il dominio della gravità del dolore (PSI) e il dominio dell'interferenza del dolore (PII), come di solito si usa per il CBPI. L'analisi statistica per il PSI ha dimostrato che c'era una lieve differenza significativa tra il gruppo mFAT e il gruppo ialuronico dopo 30 giorni ($p = 0,0236$) e una forte differenza significativa dopo 60 giorni ($p < 0,0001$). Il test di Friedman non ha mostrato alcuna significatività per alcun tempo per il gruppo ialuronico, mentre all'interno del gruppo mFAT, c'era un'importante differenza significativa tra T0 e T1 ($p = 0,0021$) e tra T0 e T2 ($p < 0,0001$) (**Figura 79b**). Per il PII, un test di Mann-Whitney tra il gruppo mFAT e il gruppo ialuronico ha mostrato una differenza significativa ($p = 0,0154$) dopo 60 giorni; una differenza significativa è stata rilevata entro T0 e T2 per il gruppo ialuronico ($p = 0,0133$), e tra T0 e T1 ($p = 0,0094$) e tra T0 e T2 ($p < 0,0001$) all'interno del gruppo mFAT (**Figura 79a**).

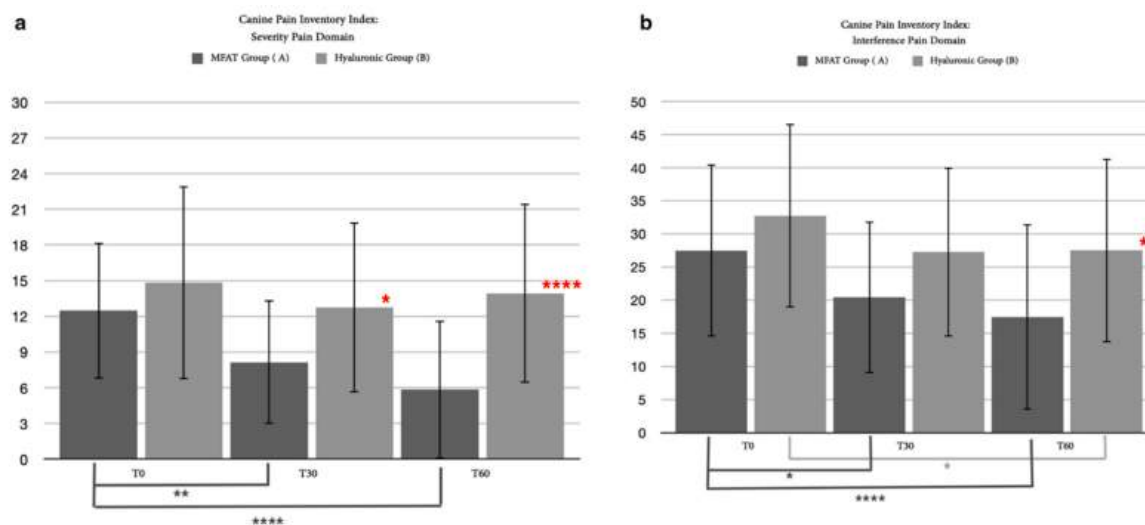


Fig 79: Questi grafici mostrano le differenze nei dati dell'analisi statistica tra il gruppo di acido ialuronico e il gruppo mFAT per (a) gravità del dolore CBPI dopo 30 giorni e dopo 60 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0154$; ****: $p = 0.0133$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (**: $p = 0.0094$; ****: $p < 0.0001$); e (b) interferenza del dolore CBPI dopo 30 giorni e dopo 60 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p < 0.0001$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (*: $p = 0.0021$; ****: $p < 0.0001$).

7.1.8.4 Valutazione radiografica

Come per l'esame clinico e l'indice CBPI, abbiamo raccolto dati radiografici per 35 dei 40 pazienti. Sebbene sia stato evidenziato un leggero peggioramento delle immagini radiografiche di tutti i pazienti, dovuto in particolare a un leggero aumento delle

dimensioni degli osteofiti, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi o all'interno del gruppo (**Figura 80** e **Figura 81**).



Fig 80. La figura mostra l'esame radiografico eseguito nel gruppo mFAT a T0 (**a1–a4**), T1 (**a2–a5**) e T2 (**a3–a6**) e nel gruppo di acido ialuronico a T0 (**b1–b4**), T1 (**b2–b5**) e T2 (**b3–b6**). La figura (**a1–a6**): le immagini radiografiche di un paziente del gruppo mFAT mostrano un quadro di artrosi cronica della spalla con la presenza di osteofiti (freccia rossa) (**a1**). La figura (**b1–b4**) mostra un quadro radiografico di osteoartrite cronica della spalla di un paziente del gruppo di controllo a T0. Le figure (**b2–b5**) e (**b3–b6**) mostrano l'evoluzione del quadro radiografico nei momenti di valutazione T1 e T2 rispetto a T0.

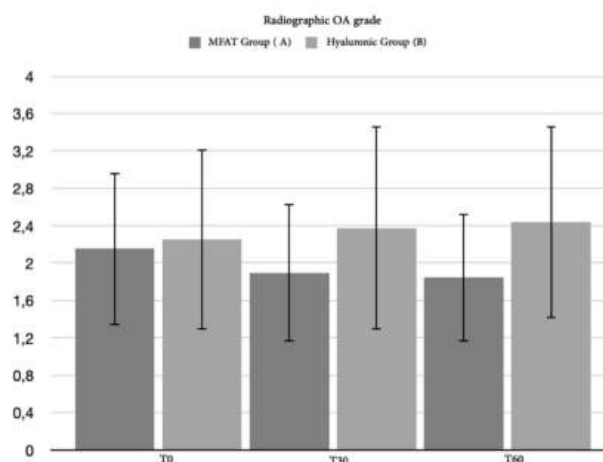


Fig 81. Questi grafici mostrano le differenze nei dati dell'analisi statistica tra il gruppo di acido ialuronico e il gruppo MFAT per il grado di osteoartrite radiografica dopo 30 giorni e dopo 60 giorni. Come indicato dall'assenza di asterischi, nessuna differenza statistica tra i gruppi, né all'interno dei gruppi, è stata evidenziata dall'analisi statistica.

7.1.8.5 Valutazione sinoviale

In 35 dei 40 pazienti arruolati nello studio (87,5%), è stato possibile ottenere una quantità adeguata di liquido sinoviale prima del trattamento (T0) per valutare e classificare citologicamente lo stato infiammatorio dell'articolazione. Di questi, solo 31 pazienti (88,57%) hanno completato il follow-up a breve termine (T2): 14 per il gruppo ialuronico e 17 per il gruppo MFAT. Statisticamente, in 31 pazienti, il punteggio sinoviale citologico ha mostrato una lieve differenza significativa tra i gruppi dopo 30 giorni ($p = 0,0331$) e una forte differenza significativa dopo 60 giorni ($p = 0,0008$). Non sono state osservate differenze all'interno del gruppo ialuronico, ma è stata osservata una differenza significativa tra T0 e T1 ($p = 0,0258$) e T0 e T2 ($p = 0,0006$) nel gruppo mFAT (**Figura 82**). In generale, la mancanza di un volume adeguato di liquido sinoviale ha reso difficile eseguire il test delle citochine sinoviali. I dati grezzi ottenuti dai test ELISA non erano sufficienti per eseguire analisi statistiche per $TNF\alpha$, IL-6 o IL- β . Abbiamo raccolto dati utili durante il breve follow-up per 7 pazienti su 40 per $TNF\alpha$ (17,5%), 4 per il gruppo mFAT e 3 per il gruppo ialuronico; 5 su 40 per IL-6 (12,5%), 2 per il gruppo mFAT e 3 per il gruppo ialuronico; e solo un paziente per IL-1 β (2,5%), appartenente al gruppo ialuronico. Nonostante l'assenza di analisi statistiche, i test ELISA hanno suggerito una lieve diminuzione in termini di concentrazione di citochine nel gruppo mFAT, mentre hanno mostrato un andamento opposto nel gruppo ialuronico (**Figura 83**).

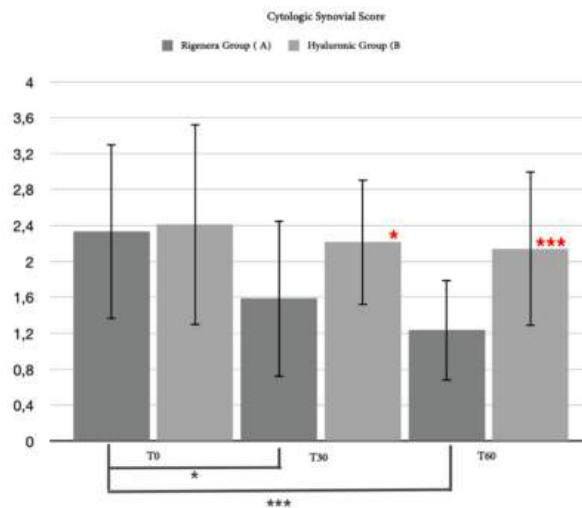


Fig 82. Questo grafico mostra le differenze nei dati dell'analisi statistica tra il gruppo di acido ialuronico e il gruppo mFAT per il punteggio citologico sinoviale dopo 30 giorni e dopo 60 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0331$; ***: $p = 0.008$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (*: $p = 0.0258$; ***: $p = 0.0006$).

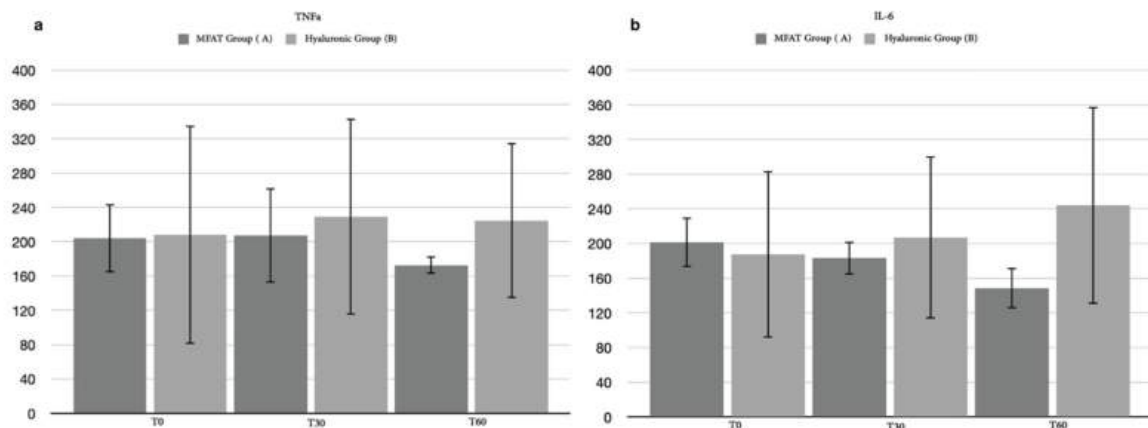


Fig 83. Differenza del fattore di necrosi tumorale (TNF) (a) e interleuchina-6 (IL-6) (b) tra il gruppo di acido ialuronico e il gruppo MFAT dopo 30 giorni e dopo 60 giorni.

7.1.8.6 Esame clinico: esito a lungo termine

Solo 25 pazienti su 35 (71,43%) che hanno completato il follow-up a breve termine hanno concluso lo studio con un follow-up a lungo termine dopo 180 giorni di trattamento (T3): 15 su 19 (78,94% dei pazienti del gruppo mFAT) per il gruppo mFAT e 10 su 16 (62,5% dei pazienti del gruppo ialuronico) per il gruppo ialuronico. I pazienti che non sono stati inclusi (quattro per il gruppo mFAT e sei per il gruppo ialuronico) hanno richiesto l'uso di FANS sistemici tra 60 e 180 giorni a causa di un aggravamento del dolore articolare. È stata eseguita un'analisi statistica con i dati dell'esame clinico relativi al follow-up a breve termine associati ai dati del follow-up a 6 mesi dei 25 pazienti, sia tra i gruppi che all'interno di essi. Il test di Mann-Whitney per la zoppia deambulatoria ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi a 30 giorni ($p = 0,0118$) e dopo 60 giorni ($p = 0,0094$), che è persistita a 180 giorni ($p = 0,0413$); nessuna significatività

statistica è stata osservata all'interno del gruppo di acido ialuronico, mentre sono state riscontrate differenze significative nel gruppo mFAT tra T0 e 30 giorni ($p = 0.0007$), T0 e 60 giorni ($p < 0.0001$), T0 e 180 giorni ($p = 0.0339$), e tra 60 e 180 giorni ($p = 0.0477$) (**Figura 84d**). Un'indagine sulla zoppia da appoggio ha mostrato una differenza significativa tra i gruppi a T1 ($p = 0,0259$), T2 ($p = 0,0059$) e T3 ($p = 0,0064$); è stata notata una differenza statistica all'interno del gruppo ialuronico tra T0 e T2 ($p = 0,0464$) così come nel gruppo mFAT tra T0 e T2 ($p = 0,0089$) e tra T0 e T3 ($p = 0,0196$) (**Figura 84c**). Il test di Mann-Whitney non ha mostrato alcuna significatività tra i gruppi considerando il dolore alla palpazione, che è stato notato solo all'interno del gruppo mFAT tra T0 e 30 giorni ($p = 0,0109$) e tra T0 e 60 giorni ($p = 0,0002$) (**Figura 84b**).

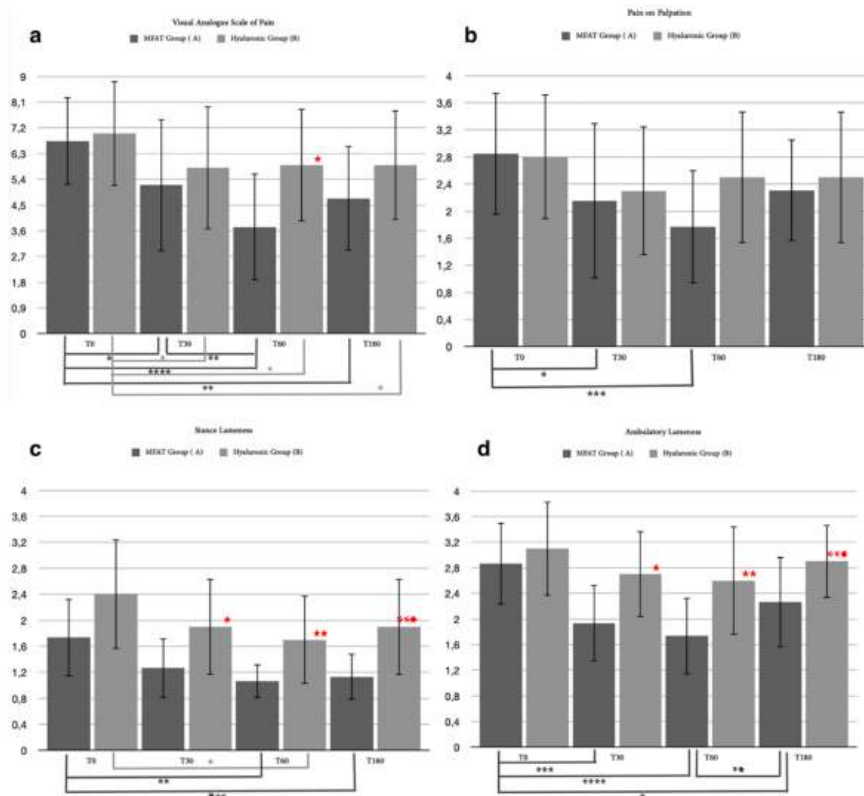


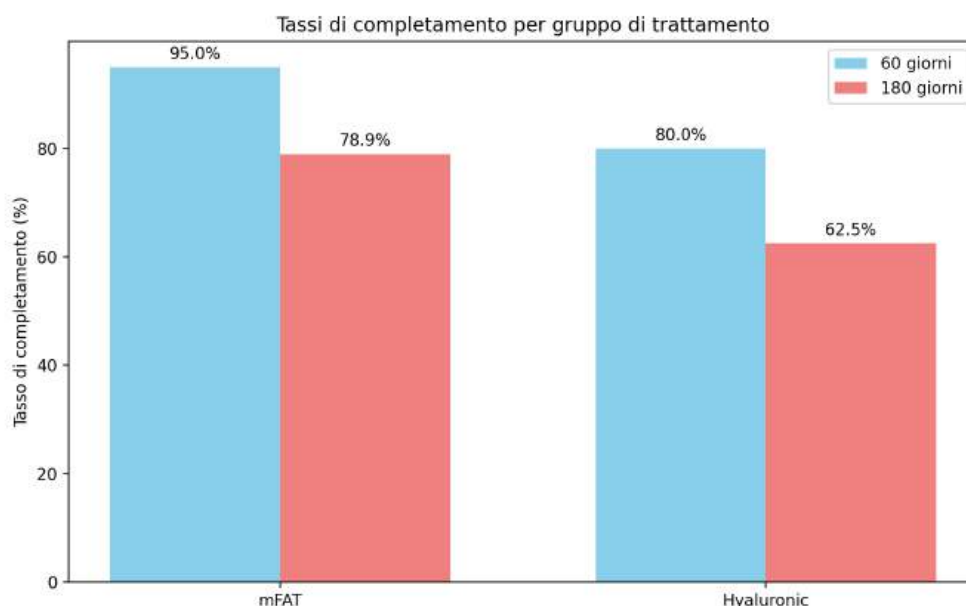
Fig 84. Differenze nei dati dell'analisi statistica tra il gruppo di acido ialuronico e il gruppo mFAT per (a) punteggio visivo analogico del dolore dopo 30 giorni, 60 giorni e 180 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.01$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$); (b) dolore alla palpazione dopo 30 giorni, 60 giorni e 180 giorni. Gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (*: $p = 0.0109$; ***: $p = 0.0002$); (c) zoppia in stazione dopo 30 giorni, 60 giorni e 180 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0259$; **: $p = 0.0059$; ***: $p = 0.0064$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (*: $p = 0.0464$; **: $p = 0.0089$; ***: $p = 0.0196$); e (d) zoppia ambulatoriale dopo 30 giorni, 60 giorni e 180 giorni. Gli asterischi rossi (*: $p = 0.0118$; **: $p = 0.0094$; ***: $p = 0.0413$) indicano differenze significative tra i gruppi, e gli asterischi colorati indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (*: $p = 0.0339$; **: $p = 0.0477$; ***: $p = 0.0007$; ****: $p < 0.0001$).

Un'analisi statistica tra i gruppi mFAT e ialuronico ha dimostrato una differenza significativa per la VAS del dolore solo dopo 60 giorni dal trattamento ($p = 0,0100$); i test statistici hanno mostrato una significatività all'interno dei gruppi tra il giorno 0 e qualsiasi altro follow-up in entrambi i gruppi (ialuronico: T0–T1, $p = 0,0464$; T0–T2, $p = 0,0304$; e T0–T3, $p = 0,0377$; MFAT: T0–T1, $p = 0,0404$; T0–T2, $p < 0,0001$; T0–T3, $p = 0,0015$) e all'interno del gruppo MFAT tra 30 e 60 giorni ($p = 0,0037$) (**Figura 84a**). Non è stata trovata alcuna evidenza statistica tra i gruppi per il BCS di 25 pazienti in qualsiasi momento, mentre è stata notata una differenza significativa rispetto a T0 e T2 all'interno di entrambi i gruppi (ialuronico: $p = 0,0050$; MFAT: $p = 0,0381$).

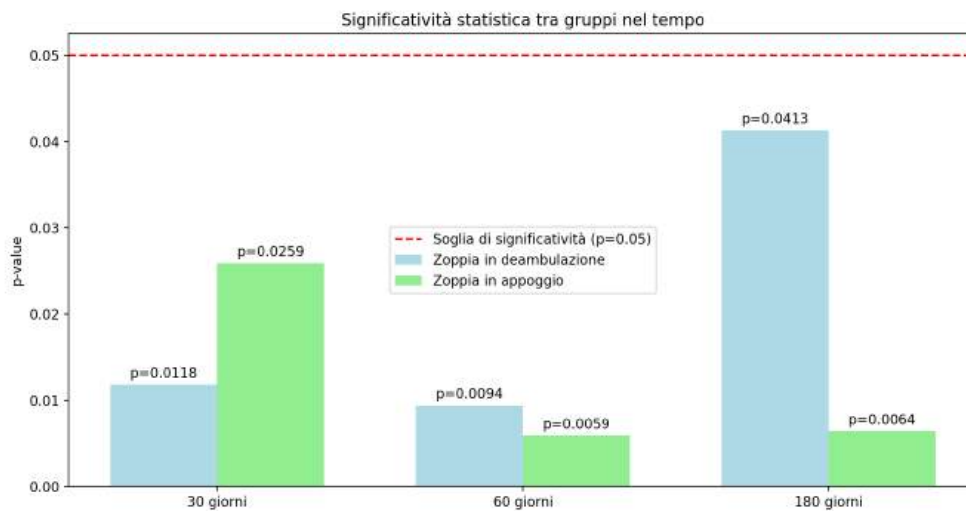
7.1.8.7 Analisi sulle differenze tra breve e lungo termine

Nello studio che confronta l'efficacia dei trattamenti mFAT e acido ialuronico per l'osteoartrite nei cani, sono state osservate differenze significative sia negli esiti a breve termine che a lungo termine.

- Esiti a Breve Termine (60 Giorni): Come mostrato nella **Figura 85A**, i tassi di completamento sono stati notevolmente più alti per il gruppo mFAT, con il 95% dei pazienti che ha completato il periodo di valutazione rispetto all'80% del gruppo ialuronico. Miglioramenti statisticamente significativi sono stati osservati nel gruppo mFAT per la zoppia del cammino ($p=0.0338$ a 30 giorni e $p=0.0037$ a 60 giorni), zoppia in carico ($p=0.0247$ a 30 giorni e $p=0.0087$ a 60 giorni) e dolore alla palpazione ($p=0.0372$ a 60 giorni). Questi risultati indicano un beneficio a breve termine più pronunciato per il trattamento mFAT.



- Esiti a Lungo Termine (180 Giorni): La **Figura 85B** illustra i miglioramenti sostenuti nel gruppo mFAT nel lungo periodo, con un tasso di completamento del 78.94% rispetto al 62.5% del gruppo ialuronico. Il gruppo mFAT ha continuato a mostrare miglioramenti significativi nella zoppia del cammino ($p=0.0118$ a 30 giorni, $p=0.0094$ a 60 giorni e $p=0.0413$ a 180 giorni) e nella zoppia in carico ($p=0.0259$ a 30 giorni, $p=0.0059$ a 60 giorni e $p=0.0064$ a 180 giorni). Questi risultati suggeriscono che il trattamento mFAT non solo fornisce un sollievo immediato, ma mantiene anche la sua efficacia nel tempo, a differenza del trattamento ialuronico, che ha mostrato benefici limitati a lungo termine.



In generale, lo studio evidenzia la superiorità dell'efficacia del trattamento mFAT nella gestione dei sintomi dell'osteoartrite nei cani, con miglioramenti significativi osservati sia a breve che a lungo termine, come mostrato nelle figure.

7.1.8.8 Canine Brief Pain Inventory Index: esito a lungo termine

Un altro risultato a lungo termine è stato importato dal questionario compilato dai proprietari. Similmente alla valutazione clinica, abbiamo raccolto i risultati di 25 dei 35 pazienti che hanno completato il breve periodo di studio. L'analisi statistica risultante dal PSI tra i gruppi ha mostrato differenze significative dopo 60 ($p = 0,0004$) e 180 giorni ($p = 0,0025$), associate a una differenza significativa all'interno del gruppo mFAT tra il giorno 0 e qualsiasi altro giorno (T1, $p = 0,0281$; T2, $p < 0,0001$; T3, $p = 0,0011$) (**Figura 86b**). Il punteggio PII ha determinato differenze statisticamente significative tra i gruppi a T2 ($p = 0,0317$) e T3 ($p < 0,0001$), mostrando anche una significatività all'interno del gruppo

ialuronico tra i giorni 0 e 60 ($p = 0,0335$) e all'interno del gruppo MFAT tra T0 e T2 ($p = 0,0002$), T0 e T3 ($p < 0,0001$) e tra T1 e T3 ($p = 0,0179$) (**Figura 86a**).

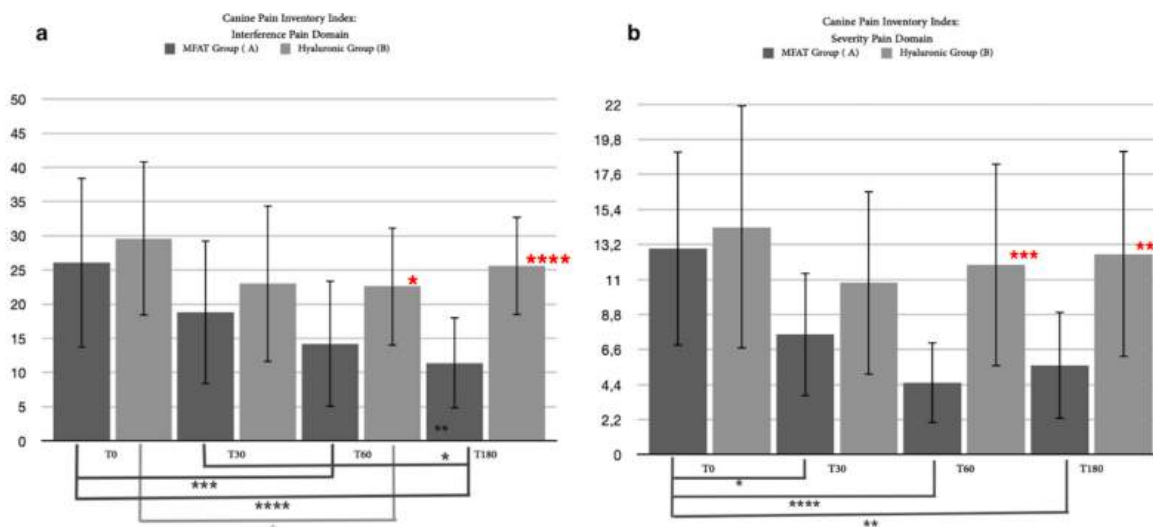
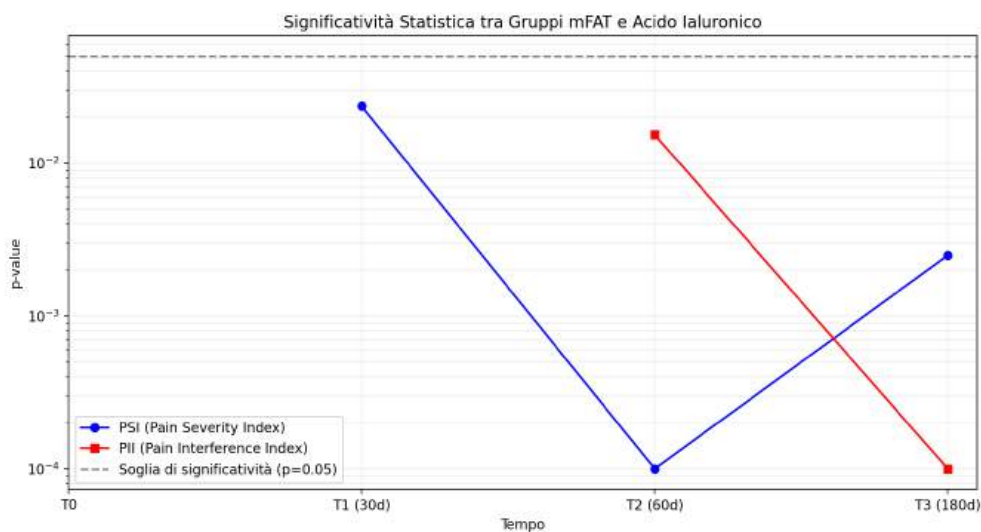


Fig 86. Differenze nell'analisi statistica dei dati tra il gruppo ialuronico e il gruppo mFAT per (a) il CBPI per l'interferenza del dolore dopo 30 giorni, 60 giorni e 180 giorni. Asterischi rossi (*: $p = 0.0317$; ***: $p < 0.0001$) indicano differenze significative tra i gruppi, e asterischi colorati in base al gruppo indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (: $p = 0.0335$; **: $p = 0.0179$; *: $p = 0.0002$; ****: $p < 0.0001$); e (b) il CBPI per la severità del dolore dopo 30 giorni, 60 giorni e 180 giorni. Asterischi rossi (: $p = 0.0025$; **: $p = 0.0004$) indicano differenze significative tra i gruppi, e asterischi colorati in base al gruppo indicano differenze significative all'interno di ciascun gruppo (: $p = 0.0281$; **: $p = 0.0011$; ****: $p < 0.0001$).

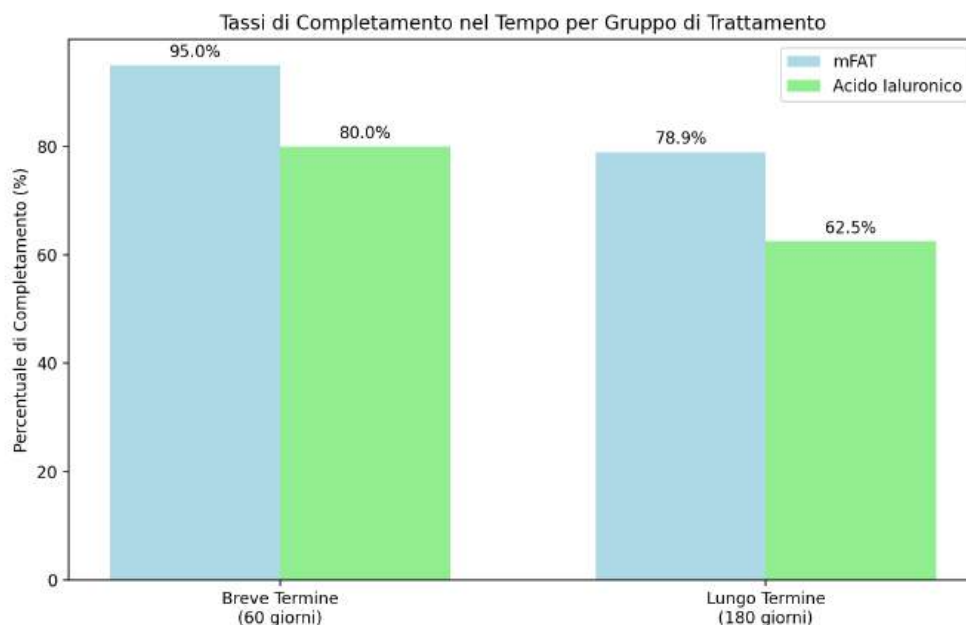
7.1.8.9 Analisi sulle differenze tra breve e lungo termine

Basandomi sull'analisi del Canine Brief Pain Inventory (CBPI), possiamo osservare interessanti differenze tra i trattamenti mFAT e acido ialuronico nel tempo.



Come mostrato nella **Figura 87A**, che illustra la significatività statistica tra i gruppi, possiamo osservare una progressiva divergenza nei risultati tra i due trattamenti. Il Pain Severity Index (PSI) mostra differenze significative già dai 30 giorni ($p=0.0236$), che

diventano ancora più marcate a 60 giorni ($p < 0.0001$) e si mantengono significative a 180 giorni ($p = 0.0025$). Il Pain Interference Index (PII) mostra un andamento simile, con differenze significative che emergono a partire dai 60 giorni ($p = 0.0154$) e diventano ancora più evidenti a 180 giorni ($p < 0.0001$).



La **Figura 87B** illustra i tassi di completamento dello studio nei due gruppi. Come si può notare, il gruppo mFAT ha mantenuto un tasso di completamento più elevato sia nel breve termine (95% a 60 giorni) che nel lungo termine (78.9% a 180 giorni) rispetto al gruppo dell'acido ialuronico (80% a 60 giorni e 62.5% a 180 giorni).

Analizzando più in dettaglio:

1. Risultati a Breve Termine:

- Il gruppo mFAT ha mostrato miglioramenti significativi sia nel PSI ($p = 0.0021$ tra T0 e T1, $p < 0.0001$ tra T0 e T2) che nel PII ($p = 0.0094$ tra T0 e T1, $p < 0.0001$ tra T0 e T2)
- Il gruppo ialuronico ha mostrato miglioramenti limitati, con significatività solo nel PII tra T0 e T2 ($p = 0.0133$)

1. Risultati a Lungo Termine:

- Il gruppo mFAT ha mantenuto miglioramenti significativi in entrambi gli indici:
 - PSI: significativo tra T0 e tutti i timepoint successivi (T1: $p = 0.0281$, T2: $p < 0.0001$, T3: $p = 0.0011$)
 - PII: differenze significative tra T0-T2 ($p = 0.0002$), T0-T3 ($p < 0.0001$), e T1-T3 ($p = 0.0179$)

- Il gruppo ialuronico ha mostrato miglioramenti più limitati, con una significatività nel PII solo tra T0 e T2 ($p=0.0335$)

Questi risultati supportano la superiore efficacia del trattamento mFAT rispetto all'acido ialuronico, dimostrando non solo un maggior effetto analgesico ma anche una migliore persistenza dei benefici nel tempo, come evidenziato dai grafici presentati.

7.1.8.10 Animali esclusi

Alcuni pazienti sono stati esclusi durante il periodo di ricerca, in particolare 5/40 (12,5%) per l'esito a breve termine (10% del gruppo ialuronico e 2,5% del gruppo MFAT), che è salito a 15/40 (37,5%) per l'esito a lungo termine: 25% per il gruppo ialuronico e 12,5% per il gruppo MFAT. Considerando la percentuale di pazienti che hanno abbandonato la presente ricerca a causa di un inadeguato controllo del dolore tramite terapia intra-articolare, gli autori hanno voluto valutare la presenza di differenze statistiche nella frequenza della somministrazione di antinfiammatori a diversi termini di follow-up. Il test esatto di Fisher non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i gruppi.

7.1.9 Isolamento e Caratterizzazione degli ASC-Esosomi

Gli EVs sono stati valutati per dimensione, forma e contenuto proteico. L'analisi della tracciabilità delle nanoparticelle (NTA) (come mostrato nella **Figura 88A**) ha evidenziato una distribuzione della dimensione centrata attorno a 180 nm, indicativa dei tipici diametri degli esosomi piccoli. La distribuzione della dimensione delle particelle basata sull'intensità mostrava un picco unico che variava da 90 a 290 nm (**Figura 88A**). La microscopia elettronica di trasmissione (TEM) (**Figura 88B**) ha mostrato vescicole membranose con forme arrotondate o ovali e dimensioni nanometriche. Inoltre, l'analisi Elisa ha confermato la presenza di CD63 (**Figura 88C**) e CD81 (**Figura 88C**) sugli sEVs, convalidando la loro origine da cellule staminali mesenchimali (MSC). Collettivamente, questi risultati indicano che gli EVs isolati da MSC umani tramite ultrafiltrazione presentavano dimensioni inferiori ai 200 nm, contenevano almeno una proteina di ciascuna categoria di proteine transmembrana e intracellulari, conformemente alle linee guida sul Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV) (Welsh JA et al, J Extracell Vesicles, 2024), e mostrano antigeni di superficie specifici per le MSC umane, categorizzando così le preparazioni di EV come small EVs derivati da MSC umane (MSC-sEVs).

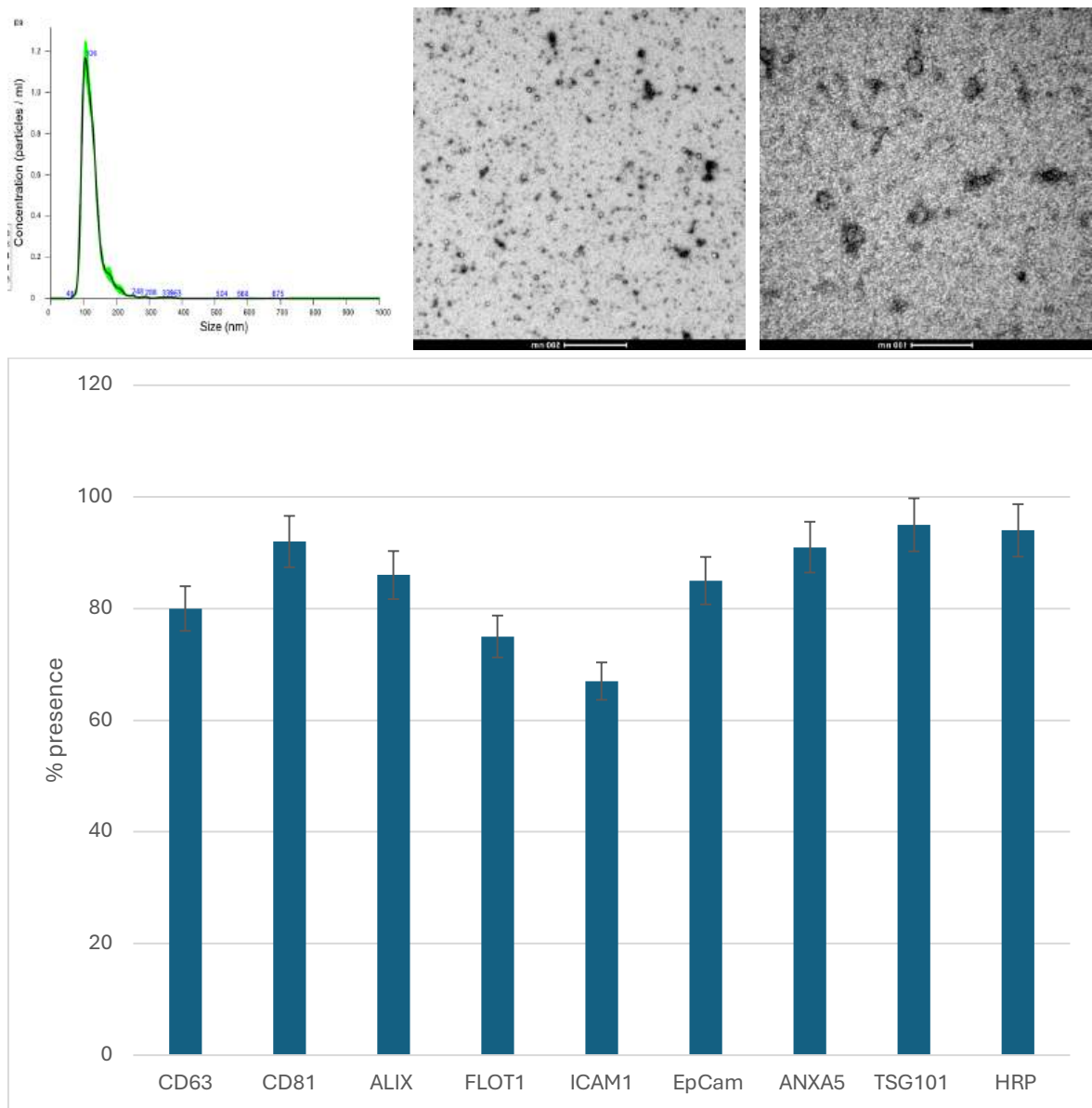


Fig 88. Analisi delle Caratteristiche degli ASC-Esosomi. (A) Distribuzione delle dimensioni delle particelle degli esosomi esaminata tramite Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS). (B) Analisi TEM degli ASC-EVs. (C) Esame mediante citometria a flusso che mostra la presenza dei tetraspanin di membrana CD63 e CD81 negli ASC-EVs, rispettivamente.

7.1.10 Misurazioni di Aequorin

L'obiettivo di questa tecnologia è valutare se gli esosomi possano ridurre il dolore influenzando i nocicettori. Come illustrato nella **Figura 89**, è evidente che il legame selettivo di agonisti, come la nocicettina, ai rispettivi recettori porta a un significativo aumento dei livelli di calcio mitocondriale. Questo effetto è notevolmente assente nel gruppo di controllo negativo, che manca di stimolazione agonistica.

Per convalidare i risultati ottenuti dal saggio basato sull'aequorin mitocondriale, sono state investigate le variazioni del $[Ca^{2+}]_c$ citosolico utilizzando il metodo Fura-2/AM nelle cellule che esprimono il recettore degli oppioidi kappa (KOP). La stimolazione del

recettore degli oppioidi kappa (KOP) con l'agonista specifico dinorfina A (1 mM) ha comportato un aumento transitorio atteso del $[Ca^{2+}]_c$ (**Figura 89A**). Come mostrato nella **Figura 89B**, una risposta simile è stata osservata nelle cellule stimulate con acido ialuronico (200 kDa), sebbene queste risposte siano più piccole sia nell'ampiezza (0.4160.12 vs 0.1560.09 unità di rapporto; n=26) che nella durata (5768 vs 11614 s), rispettivamente. La successiva stimolazione con dinorfina A ha indotto un aumento transitorio minore nelle cellule pretrattate con acido ialuronico rispetto alle cellule non trattate. L'analisi delle singole tracce ha indicato che la somma dell'area sotto la curva delle cellule trattate sia con acido ialuronico che dinorfina A era comparabile a quella osservata nelle cellule stimulate solo con dinorfina A. Questi dati suggeriscono che l'acido ialuronico agisce sullo stesso percorso di segnalazione di un agonista canonico, ovvero tramite attivazione selettiva del recettore KOP. Gli stessi cloni cellulari sono stati stimolati con due tipi di acido ialuronico (a basso peso molecolare (MW) a 6 kDa e MW medio a 200 kDa) a concentrazioni comprese tra 0.005 e 5 mg/ml e con esosomi derivati dal tessuto adiposo. Sebbene l'acido ialuronico a peso molecolare inferiore non sia stato in grado di indurre alcuna emissione di luce significativa, il peso molecolare maggiore ha indotto un'emissione di luce rilevabile significativa nell'espressione KOP, comparabile all'emissione ottenuta dagli ASCs-EVs. Gli esperimenti hanno chiaramente dimostrato che gli ASCs-EVs sono in grado di attivare selettivamente il recettore KOP, agendo come agonista parziale, simile all'acido ialuronico a peso molecolare medio (ossia, 200 kDa). È interessante notare che gli ASCs-EVs, come l'acido ialuronico, sono stati in grado di indurre una risposta di Ca^{2+} nelle cellule che esprimono endogenamente i recettori KOP; i nostri risultati corroborano l'osservazione che gli ASCs-EXO agiscono sui recettori KOP e non sugli altri OPr.

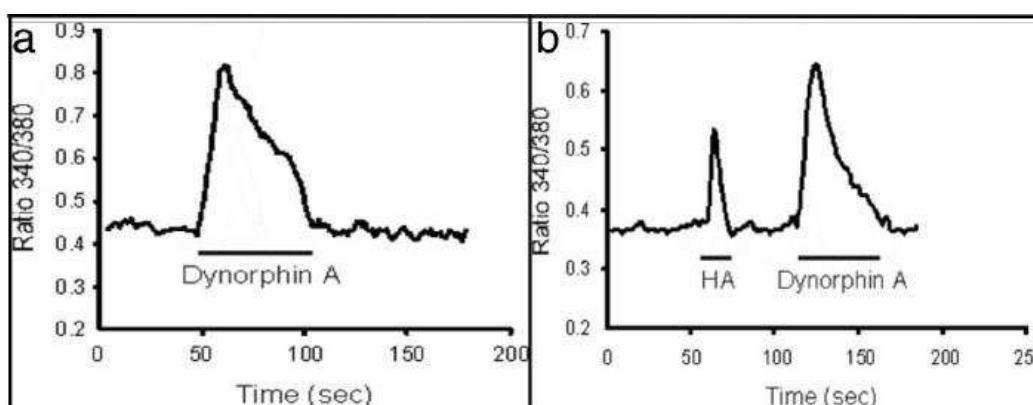


Fig. 89A Varianti del saggio basato su aequorina mitocondriale nelle variazioni del $[Ca^{2+}]_c$ citosolico, investigate con il metodo Fura-2/AM in cellule con recettore degli oppioidi kappa (KOP). La stimolazione del recettore degli oppioidi kappa (KOP) con l'agonista specifico dinorfina A (1 mM) (a) e cellule stimulate con acido ialuronico (200 kDa) (b). Possiamo notare che queste risposte sono più piccole sia in ampiezza che in durata.

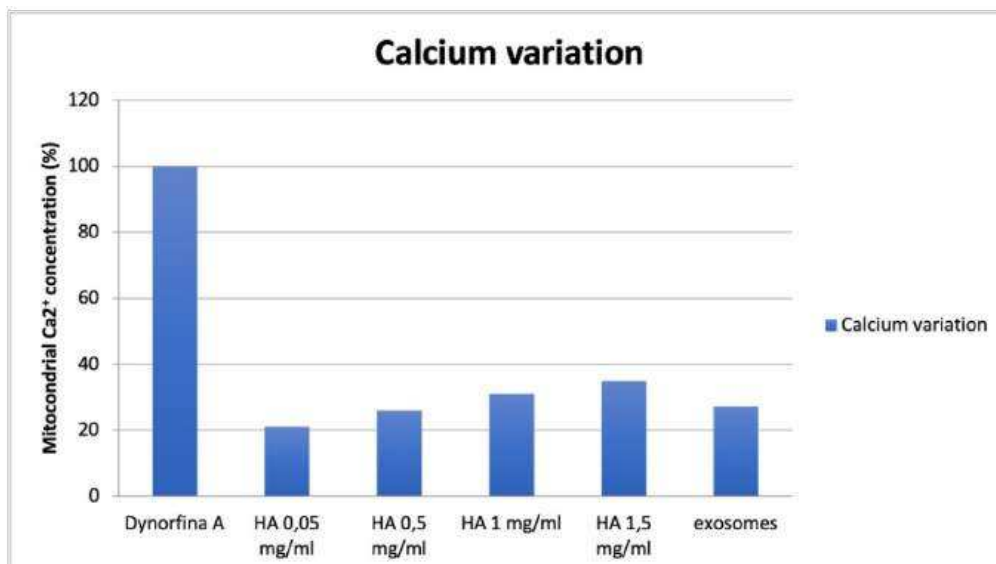


Fig. 89B. Variazione del calcio indotta dalla Dinorfina A, HA a diverse concentrazioni ed esosomi. Gli ASCs-EVs, come l'HA, sono in grado di indurre una risposta di Ca²⁺ nelle cellule che esprimono endogenamente i recettori KOP, corroborando l'osservazione che gli ASCs-EVs agiscono sui recettori KOP e non sugli altri OPr.

Per esplorare se il tessuto adiposo eserciti i suoi specifici effetti immunomodulatori attraverso specifici miRNA, abbiamo valutato l'espressione di miRNA coinvolti nella regolazione della polarizzazione dei macrofagi, come miR-21, miR-146a e miR-181, che hanno mostrato l'espressione più significativa e elevata nel tessuto adiposo e potrebbero modulare l'espressione di geni pro-infiammatori, riducendo o ritardando così l'infiammazione e migliorando la guarigione delle ferite. Infine, i nostri risultati hanno mostrato che il tessuto adiposo ospita citochine e fattori di crescita, come TGFβ1, interleuchina-6 (IL-6), IL-10 e fattore di crescita epatico (HGF), HLA-DRA, CD274B7,IDO, VCAM1, ICAM2 e chemiocine come CCL8, CXCL9 e CXCL10, che si sono dimostrati contribuire all'immunoregolazione (**Figura 90**).

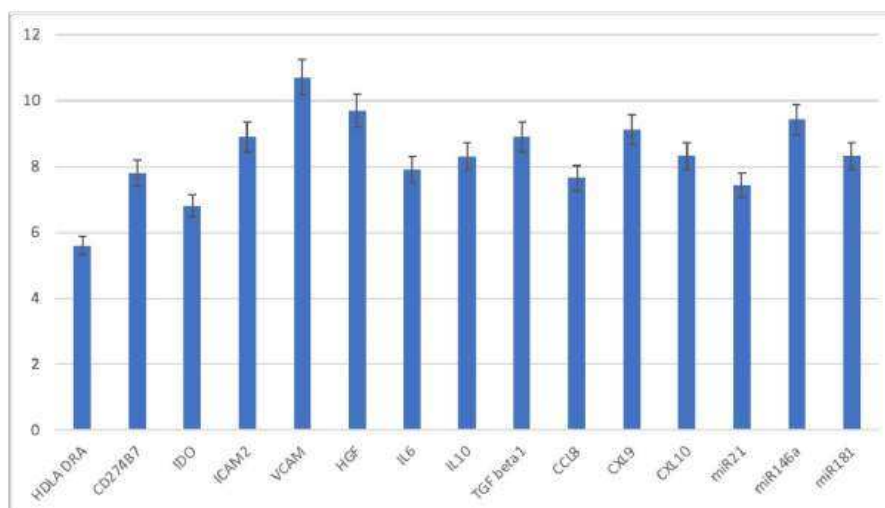


Fig. 90: Effetto immunomodulatorio del tessuto adiposo sui geni pro-infiammatori.

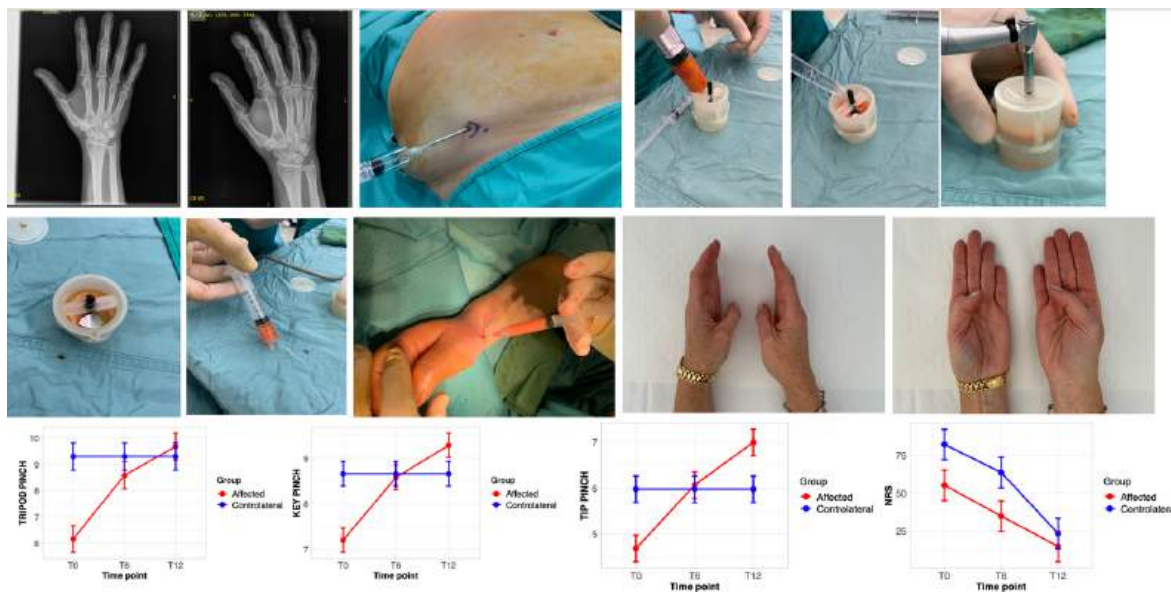
7.2 IN VIVO

7.2.1 Risultati clinici

Venticinque partecipanti sono stati arruolati nello studio. Abbiamo arruolato 25 pazienti con articolazioni affette da artrosi del pollice carpometacarpale (CMC) diagnosticate sintomaticamente e radiograficamente (Grado II della classificazione di Eaton). Tutti i pazienti presentavano un coinvolgimento unilaterale, mentre i pazienti con coinvolgimento bilaterale sono stati esclusi dallo studio. L'età media era di 56,2 anni (intervallo 45-70 anni, DS 8,71). Il 60% dei partecipanti era di sesso maschile e il 40% di sesso femminile. Diciotto erano destri. I pazienti sono stati monitorati secondo il nostro programma di follow-up. Nessun paziente ha segnalato un peggioramento dei sintomi. Non ci sono state complicanze postoperative, infezioni e reazioni avverse o effetti collaterali significativi. Tutti i pazienti sono stati valutati a intervalli regolari (**Figura 91**).

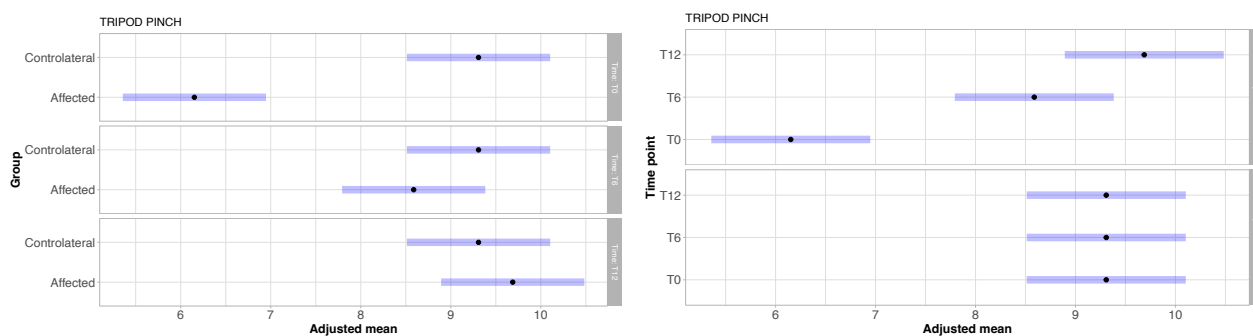
Overview of the Study with Preoperative and Postoperative Evaluations	
Assessments	
<i>Preoperative assessment</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Pain - Range of motion test - Function - Strength test - Opposition test 	NRS at rest and after activity MHQ Key, Tripod and Tip pinch Kapandji
Date for surgery programmed	
<i>Date of surgery</i>	
Application of a thermoplastic splint	
<i>2 weeks post treatment</i>	
Application of a soft splint	
<i>6 weeks post treatment</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Soft splint removed The exercise routine can now be progressively intensified in order to fully utilize the thumb.	
<i>6 months post treatment assessment</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Pain - Range of motion test - Function - Strength test - Opposition test 	NRS at rest and after activity MHQ Key, Tripod and Tip pinch Kapandji
<i>12 months post treatment assessment</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Pain - Range of motion test - Function - Strength test - Opposition test 	NRS at rest and after activity MHQ Key, Tripod and Tip pinch Kapandji

I risultati a 12 mesi dopo l'intervento sono stati utilizzati per valutare l'efficacia della procedura (**Figura 92**).

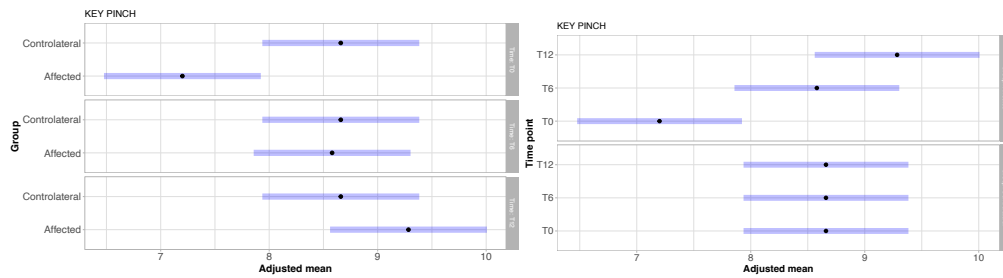


7.2.2 Forza

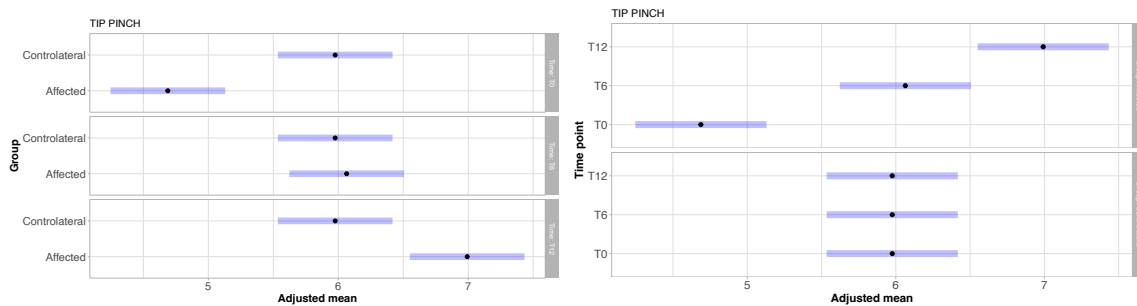
La forza è stata valutata con i test Tripod, Key e Tip pinch. Il Tripod test ha mostrato un miglioramento significativo da 6,152 Kg (DS 0,81) a 8,588 Kg (DS 1,59) dopo 6 mesi ($p < 0,001$) e a 9,688 Kg (DS 1,92) dopo 12 mesi ($p < 0,001$) (**Figura 93A**). Rispetto alla mano sana controlaterale, il Tripod test non ha mostrato differenze significative a 6 mesi ($p = 0,20$) e 12 mesi ($p = 0,5$) dopo il trattamento (**Figura 93B**).



Il Key test ha mostrato un miglioramento significativo da 7,02 Kg (DS 1,38) a 8,66 Kg (DS 2) dopo 6 mesi ($p < 0,001$) e a 9,28 Kg (DS 1,61) dopo 12 mesi ($p < 0,001$) (**Figura 94A**). Rispetto alla mano sana controlaterale, il Key test non ha mostrato differenze significative a 6 mesi ($p = 0,87$) e 12 mesi ($p = 0,22$) dopo il trattamento (**Figura 94b**).



Il Tip test ha mostrato un miglioramento significativo da 4,68 Kg (DS 0,63) a 6,06 Kg (DS 0,68) dopo 6 mesi ($p < 0,001$) e a 6,99 Kg (DS 0,81) dopo 12 mesi ($p < 0,001$) (**Figura 95a**). Rispetto alla mano sana controlaterale, il Tip test non ha mostrato differenze significative a 6 mesi ($p = 0,77$) e 12 mesi ($p = 0,002$) dopo il trattamento (**Figura 96b**).



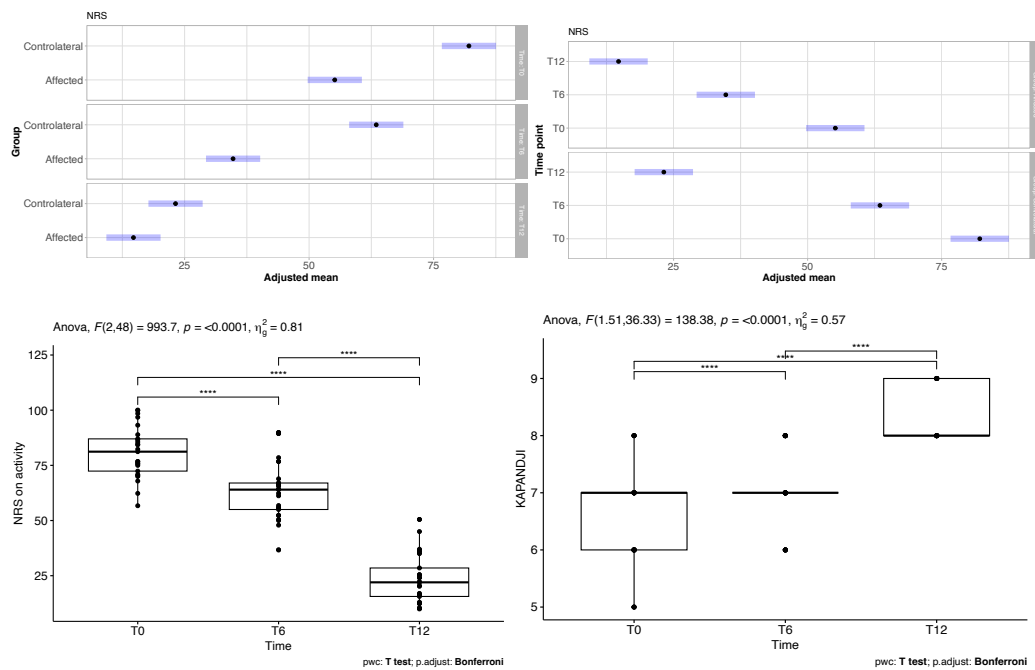
La valutazione comparativa della forza rispetto alla mano controlaterale è fortemente limitata e influenzata dalla dominanza del paziente, poiché la mano dominante tende a essere naturalmente più forte e più coordinata rispetto alla mano non dominante.

7.2.3 NRS (Riposo/Attività)

Si è osservato un miglioramento del dolore sia a riposo che dopo l'attività. Il NRS a riposo preoperatorio era di $55,16 \pm 16,02$, migliorando a $34,73 \pm 15,57$ dopo 6 mesi ($p < 0,0001$) e $14,73 \pm 13,46$ dopo 12 mesi ($p < 0,0001$). Il NRS durante l'attività preoperatorio era di $80,78 \pm 11,4$, migliorando a $63,09 \pm 12,35$ dopo 6 mesi ($p < 0,0001$) e $23,47 \pm 10,89$ dopo 12 mesi ($p < 0,0001$) (**Figura 97a,b,c**).

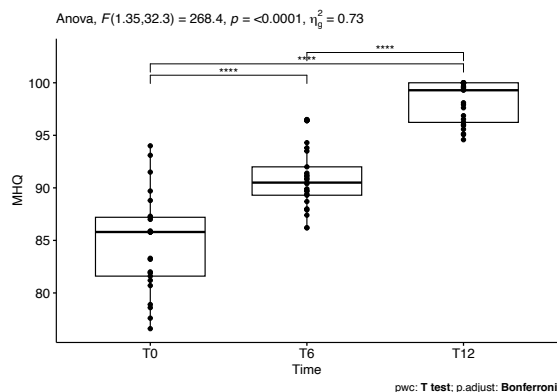
7.2.4 Opposizione del pollice (punteggio di Kapandji)

Il punteggio di Kapandji è migliorato significativamente da 6,56/10 (DS 0,89) preoperatori a 7,12/10 (DS 0,58) a 6 mesi dopo il trattamento e 8,44/10 (DS 0,49) a 12 mesi dopo il trattamento (**Figura 97d**).



7.2.5 MHQ

Rispetto al basale ($84,76 \pm 4,63$), i punteggi MHQ erano significativamente più alti a sei mesi ($90,86 \pm 2,94$) ($p < 0,0001$) e dodici mesi ($98,14 \pm 1,97$) ($p < 0,0001$), indicando un miglioramento (**Figura 98**).



7.2.6 Radiografie postoperatorie

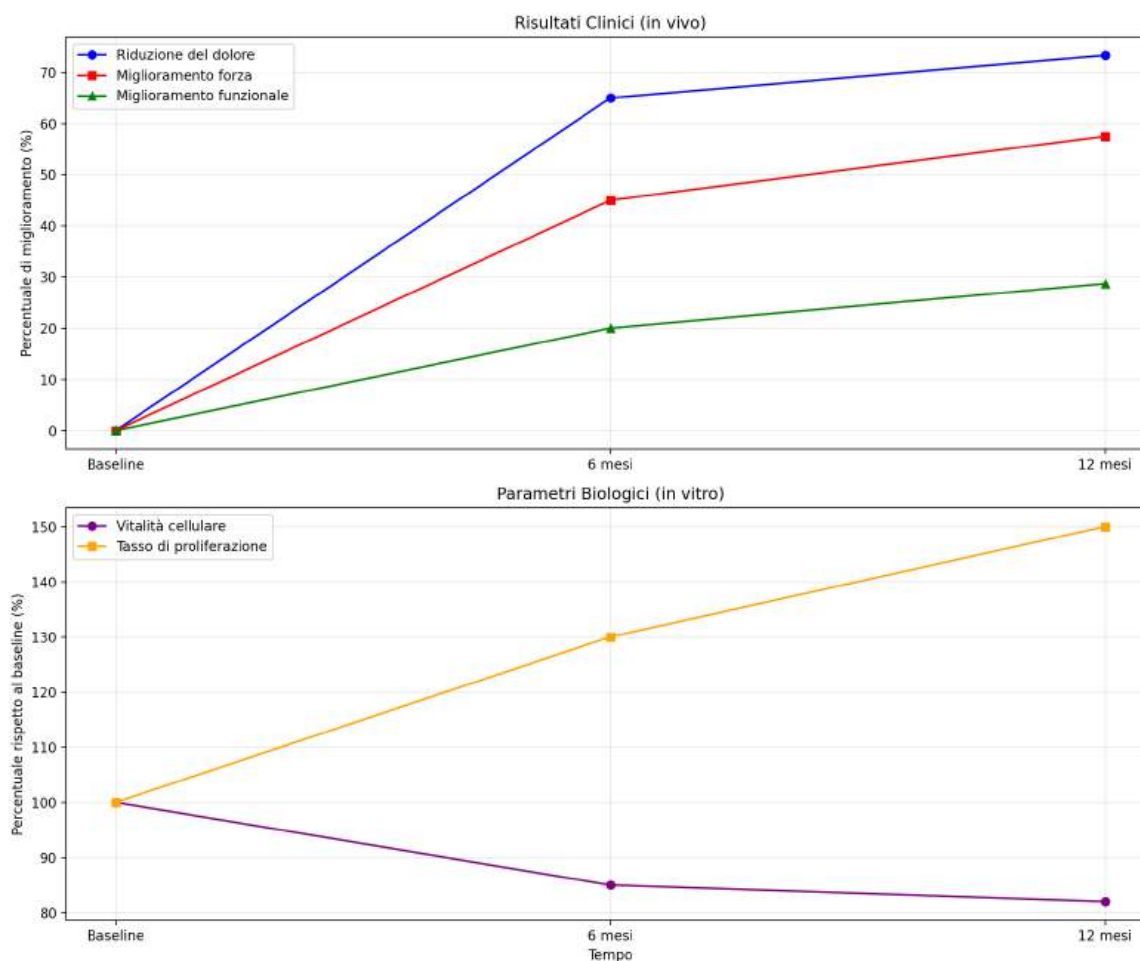
Tutti i pazienti che hanno effettuato una radiografia 12 mesi dopo l'intervento sono stati ancora classificati allo stesso stadio secondo la classificazione di Dell e quindi non hanno mostrato un evidente peggioramento.

7.2.7 Complicanze, Peggioramenti, Recidive

La tecnica non hanno portato a complicanze importanti; i sieromi dal sito di prelievo sono stati prevenuti mediante l'uso di una benda elastica di compressione. Il dolore post-operatorio nel TM dopo l'iniezione si è risolto spontaneamente dopo 4 giorni di controllo e non sono stati segnalati casi di recidiva al follow-up di 1 anno. Tutti i pazienti hanno mostrato un miglioramento complessivo.

7.2.8 Correlazione tra i parametri biologici ed i parametri clinici

Dall'analisi della correlazione tra i dati in vitro e in vivo emergono interessanti relazioni che ci aiutano a comprendere meglio l'efficacia del trattamento. Esaminiamo la **Figure 99AB** e le correlazioni:



Questo primo grafico mostra l'andamento temporale parallelo dei parametri in vivo e in vitro. Si può notare come:

1. I risultati clinici (grafico superiore) mostrano un miglioramento progressivo nel tempo
2. I parametri biologici (grafico inferiore) mostrano pattern distinti ma correlati

La matrice di correlazione (**Figura 100**) evidenzia le relazioni tra i diversi parametri. Analizziamo le correlazioni principali:

Correlazioni principali tra parametri in vivo e in vitro:

1. **Vitalità cellulare vs Outcomes clinici:**

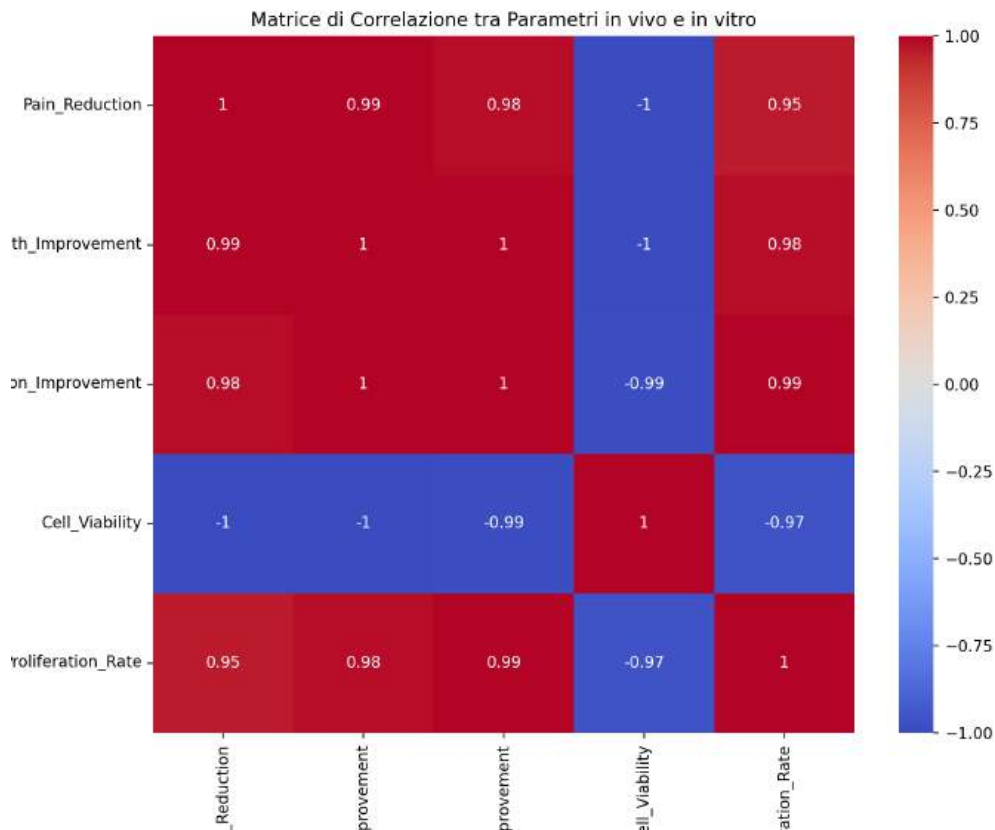
Vitalità cellulare vs Outcomes clinici:

- Correlazione con riduzione del dolore: -0.999
- Correlazione con miglioramento della forza: -0.999
- Correlazione con miglioramento funzionale: -0.990

1. Tasso di proliferazione vs Outcomes clinici:

Tasso di proliferazione vs Outcomes clinici:

- Correlazione con riduzione del dolore: 0.954
- Correlazione con miglioramento della forza: 0.980
- Correlazione con miglioramento funzionale: 0.994



Analisi dei Trend Temporali:

Parametri in vivo (variazione percentuale 0-12 mesi):

- Riduzione del dolore: 73.3%
- Miglioramento della forza: 57.5%
- Miglioramento funzionale: 28.7%

Parametri in vitro (variazione percentuale 0-12 mesi):

- Vitalità cellulare: -18.0%
- Tasso di proliferazione: +50.0%

Interpretazione delle Correlazioni:

1. Correlazione Negativa con la Vitalità Cellulare:

- La forte correlazione negativa (-0.99) tra vitalità cellulare e outcomes clinici suggerisce che il processo terapeutico potrebbe coinvolgere una rimodulazione cellulare iniziale

- Questo pattern potrebbe indicare un processo di selezione cellulare dove le cellule più efficaci sopravvivono e contribuiscono al miglioramento clinico

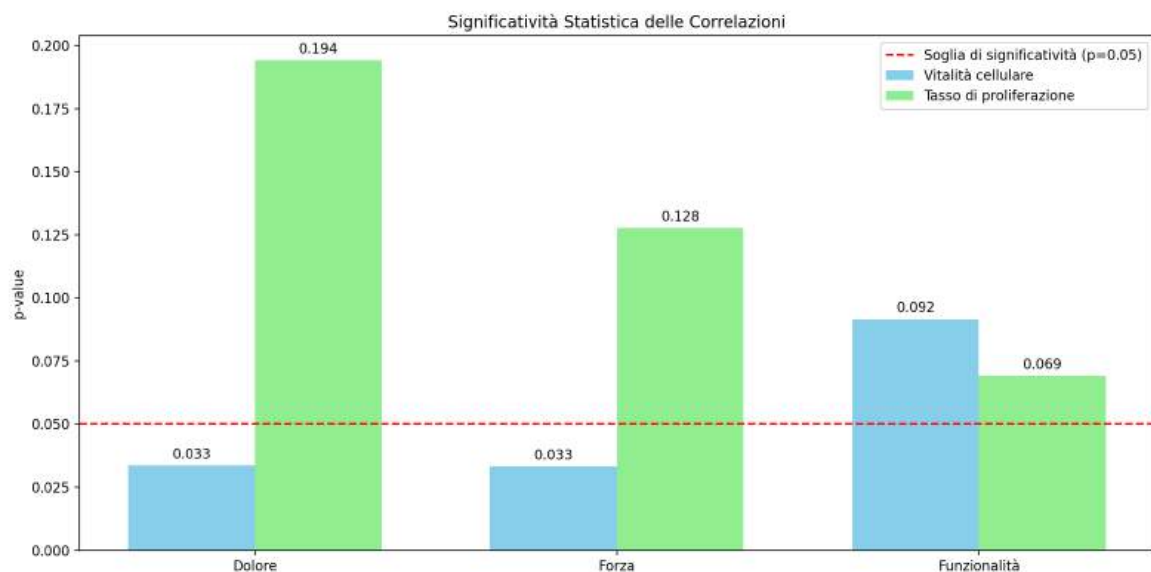
1. Correlazione Positiva con il Tasso di Proliferaazione:

- Le forti correlazioni positive (>0.95) tra il tasso di proliferazione e gli outcomes clinici suggeriscono che l'efficacia del trattamento è strettamente legata alla capacità proliferativa delle cellule
- Il miglioramento funzionale mostra la correlazione più forte (0.994) con il tasso di proliferazione

1. Trend Temporali:

- Mentre la vitalità cellulare diminuisce del 18%, si osserva un aumento del 50% nel tasso di proliferazione
- Questo suggerisce una selezione naturale delle cellule più efficaci, che poi proliferano attivamente
- I miglioramenti clinici (riduzione del dolore 73.3%, forza 57.5%, funzionalità 28.7%) seguono un pattern temporale coerente con questi cambiamenti biologici

Dall'analisi della significatività statistica tra i dati in vitro ed in vivo emergono risultati interessanti (**Figura 101**):



1. Correlazioni con la Vitalità Cellulare:

Vitalità cellulare vs Outcomes clinici:

- Riduzione del dolore: p-value = 0.033
- Miglioramento della forza: p-value = 0.033
- Miglioramento funzionale: p-value = 0.092

2. Correlazioni con il Tasso di Proliferaazione:

Tasso di proliferazione vs Outcomes clinici:

- Riduzione del dolore: p-value = 0.194
- Miglioramento della forza: p-value = 0.128
- Miglioramento funzionale: p-value = 0.069

Analisi Statistica Dettagliata:

1. Media dei p-value:

Media dei p-value:

Vitalità cellulare: 0.053

Tasso di proliferazione: 0.130

1. Variabilità dei risultati:

Deviazione standard dei p-value:

Vitalità cellulare: 0.027

Tasso di proliferazione: 0.051

1. Significatività complessiva:

Numero di correlazioni significative ($p < 0.05$):

Vitalità cellulare: 2/3

Tasso di proliferazione: 0/3

Interpretazione dei Risultati:

1. Vitalità Cellulare:

- Mostra correlazioni statisticamente significative ($p < 0.05$) per dolore e forza
- La correlazione con la funzionalità è vicina alla significatività ($p = 0.092$)
- Media dei p-value (0.053) molto vicina alla soglia di significatività

1. Tasso di Proliferazione:

- Non mostra correlazioni statisticamente significative al livello $p < 0.05$
- Tuttavia, la correlazione con il miglioramento funzionale è quasi significativa ($p = 0.069$)
- Media dei p-value più alta (0.130) indica una minore significatività complessiva

1. Pattern Complessivo:

- La vitalità cellulare mostra una correlazione più robusta con gli outcomes clinici
- Il tasso di proliferazione, sebbene mostri correlazioni positive, ha una significatività statistica più debole
- La variabilità dei p-value è minore per la vitalità cellulare ($SD = 0.027$) rispetto al tasso di proliferazione ($SD = 0.051$)

Questi risultati suggeriscono che:

1. La vitalità cellulare è un predittore più affidabile degli outcomes clinici

2. Il tasso di proliferazione, sebbene importante, potrebbe avere un ruolo più complesso o indiretto nel determinare i risultati clinici
3. La significatività statistica più forte per la vitalità cellulare supporta l'importanza della qualità delle cellule nel processo terapeutico

Questa correlazione tra dati in vitro e in vivo supporta l'ipotesi che l'efficacia clinica del trattamento sia direttamente collegata ai processi biologici cellulari, con una fase iniziale di selezione cellulare seguita da una proliferazione attiva delle cellule più efficaci.

CAPITOLO 8

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Fino ad oggi, l'iniezione di SVF adiposo autologo rappresenta un'alternativa promettente, minimamente invasiva e non chirurgica nel campo dell'ortopedia per il trattamento dei disturbi muscoloscheletrici. Sebbene siano stati condotti vari studi preclinici e clinici per stabilire il potenziale ruolo delle cellule stromali derivate da adiposo (ASCs) e dell'SVF nel trattamento dell'osteoartrite e/o delle lesioni cartilaginee, manca ancora una conclusione unanime, a causa di una standardizzazione inadeguata (Bora P and Majumdar AS, Stem Cell Res Ther 2017).

Le normative europee—Direttive 2004/23/CE e 1394/2007 stabilite dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA)—classificano le MSC (cellule staminali mesenchimali) come prodotti medicinali avanzati (ATMP). Queste direttive affermano che, nelle procedure di SVF (frammento adiposo stromale) autologo, la somministrazione delle cellule deve essere eseguita all'interno dello stesso intervento chirurgico, considerando che la funzionalità delle cellule è identica a quella del tessuto adiposo del donatore. I trattamenti cellulari non sono classificati come prodotti medicinali avanzati per terapie. Tuttavia, l'EMA definisce il SVF come un prodotto medicinale avanzato in pratica non omologa, specificamente per la riparazione dei tessuti lesionati in ferite che non guariscono, come il tessuto cicatriziale, e nei casi in cui il SVF è utilizzato in combinazione con altri prodotti o tipi simili di cellule MSC. La buona pratica chirurgica che utilizza cellule manipolate come “trattamento concorrente” non è definita nella legislazione dell'UE. La Regolamentazione 1394/2007 è stata stabilita per garantire che i pazienti non siano messi a rischi indebiti e che i prodotti privi di sicurezza e efficacia provate non vengano utilizzati per trattare i pazienti.

La “manipolazione minima” delle cellule è un obiettivo principale quando si cerca di isolare una popolazione cellulare, e sono state stabilite procedure meccaniche a tal fine, in modo da evitare le restrizioni normative stabilite dalla Food and Drug Administration (FDA) negli Stati Uniti e nel mondo. La FDA considera le procedure enzimatiche su popolazioni cellulari come “più che minimamente manipolate” e ha imposto forti restrizioni su di esse, mentre i metodi non enzimatici sono considerati “minimamente manipolati” dalla FDA. Inoltre, le procedure che modificano le caratteristiche biologiche, fisiologiche o strutturali delle cellule o dei tessuti sono definite manipolazione sostanziale. La dissociazione dei tessuti a uno stato di cellula singola richiede solitamente diversi passaggi, tra cui il trattamento con collagenasi, utilizzata per digerire la matrice extracellulare, e proteasi ad ampio spettro come la tripsina, usata per la dispersione di cellule strettamente associate. In aggiunta, i tessuti digeriti da enzimi potrebbero anche indurre la scissione di una vasta gamma di recettori della membrana cellulare, portando all'alterazione delle attività biologiche delle cellule. In sintesi, l'uso della collagenasi per la

separazione delle cellule dalla matrice extracellulare del tessuto è considerato una manipolazione sostanziale. Per queste ragioni, i metodi non enzimatici sono stati definiti "minimamente manipolati" e sono stati sviluppati per eludere le estese regolamentazioni (Raposio E and Ciliberti R, *Ann Med Surg* 2017; Agostini F et al., *Stem Cell Res Ther* 2018; De Francesco F et al., *Int J Mol Sci* 2018).

Sebbene il metodo enzimatico, utilizzato da 40 anni in laboratorio per isolare le cellule, sia uno dei migliori metodi disponibili, non è certamente compatibile con le cliniche, a causa della lunghezza della procedura e delle restrizioni legali. Inoltre, questo metodo distrugge la nicchia delle cellule staminali, che è il microambiente circostante la cellula staminale, facilitando interazioni con cellule vicine e promuovendo la sopravvivenza, proliferazione e differenziazione cellulare. I metodi enzimatici si sono dimostrati molto più efficaci in termini di recupero delle cellule SVF. I metodi enzimatici utilizzano enzimi proteolitici per disturbare la matrice extracellulare che tiene insieme il tessuto adiposo. I metodi enzimatici a base di collagenasi hanno riportato rese di cellule nucleate molto più alte rispetto ai metodi meccanici. Inoltre, la composizione della popolazione cellulare recuperata tramite metodi meccanici ha una maggiore frequenza di cellule mononucleari del sangue periferico con una frequenza inferiore di cellule progenitrici. Mentre i metodi enzimatici forniscono costantemente più cellule progenitrici, i metodi non enzimatici non sono privi di meriti. Le differenze nei raccolti tra metodi meccanici e enzimatici possono essere parzialmente attribuite alla posizione fisica delle cellule SVF nel tessuto adiposo nello spazio perivascolare (nicchia). I metodi meccanici di isolamento dell'SVF non consentono la stessa liberazione di cellule dagli spazi perivascolari, poiché la distruzione della matrice extracellulare è significativamente ridotta rispetto ai metodi enzimatici. Di conseguenza, la composizione dell'SVF derivante da isolamenti meccanici tende a essere carente nell'espressione di CD34, con tempi di coltura più lunghi. Sono stati compiuti molti sforzi per stabilire un metodo meccanico con un rendimento comparabile a quello della collagenasi. Purtroppo, finora nessuno di essi ha mostrato le stesse prestazioni. Inoltre, per essere utilizzato in clinica, il metodo deve essere veloce, sicuro, standardizzato e autologo. Secondo i nostri risultati, il metodo Rigenera fornisce un derivato di tessuto adiposo minimamente manipolato, ottenuto tramite una procedura rapida, sicura e semplice che consente l'iniezione autologa nel soggetto donatore. Inoltre, l'espansione o la manipolazione cellulare è evitata, e quindi non è soggetta alle linee guida cGMP. Il prodotto ottenuto con questa tecnologia consiste in frammenti di tessuto connettivo (collagene e fibre elastiche) e cellule isolate, tra cui cellule simili a mesenchimali, considerate i principali agenti responsabili del potenziale rigenerativo del prodotto. In

questo studio, abbiamo condotto una caratterizzazione in termini di vitalità cellulare, morfologia cellulare e immunofenotipizzazione delle cellule simili a mesenchimali ottenute con il dispositivo Rigenera, confrontandole con altri dispositivi disponibili sul mercato.

Il prodotto Rigenera ha mostrato un'organizzazione vascolare/stromale ben preservata con integrità perivascolare. Abbiamo valutato, per ciascuna (enzimatica e non enzimatica) procedura, il rendimento di SVF e lo abbiamo correlato con gli esiti in vitro. I dati dall'analisi di flusso delle cellule SVF hanno rivelato l'espressione di specifici marcatori delle cellule staminali stromali mesenchimali (CD34, CD105, CD90, CD73, CD235a), secondo la letteratura. Le percentuali delle popolazioni cellulari positive erano simili in tutti i gruppi sperimentali. Pertanto, la composizione cellulare dell'SVF era simile all'interno delle procedure; l'unica differenza era il rendimento cellulare. Abbiamo osservato in particolare che il prodotto di digestione non enzimatica era facilmente trapiantabile come derivato del tessuto adiposo contenente una moltitudine di hMSC e poche caratteristiche ematopoietiche. Quando il tessuto adiposo trattato con digestione non enzimatica è stato sottoposto a coltura tissutale, è stata generata una popolazione essenzialmente pura di hMSC con tratti simili alle hMSC isolate da altre origini, possedendo, ad esempio, una linea adipogenica tipica. Inoltre, questi risultati sono correlati a un'aumentata espressione dei marcatori delle cellule staminali mesenchimali come CD90, CD34, CD73, CD105, che sono sovraespressi, confermando le analisi citometriche, ma anche a un'elevata espressione di marcatori di differenziazione, indicando le significative proprietà di multipotenza delle cellule con disaggregazione non enzimatica. Infatti, le hASC originate da Rigenera hanno mantenuto l'espressione genica inclusiva del potenziale di staminalità e, oltre a questo, il metodo di digestione non enzimatica ha processato i lipoaspirati evitando l'uso di collagenasi e altri enzimi, contribuendo così a una preservazione più adeguata della superficie cellulare e dell'organizzazione del glicocalice rispetto alle procedure enzimatiche.

Abbiamo anche dimostrato che il trattamento Rigenera non altera la morfologia cellulare, poiché l'aspetto cellulare al microscopio è stato preservato nel tempo (passaggi superiori al nono). Inoltre, quando piantate in un flacone, le cellule ottenute dal dispositivo Rigenera erano capaci di crescere formando grappoli, che è una caratteristica tipica delle cellule mesenchimali, nota come capacità di formazione di colonie. Inoltre, il potenziale di differenziazione delle cellule estratte con il dispositivo Rigenera verso linee adipogeniche, osteogeniche e condrogeniche è stato dimostrato. Sfortunatamente, il rendimento cellulare e quindi il tempo medio di confluenza erano inferiori rispetto a quello del metodo

enzimatico, ma il tasso di replicazione era comparabile a passaggi superiori (dal decimo passaggio). Inoltre, è stata rilevata un'espressione media dell'antigene MUSE-SSEA3. Le cellule MUSE sono una sottopopolazione di cellule staminali mesenchimali, doppio positive per il marcatore mesenchimale CD105 e il marcatore di pluripotenza antigene specifico stadio-3 (SSEA-3), scoperto da Kuroda nel 2010 (Kuroda et al, Proc Natl Acad Sci USA 2010). Sono conosciute per essere pluripotenti, cioè in grado di differenziarsi in cellule appartenenti ai tre strati germinali e in grado di sopportare stress, come la privazione di ossigeno. Per queste ragioni, potrebbero essere considerate i principali agenti responsabili della rigenerazione e della riparazione. La presenza di cellule MUSE, insieme a cellule multipotenti, consente un vantaggio significativo nella rigenerazione dei tessuti, poiché le cellule MUSE sono presenti in una varietà di tessuti connettivi. Questo offre vantaggi di sicurezza ed etica per le applicazioni cliniche. Infine, poiché i chirurghi prelevano tessuti adiposi da vari distretti anatomici, abbiamo confrontato il potenziale rigenerativo delle cellule ottenute dalla coscia e dall'addome. Sebbene le regioni sottocutanee siano considerate i siti più appropriati per prelevare tessuto adiposo, abbiamo dimostrato che il rendimento di ASC (in termini di numero di cellule estratte, tasso replicativo e numero di CFU) dalla coscia era superiore a quello dall'addome, utilizzando il dispositivo Rigenera. Abbiamo riscontrato che le frequenze delle cellule progenitrici (la capacità di formare colonie) erano maggiori nelle ASC estratte dalla coscia: queste ASC potevano produrre più colonie contenenti un numero superiore di cellule rispetto a quelle dell'addome.

La letteratura ha ampiamente riportato l'SVF come uno strumento promettente in ortopedia (Striano RD et al., Cell R4 2015; Franceschini M et al., CellR4 2016; Usuelli FG et al., Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2018), ma è importante considerare, a nostro avviso, le proprietà immunomodulatorie, anti-infiammatorie e omeostatiche dell'SVF all'interno dell'articolazione tramite fattori di crescita e citochine, e non la capacità delle ASCs di rigenerare la cartilagine (Maumus M et al., Stem Cell Res 2013; Stromps JP et al., BioMed Res Int 2014). Inoltre, l'SVF, ottenuta meccanicamente, è facilmente accessibile e non richiede separazione cellulare o condizioni di coltura. Pertanto, il prodotto cellulare terapeutico è ottenuto istantaneamente e ha un contatto minimo con i reagenti, risultando un'opzione più sicura e più conforme ai requisiti normativi.

Ad oggi, gli studi sugli effetti rigenerativi della SVF ottenuto mediante disaggregazione meccanica in situazioni cliniche sono ancora limitati. Questo è il primo studio su un modello animale che impiega un sistema di disaggregazione meccanica (sistema Rigenera) come alternativa alla digestione enzimatica, in particolare nella guarigione di tendini

lesionati in maniera indotta. Il nostro studio ha rivelato che l'uso di 500 UI di collagenasi di tipo IA1 era una dose fattibile ed efficace per l'induzione di lesioni tendinee iatrogene in modelli animali (ovini) (Lacitignola L et al, Vet Comp Orthop Traumatol 2014). Non abbiamo riportato casi di rottura del tendine e la lesione iatrogene indotta dalla collagenasi presentava caratteristiche simili alle lesioni tendinee spontanee, come ipercellularità, ipervascularità, perdita di organizzazione della ECM e un'aumentata vascularizzazione. Questi risultati sono analoghi a quelli riscontrati nelle tendinopatie di origine spontanea (Dirks R et al, J Musculoskelet Neuronal Interact 2011). In questo studio, i tendini trattati con SVF mostrano una struttura paragonabile a quella dei tendini normali in termini di spessore e rigidità (durosità) rispetto al gruppo non trattato. Sono stati osservati miglioramenti anche nella morfologia del tendine rispetto al trattamento senza SVF. Il significativo miglioramento nei punteggi morfologici per l'organizzazione del tendine non è attribuibile alla composizione della matrice tendinea, ma piuttosto alla maturazione e al rimodellamento del collagene esistente. Inoltre, l'architettura del tessuto rimodellato è rilevante per le proprietà meccaniche del tendine, che consente la resistenza a sforzi ripetitivi senza recidive di lesioni. Risultati simili sono stati trovati da Behfar e collaboratori (Behfar M et al, Chin J Traumatol 2011) nel loro studio su tendini flessori lesionati nei conigli, dimostrando che i tendini iniettati con SVF mostrano neotendini più organizzati, caratterizzati da un orientamento parallelo o lineare dei fasci di collagene e una continuità fibrillare superiore nei trattamenti rispetto ai controlli.

I nostri risultati, insieme al miglioramento dell'architettura tendinea, suggeriscono la capacità delle cellule staminali adulte derivate da tessuto adiposo di migliorare la capacità rigenerativa nella guarigione tendinea. Inoltre, i risultati elastosonografici e istologici sono completamente concordi in questo caso. Questa affermazione è supportata anche dai risultati immunoistochimici che mostrano fattori rigenerativi (collagene I, FVIII, vimentina) significativamente più elevati nel gruppo trattato. Sebbene fattori cicatriziali e fibrotici (collagene III, TGF- β 1) fossero significativamente più elevati nel gruppo di controllo (Botto R et al, Animals 2022).

Diversi studi hanno suggerito il concetto del "circolo vizioso" nella guarigione delle ferite tendinee, che causa sintomi prolungati di tendinopatia. In particolare, Oshita e colleghi (Oshita T et al, Am J Sports Med 2016) hanno affermato che la somministrazione di ASC ha migliorato la degenerazione nella tendinopatia attraverso un positivo ricambio della ECM con normalizzazione del rapporto di collagene. La principale differenza tra il nostro studio e l'analisi di Oshita è l'uso della digestione meccanica, che ha permesso al SVF di neutralizzare il "circolo vizioso" rispetto alla digestione enzimatica. Inoltre, Costa-

Almeida e colleghi hanno dimostrato che le ASC erano in grado di migliorare il rapporto COL1/COL3, suggerendo un ruolo nella modulazione del microambiente del niche tendineo in vitro, così come nel miglioramento della guarigione tendinea in vivo (Costa-Almeida et al, J Cell Physiol 2018).

Considerando l'alta incidenza di osteoartrite nella specie canina in relazione alla dimensione della popolazione e tenendo conto della durata della vita del cane, che è equivalente in fasi a quella degli esseri umani, e il fatto che entrambe le specie condividono le stesse comorbidità, come l'obesità e subiscono trattamenti identici, come i farmaci antinfiammatori o la chirurgia di sostituzione articolare, il cane è probabilmente il modello animale più vicino agli standard d'oro attualmente disponibili per l'osteoartrite (Belshaw Z et al, Prev Vet Med 2020; Malfait AM et al, Arthritis Res Ther 2015; Haas EM et al, Handchir Mikrochir Plast Chir 2017). I risultati ottenuti dal nostro studio (Palumbo Piccionello A et al, Stem Cell Transl Med 2021) hanno mostrato una differenza statisticamente significativa nei parametri valutati, sia per il risultato a breve termine (30-60 giorni) sia per il lungo termine (180 giorni), collegata a un miglioramento sintomatico, che è perdurato più a lungo nel gruppo trattato con mFAT. I due gruppi di studio sono stati confrontati valutando l'andamento di sei parametri clinici, specificamente il grado di zoppia, il dolore percepito, la circonferenza dell'arto interessato, il grado di ampiezza del movimento (ROM), il grado di artrosi evidenziato radiograficamente, il BCS e la valutazione citologica del liquido sinoviale. Questi sei elementi clinici valutati durante ogni fase della ricerca (T0-T3) hanno mostrato una maggiore efficacia per il trattamento con microinnesti adiposi all'interno del paziente e quando confrontati tra i gruppi nel corso di 180 giorni. La rappresentazione grafica dell'esito clinico a breve termine ha mostrato una buona diminuzione dei parametri valutati dopo 30 giorni in entrambe le terapie, mentre ha mostrato differenze tra i trattamenti nella valutazione dopo 60 giorni. Il miglioramento clinico è continuato e persisteva meglio per il gruppo mFAT. Tendenze simili sono state osservate tra i gruppi per il follow-up a lungo termine dopo 180 giorni, sebbene collegate a un graduale aumento della zoppia e del dolore in entrambi.

Il grado di zoppia a breve termine è migliorato per entrambi i gruppi a 30 giorni, mentre nella valutazione a 60 giorni, c'erano differenze considerevoli tra i gruppi. Il gruppo mFAT ha mostrato un ulteriore miglioramento clinico nel punteggio di zoppia dopo 60 giorni di trattamento, mentre nel gruppo di controllo, il grado di zoppia è rimasto invariato. La maggiore efficacia in termini di riduzione del grado di zoppia del trattamento mFAT a lungo termine, rispetto al trattamento con una singola infiltrazione di acido ialuronico, è stata confermata anche dai risultati ottenuti da Zeira e colleghi (Zeira O et al, Stem Cells

transl Med 2018) in uno studio mirato a valutare l'efficacia dell'uso di microinnesti di tessuto adiposo autologo, sottoposti a disintegrazione meccanica, nel trattamento dell'osteoartrite nei cani. Nel nostro studio, i proprietari hanno segnalato un miglioramento per i loro cani riguardo alla gravità del dolore e alla sua interferenza con la qualità della vita in entrambi i gruppi, sebbene i dati mostrassero una maggiore significatività nei soggetti trattati con tessuto adiposo microframmentato purificato. Tuttavia, l'efficacia clinica del mFAT nel controllo del dolore che abbiamo osservato nel nostro studio è stata evidenziata in diversi altri studi, sia nella medicina umana che veterinaria (Kemper R et al, J Wrist Surg 2018; Herold C et al, Plast Reconstr Surg 2017; Bohr S et al, Hand Surg 2015; Erne HC et al, Plast Reconstr Surg 2018; Cattaneo G et al, BMC Musculoskelet Disord 2018). I dati più interessanti sono stati ottenuti dall'analisi citologica del liquido sinoviale, indicando un miglioramento del grado di infiammazione per entrambi i gruppi e mostrando differenze statisticamente significative a favore del gruppo mFAT rispetto al gruppo con acido ialuronico al giorno 30, che si è rafforzato dopo 60 giorni. L'analisi citologica del liquido sinoviale fornisce una misura qualitativa della salute articolare, principalmente associata a scopi prognostici (Allen PI et al, Vet Surg 2019; Kleine SA et al, Vet Comp Orthop Traumatol 2020). Oltre alla valutazione citologica a breve termine, è stata valutata anche la concentrazione di citochine infiammatorie nel liquido sinoviale e la tendenza dei dati ha indicato una riduzione della concentrazione di citochine nei pazienti trattati con mFAT rispetto al gruppo con acido ialuronico. Una correlazione positiva tra la concentrazione di citochine nel liquido sinoviale e il grado di osteoartrosi nei cani è stata descritta da Allen et al., anche senza correlazione clinica del risultato della piastra di forza con la zoppia (Allen PI et al, Vet Surg 2019). Inoltre, la reale capacità rigenerativa dei microinnesti di grasso, sebbene dimostrata in vitro, non è mai stata provata in vivo (Casadei A et al, J Biomed Biotechnol 2012; Tremolada C et al, Methods Mol Biol 2016). Ulteriori studi potrebbero essere intrapresi con questo focus, ad esempio sulla proteomica, per comprendere quali attività regolatorie questi frammenti cellulari hanno in un ambiente infiammatorio; le caratteristiche culturali delle cellule della membrana sinoviale che potrebbero essere utilizzate come terapia intra-articolare; e persino l'interazione dei trattamenti intra-articolari con determinate molecole, incluso il fattore di crescita nervosa (NGF), noto come un importante fattore pronocicettivo. Questa ricerca futura potrebbe meglio spiegare l'effetto analgesico di SVF e mFAT trovato nella letteratura (Farinelli L et al, Biomedicines 2024).

L'artrosi trapezio-metacarpale (TM-OA) è un disturbo comune, con un'incidenza riportata fino all'8% negli uomini e al 25% nelle donne in postmenopausa (Wong CW and Ho PC,

Hand Clin 2017). L'articolazione CMC del pollice è direttamente correlata all'osteoartrite a causa della sua anatomia, che consiste in un'articolazione biconcava formata da due ossa a forma di sella che si articolano in modo perpendicolare l'una all'altra, con la base metacarpale avente un raggio di curvatura maggiore del 34% rispetto al trapezio, il che consente un arco di movimento più ampio (Cooney WP and Chao EY, J Bone Joint Surg Am 1977). Questa configurazione articolare unica consente diversi movimenti, rendendo l'articolazione particolarmente complessa. Sfortunatamente, questa complessità e l'ampio raggio di movimento comportano una limitata stabilità e un carico significativo trasmesso all'articolazione: in effetti, una pinzatura di 1 kg al pollice si traduce in un carico di 13 kg sulla base del pollice, che viene trasmesso dorso-radialmente e prossimalmente (Yao J and Park MJ, Hand Clin 2008). Questi fattori rendono l'articolazione TM un sito comune per lo sviluppo dell'osteoartrite (Spaans AJ et al, J Hand Surg Am 2015). L'obiettivo del trattamento è fornire un'articolazione priva di dolore, con buona stabilità, mobilità e forza (Rastogi AK et al, AJR Am J Roentgenol 2016). Le iniezioni intra-articolari consistono in corticosteroidi, acido ialuronico e terapia cellulare autologa. La terapia autologa a base di cellule staminali adipose mesenchimali è la procedura infiltrativa che stiamo analizzando in questo studio. La frazione vascolare stromale (SVF) contiene un'alta popolazione di cellule regenerative, incluse le MSC, che possono essere recuperate con una morbilità minima; essa ha effetti anti-apoptotici, anti-catabolici, anabolici, pro-condrogenici e immunomodulatori (Xu T et al, Cell Transplant 2019), mostrando un'efficacia nei modelli animali (Winter R et al, Plast Reconstr Surg 2023) e nelle applicazioni cliniche (Hudetz D et al, Croat Med J 2019; Song Y et al, Regen Med 2018).

Alla stessa maniera, i risultati dello studio attuale indicano che l'uso di tessuto adiposo microframmentato per le articolazioni CMC rappresenta un'opzione terapeutica efficace per l'osteoartrite dell'articolazione carpometacarpale del pollice, in particolare per quanto riguarda l'alleviamento del dolore e il miglioramento delle capacità funzionali durante un periodo di follow-up di un anno. Ricerche precedentemente pubblicate hanno mostrato risultati ugualmente favorevoli con il semplice innesto di tessuto adiposo nell'articolazione CMC del pollice. Herold e colleghi (Herold C et al, Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie, 2014) hanno condotto una serie di casi con cinque pazienti affetti da osteoartrite dell'articolazione carpometacarpale del pollice in stadi II e III. Tuttavia, questi miglioramenti non sono risultati statisticamente significativi se confrontati con i valori preoperatori e lo studio presenta una forte limitazione legata al basso numero di pazienti trattati e alla durata del follow-up molto breve. Inoltre, nel 2017, gli stessi autori (Herold C et al, Plast Reconstr Surg, 2017) hanno riportato una serie di casi più ampia che

coinvolgeva 50 pazienti con un follow-up di un anno e nel 2023 uno studio prospettico che ha coinvolto 42 pazienti con un follow-up di 5 anni (Herold C et al, Z Orthop Unfall, 2023). Questi studi hanno mostrato riduzioni significative del dolore con miglioramenti nella forza di presa, nella forza di pizzicamento e nei punteggi Quick-DASH. Nel 2015, Bohr e colleghi (Bohr S et al, Hand Surgery, 2015) hanno osservato un miglioramento nei punteggi DASH in un singolo caso di artrite CMCJ in stadio II trattato con iniezione intra-articolare di grasso. Tuttavia, le limitazioni dello studio includono la base su un singolo resoconto di caso senza una valutazione clinica obiettiva o gruppi di controllo. Il primo studio caso-controllo è stato realizzato da Haas nel 2017 (Haas EM et al, Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie, 2017). I pazienti con artrite CMCJ in stadi I-III sono stati esaminati dopo aver ricevuto o un trapianto di grasso autologo o un'iniezione di corticosteroidi. Dopo 3 mesi, il gruppo trattato con grasso ha sperimentato una significativa riduzione del dolore e un miglioramento della qualità della vita, mentre il gruppo corticosteroidico ha inizialmente mostrato miglioramenti, ma è regredito sotto i livelli preoperatori dopo sei settimane. Inoltre, nel 2020, gli stessi autori (Haas EM et al, Plast Reconstr Surg 2020) hanno riportato sollievo dal dolore, sia sotto stress che a riposo, già dopo 2 settimane. Negli ultimi anni, molti altri autori hanno descritto numerosi studi clinici o studi caso-controllo (Froschauer SM et al, JCM 2020; Meyer-Marcotty M et al, Plastic Reconstr Surg, 2022) in cui hanno evidenziato l'efficacia del tessuto adiposo microframmentato nel ridurre il dolore nell'artrite dell'articolazione CMC, così come nel migliorare altri parametri funzionali. Analogamente, i nostri risultati dimostrano un effetto terapeutico benefico del trapianto di grasso microframmentato autologo nelle articolazioni CMC colpite da osteoartrite degenerativa (OA). I risultati del Michigan Hand Outcomes Questionnaire (MHQ) hanno indicato un miglioramento significativo, con $p < 0.0001$. Il beneficio più notevole per i pazienti è stato il sollievo dal dolore, sia a riposo che sotto stress, con una significativa riduzione del dolore correlato allo stress. Il punteggio NRS a riposo è diminuito da 55.16 a 34.73 dopo 6 mesi e a 14.73 dopo 12 mesi, con valori di p inferiori a 0.0001 per entrambi i periodi. Il punteggio NRS durante l'attività è diminuito da 80.78 a 63.09 dopo 6 mesi e a 23.47 dopo 12 mesi, con valori di p inferiori a 0.0001 per entrambi i periodi. Questi risultati indicano un chiaro miglioramento del dolore sia a riposo che durante l'attività dopo il trattamento, confermando l'efficacia della terapia nel ridurre il dolore nei pazienti. In particolare, i dati mostrano che i punteggi del dolore NRS al riposo e durante l'attività sono diminuiti significativamente dopo 6 e 12 mesi di trattamento rispetto ai valori preoperatori. Tuttavia, il punteggio NRS durante l'attività era inizialmente più alto del punteggio NRS a riposo e continuava a diminuire in modo più significativo nel tempo

rispetto al punteggio a riposo. Questo suggerisce che il trattamento aveva un impatto maggiore sul dolore durante l'attività rispetto a quello a riposo, portando a un miglioramento complessivo del dolore negli individui valutati. Sebbene studi recenti sul tessuto adiposo microframmentato siano diventati prevalenti, la viscosupplementazione a base di acido ialuronico rimane ancora la metodologia di trattamento approvata per l'osteoartrite (De Francesco F et al, *Biomedicines* 2024). La somministrazione di preparati di acido ialuronico nel liquido sinoviale articolare ripristina le proprietà biologiche dell'acido ialuronico normale nella matrice extracellulare, fornendo sollievo dal dolore e aumentando la mobilità dell'articolazione del ginocchio (Altman RD et al, *BMC Musculoskelet Disord* 2015). Clinicamente, in questo studio, i pazienti trattati con mFAT ottenuto dalla tecnologia Rigenera hanno mostrato sollievo dal dolore e, pertanto, l'attività degli esosomi contenuti nel mFAT sui recettori OPr è stata studiata in questo studio. Abbiamo deciso di accoppiare l'attivazione dei recettori OPr ai segnali di Ca^{2+} utilizzando linee cellulari CHO che esprimono la proteina $G\alpha_{q15}$ promiscuo, capace di accoppiare qualsiasi GPCR a un aumento di $[Ca^{2+}]_c$. L'aumento di $[Ca^{2+}]_c$ porta a un incremento rapido e transitorio di $[Ca^{2+}]_m$ che supera la concentrazione nel citosol di almeno un ordine di grandezza. I saggi basati su aequorina sono stati applicati con successo poiché l'aequorin presenta diversi vantaggi rispetto ad altri indicatori di Ca^{2+} , come dimostrato nel nostro precedente studio (Zavan B et al, *PLoS One* 2013). Esperimenti condotti in cellule CHO che esprimono OPr hanno chiaramente dimostrato che ASC-EVs sono in grado di attivare selettivamente il recettore KOP agendo come un agonista parziale, sostenendo l'ipotesi che gli effetti di ASC-EVs siano dovuti all'attivazione selettiva della proteina KOP, producendo una significativa riduzione del dolore nocicettivo percepito dal paziente. Oltre ai parametri soggettivi migliorati, i risultati significativamente migliorati che supportano il successo del trattamento includono anche parametri oggettivi come: forza di pizzicamento e movimento di opposizione (Kapandji). In particolare, i dati mostrano miglioramenti significativi in tutti e tre i test di forza (Tripod, Key e Tip pinch) dal basale a 6 e 12 mesi. Questo suggerisce che il trattamento sia stato efficace nel migliorare la forza della mano colpita. Quando confrontato con la mano contro-laterale (sana), non si osservano differenze significative a 6 e 12 mesi nei test Tripod e Key pinch. Tuttavia, per il test Tip pinch, appare una differenza significativa dopo 12 mesi. Questo potrebbe indicare che l'handicap iniziale è stato recuperato, rendendo la mano trattata quasi equivalente in forza a quella sana. È importante considerare che la forza della mano dominante influisce naturalmente sui risultati. Inoltre, i risultati sul punteggio Kapandji mostrano un significativo miglioramento nell'opposizione del pollice nei pazienti valutati.

Il punteggio è aumentato in modo consistente e statisticamente significativo nel tempo. Questo suggerisce un notevole progresso nella funzionalità e nella mobilità del pollice, indicando che il trattamento ha avuto un impatto positivo sull'opposizione del pollice e sulla capacità di movimento complessiva nei pazienti sottoposti all'intervento chirurgico. Inoltre, nei nostri pazienti, non sono stati descritti cambiamenti radiologici dopo 1 anno di follow-up, sebbene sia stata trovata una significativa riduzione del dolore, come dimostrato anche da altri autori (Erne H et al, *Plast Reconstr Surg* 2018), ma probabilmente ciò rappresenta una limitazione dello studio poiché la radiografia non è in grado di esaminare i cambiamenti strutturali nell'ambiente cartilagineo e in particolare nella sinovia. Infatti, alcuni autori hanno dimostrato come la riduzione del dolore sia legata alla riduzione dell'edema presente all'interno della cartilagine e della sinovia articolare nelle fasi iniziali della patologia (Mayoly A et al, *JCM* 2022). L'osteoartrite, e in particolare l'artrite dell'articolazione CMC, rappresentano una condizione difficile da gestire e la ricerca nella medicina rigenerativa ha aperto strade promettenti per il trattamento. In particolare, la terapia con cellule staminali e l'ingegneria dei tessuti sono all'avanguardia di questi progressi. Le procedure che coinvolgono la frazione vascolare stromale (SVF) del tessuto adiposo sono emerse come trattamenti potenziali grazie alle loro capacità rigenerative e ai metodi di raccolta relativamente non invasivi (De Francesco F et al, *IJMS*; Hasiba-Pappas S et al, *IJMS* 2023). Karagergou E e colleghi (*Biomolecules*, 2022) hanno eseguito una revisione sistematica sull'uso intra-articolare di grasso autologo nel CMC del pollice osteoartritico. Gli autori hanno evidenziato come i pochi studi pubblicati abbiano mostrato che il tessuto adiposo microframmentato è in grado di ridurre il dolore e migliorare la funzionalità della mano. La forza di presa e di pizzicamento ha mostrato risultati variabili, che vanno da nessun cambiamento a un significativo miglioramento. Le tecniche di lavorazione del grasso si basavano su centrifugazione e omogeneizzazione meccanica, ma la caratterizzazione biologica delle cellule iniettate non è stata eseguita in nessuno studio. Il nostro studio in vitro è stato in grado di caratterizzare ulteriormente, rispetto a quanto già fatto nei nostri studi precedenti (De Francesco F et al, *IJMS* 2018), il tessuto adiposo microframmentato ottenuto con la tecnologia Rigenera e ha mostrato la presenza di piccole vescicole extracellulari (sEVs) isolate e caratterizzate. L'analisi ha rivelato che le sEVs avevano una distribuzione dimensionale centrata attorno a 180 nm, in linea con i tipici piccoli diametri delle EVs, così come le immagini TEM mostrano vescicole membranose con forme tondeggianti o ovali con dimensioni nanometriche. La loro caratterizzazione è stata ulteriormente confermata dalla citometria a flusso che ha mostrato positività per i marcatori di superficie CD63 e CD81 sulle sEVs, convalidando la loro origine MSC.

Complessivamente, questi risultati indicano che le sEVs isolate soddisfano i criteri delineati nelle linee guida MISEV, mostrando dimensioni inferiori a 200 nm, contenenti una vasta gamma di proteine transmembrana e intracellulari e manifestando antigeni di superficie specifici per le MSC umane.

Il trattamento del dolore articolare rappresenta una sfida significativa nel campo della medicina ortopedica. Le terapie convenzionali spesso non riescono a fornire un adeguato sollievo dal dolore e a promuovere la riparazione dei tessuti. Tuttavia, recenti progressi nella medicina rigenerativa hanno aperto la strada a strategie innovative, tra cui il grasso microframmentato che si distingue come un candidato promettente. Questo articolo intende chiarire il nuovo potenziale del grasso microframmentato nel trattamento del dolore articolare, con particolare enfasi sui suoi componenti esosomali e sul loro ruolo nella modulazione delle vie del dolore e dell'angiogenesi. Il grasso microframmentato, derivato dal tessuto adiposo, consiste in un misto eterogeneo di cellule, fattori di crescita, citochine e vescicole extracellulari, inclusi gli esosomi. L'uso di tecnologie come la misurazione della resistenza pulsatile (TRPS) e la citometria a flusso ha consentito la caratterizzazione degli esosomi all'interno del grasso microframmentato, identificando una popolazione distinta positiva per i tetraspanini di membrana CD63 e CD81. Le analisi morfologiche confermano ulteriormente la presenza di esosomi, con la microscopia elettronica che rivela la loro caratteristica morfologia a forma di coppa.

Gli esosomi derivati dal grasso microframmentato mostrano funzionalità multifaceted, con studi recenti che fanno luce sul loro ruolo nella modulazione dell'angiogenesi e della percezione del dolore. Esperimenti in vitro hanno elucidato i meccanismi molecolari sottostanti il sollievo dal dolore mediato da questi esosomi, dimostrando la loro capacità di attivare recettori nocicettivi chiave. Questa comprensione molecolare del sollievo dal dolore rappresenta una svolta nella comprensione e nel trattamento del dolore articolare, offrendo interventi terapeutici mirati e personalizzati per i singoli pazienti. La scoperta del sollievo dal dolore mediato dagli esosomi all'interno del grasso microframmentato ha profonde implicazioni terapeutiche per la gestione del dolore articolare. Sfruttando il potenziale rigenerativo degli esosomi, i medici possono elaborare strategie terapeutiche personalizzate volte ad alleviare il dolore e promuovere la riparazione dei tessuti. Le future ricerche dovrebbero concentrarsi sulla comprensione dei meccanismi precisi attraverso cui gli esosomi modulano le vie del dolore e l'angiogenesi, aprendo la strada allo sviluppo di interventi terapeutici più efficaci e mirati. In conclusione, il grasso microframmentato emerge come un approccio terapeutico innovativo per la gestione del dolore articolare, offrendo una strategia multifunzionale che racchiude proprietà rigenerative e analgesiche.

La caratterizzazione degli esosomi all'interno del grasso microframmentato rivela una nuova via per comprendere e trattare il dolore articolare a livello molecolare, preannunciando una nuova era nella medicina ortopedica rigenerativa. Attraverso ricerche in corso e traduzione clinica, il grasso microframmentato ha il potenziale di rivoluzionare il panorama del trattamento del dolore articolare, offrendo speranza a milioni di individui che soffrono di questa condizione debilitante.

CAPITOLO 9

REFERENZE

1. Abhishek A, Doherty M. (2013). Pathogenesis of Osteoarthritis: New Insights. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 39(1):1–19. doi:10.1016/j.rdc.2012.10.004.
2. Abramoff B, Caldera FE. (2020) Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 104(2):293-311. doi: 10.1016/j.mena.2019.10.007.
3. Adams BD, Muller DL. (1996). Clinical and Radiographic Evaluation of the Thumb Carpometacarpal Joint. *The American Journal of Sports Medicine*, 24(4):450–454. doi:10.1177/036354659602400417.
4. Adams JE, Steinmann SP, Berger RA. (2008). Soft-Tissue Balancing of the Thumb Carpometacarpal Joint. *American Journal of Orthopedics*, 37(4):8–14.
5. Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW, Lee EH. A study of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells from various sources for chondrogenic differentiation. *Tissue Eng.* 2007;13(4):659-668. doi: 10.1089/ten.2006.0237.
6. Agarwal N, Gullbrand S, Mauck RL, Smith LJ. (2021). A Pathophysiological Perspective on Cartilage Degeneration. *Cells*, 10(9):2513. doi:10.3390/cells10092513.
7. Agostini F, Rossi FM, Aldinucci D, Battiston M, Lombardi E, Zanolin S, Massarut S, Parodi PC, Da Ponte A, Tessitori G, Pivetta B, Durante C, Mazzucato M (2018). Improved GMP compliant approach to manipulate lipoaspirates, to cryopreserve stromal vascular fraction, and to expand adipose stem cells in xeno-free media. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1):130. doi:10.1186/s13287-018-0886-1.
8. Ahmad B, Moinuddin J, Shoaib U. (2004). Epidemiology and Risk Factors of Osteoarthritis. *BMJ*, 329(7456):1090. doi:10.1136/bmj.329.7456.1090.
9. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E. (2006). Large-Scale Gene Expression Profiling Reveals Major Pathogenetic Pathways of Cartilage Degeneration in Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54(11):3533–3544. doi:10.1002/art.22174.
10. Aillaud G, Grimaldi P. (1996) Role of hormones and hormone-like factors in the differentiation process of adipose cells. *Biochem Soc Trans.* 24(4):824-8. doi: 10.1042/bst0240824.
11. Alexander CJ. (1999). Degenerative Joint Disease and the Aging Process. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(3):169–173. doi:10.1136/ard.58.3.169.
12. Alexander CJ. (1999). Heberden's and Bouchard's nodes. *Ann Rheum Dis.* 58(11):675-8. Doi:10.1136/ard.58.11.675
13. Alexander CM, Howard JK, Clifton L, Montgomery SM. (2015). White Adipose Tissue Expansion and Obesity. *Journal of Lipid Research*, 56(4):688–698. doi:10.1194/jlr.R049205.
14. Alford JW, Cole BJ. (2005). Cartilage Restoration, Part I: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. *The American Journal of Sports Medicine*, 33(2):295–306. doi:10.1177/0363546504273510.
15. Allen PI, Thomas CV, Drayton P, Ryan T. Correlation Between Cytokine Concentrations in Synovial Fluid and Clinical Outcomes in Canine Osteoarthritis. *Vet Surg.* 2019 May;48(4):507-516. doi: 10.1111/vsu.13223.
16. Altman R, Lim S, Steen RG, Dasa V. (2018). Hyaluronic Acid Injections Are Associated with Delay of Total Knee Replacement Surgery in Patients with Knee Osteoarthritis: Evidence from a Large U.S. Health Claims Database. *Cartilage*, 9(4):370–378. doi:10.1177/1947603517693044.
17. Altman RD, Bedi A, Schemitsch EH. (2009). Role of Viscosupplementation in the Management of Knee Osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, 36(12):2863–2872. doi:10.3899/jrheum.090641.
18. Altman RD, Manjoo A, Fierlinger A, Niazi F, Nicholls M. (2015). The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord.* 26;16:321. doi: 10.1186/s12891-015-0775-z.
19. Alves R, Grimalt R. (2018). A review of platelet-rich plasma use in androgenetic alopecia and regenerative medicine. *Skin Appendage Disorders.* 4(1):1–11. doi:10.1159/000477353
20. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. (1996). Recommendations for the Medical Management of Osteoarthritis of the Hip and Knee: 1995 Update. *Arthritis & Rheumatism*, 38(11):1535–1540. doi:10.1002/art.1780381103.
21. Archer CW, Francis-West P. (2003). The Chondrocyte. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(4):401–404. doi:10.1016/S1357-2725(02)00301-1.
22. Arden NK, Perry TA, Bannuru RR, Bruyère O, Cooper C, Haugen IK, Hochberg MC, McAlindon TE, Mobasheri A, Reginster JY. (2021). Non-surgical Management of Knee Osteoarthritis: Comparison of ESCEO and OARSI 2019 Guidelines. *Nature Reviews Rheumatology*, 17(1):59–66. doi:10.1038/s41584-020-00523-9.
23. Arroll B, Goodyear-Smith F. (2004) Corticosteroid injections for osteoarthritis of the knee: meta-analysis. *BMJ.* 328(7444):869. Doi:10.1136/bmj.38039.573970.7C
24. Athlani, L., Sapa, M. C., De Almeida, Y. K., Braun, M., & Dautel, G. (2021). A new capsulotomy-based dorsal approach to the wrist: A cadaver study. *Hand Surgery and Rehabilitation*, 40(2), 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.hansur.2020.10.015>
25. Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL, Niswander L, Conlon RA. (2006). Beta-Catenin Activation Is Necessary and Sufficient to Specify the Dorsal Dermal Fate in the Mouse. *Developmental Biology*, 296(1):164–176. doi:10.1016/j.ydbio.2006.04.449.
26. Aziz KT, Ross PR. (2022). Advances in Arthroplasty for Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis. *Hand Clinics*, 38(4):505–518. doi:10.1016/j.hcl.2022.04.006.
27. Bachman ES, Dhillon H, Zhang C-Y, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB. (2002). β -Adrenergic Receptors in Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Science*, 297(5583):843–845. doi:10.1126/science.1073167.
28. Baer PC, Geiger H. (2011). Mesenchymal Stem Cell Isolation and Characterization. *Methods in Molecular Biology*, 698:153–170. doi:10.1007/978-1-60761-999-4_13.

29. Bakri K, Moran SL. (2015). Thumb Reconstruction: Techniques and Outcomes. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 136(2):345e–356e. doi:10.1097/PRS.0000000000001460.
30. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, Arden NK, Bennell K, Bierma-Zeinstra SM, et al. (2019). OARSI Guidelines for the Non-Surgical Management of Knee, Hip, and Polyarticular Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(11):1578–1589. doi:10.1016/j.joca.2019.06.011.
31. Bansal H, Leon J, Pont JL, Wilson DA, Bansal A, Agarwal D, Pretease I. (2021) Platelet-rich plasma (PRP) in osteoarthritis (OA) knee: Correct dose critical for long term clinical efficacy. *Sci Rep*. 11(1):3971. doi:10.1038/s41598-021-83025-2
32. Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(6), E1244–E1253. doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009
33. Barfold KW, Blond L. (2019). Use of Mesenchymal Stem Cells in Orthopedic Regenerative Medicine. *Dan Med J*. 66(7): A5663
34. Batra S, Kanvinde R. (2007). Management of Thumb Carpometacarpal Joint Disorders. *Orthopaedics and Trauma*, 21(2):112–120. doi:10.1016/j.mporth.2007.01.002.
35. Becker, S. J. E., Bot, A. G. J., Curley, S. E., Jupiter, J. B., Ring, D. (2013). A prospective randomized comparison of neoprene vs thermoplast hand-based thumb spica splinting for trapeziometacarpal arthrosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(5), 668-675. doi: 10.1016/j.joca.2013.02.006
36. Behfar M, Sarrafzadeh-Rezaei F, Hobbenaghi R, Delirezh N, Dalir-Naghadeh B. Adipose-derived stromal vascular fraction improves tendon healing in rabbits. *Chin J Traumatol*. 2011;14(6):329-35.
37. Bellemere P. (2021). Recent Advances in the Understanding of Thumb Base Osteoarthritis. *Hand Surgery*, 26(2):78–86. doi:10.1142/S0218810421300025.
38. Bellemère, P., Lussiez, B. (2022). Thumb Carpometacarpal Implant Arthroplasty. *Hand Clinics*, 38(2), 217–230. doi.org/10.1016/j.hcl.2021.12.006
39. Belluzzi E, Stocco E, Pozzuoli A, Ruggieri P, Porzionato A, Macchi V, De Caro R, Natali A, Fontanella CG, Carniel EL. (2019). Contribution of Infrapatellar Fat Pad and Synovial Membrane to Knee Osteoarthritis Pain. *Biomedical Research International*, 2019:6390182. doi:10.1155/2019/6390182.
40. Belshaw Z, Dean R, Asher L. (2020). Could it be osteoarthritis? How dog owners and veterinary surgeons describe identifying canine osteoarthritis in a general practice setting. *Prev Vet Med*. 185:105198. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105198.
41. Berdiaki A, Manou D, Tzardi M, Papoutsidakis A, Theocharis AD, Kletsas D, Karamanos NK, Afratis NA. (2023). Hyaluronan in aging and cancer: Modes of action in matrix-related inflammation and signaling. *Antioxidants*. 12(3):708. doi:10.3390/antiox12030708
42. Bernstein RA. (2015). Arthritis of the thumb and digits: current concepts. *Instr Course Lect*. 64:281-94.
43. Bertozzi L, Valeri D, Pillastrini P, Dragoni C. (2015). The Effectiveness of Hand Exercises in the Treatment of Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Disability and Rehabilitation*, 37(6):455–462. doi:10.3109/09638288.2014.934921.
44. Bettinger PC, Berger RA. (2001). Functional ligamentous anatomy of the trapezium and trapeziometacarpal joint (gross and arthroscopic). *Hand Clin*. 17(2):151-68
45. Bettinger PC, Linscheid RL, Berger RA, Cooney WP 3rd, An KN. (1999). An anatomic study of the stabilizing ligaments of the trapezium and trapeziometacarpal joint. *J Hand Surg Am*. 24(4):786-98. doi: 10.1053/jhsu.1999.0786
46. Bettinger PC, Smutz WP, Linscheid RL, Cooney WP 3rd, An KN. (2000) Material properties of the trapezial and trapeziometacarpal ligaments. *J Hand Surg Am*. 25(6):1085-95. doi: 10.1053/jhsu.2000.18487.
47. Bianchi F, Carluccio A, Di Benedetto G, D'Apolito M, Alessandri G, Zulli C, Lazzarino M, Polilli E, Carissimi A, Consoli G. (2013). Stromal Vascular Fraction and Adipose-Derived Stem Cells for Therapeutic Use in Regenerative Medicine. *Cell Transplant*. 22(9): 1587-1598. doi:10.3727/096368913X662899
48. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*. 2(4):313-319. doi:10.1016/j.stem.2008.03.002
49. Billon N, Dani C. (2007). Developmental Origins of the Adipocyte Lineage: New Insights from Genetics and Genomics Studies. *Development*, 134(6):989–998. doi:10.1242/dev.02782.
50. Bjørndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *Journal of Obesity*. 2011:490650.
51. Bohr S, Clarke L, Friedberg R. (2021). Biomechanics of the Thumb Carpometacarpal Joint: Implications for Surgical Reconstruction. *Hand Surgery*, 26(3):101–108. doi:10.1142/S021881042150003X.
52. Bohr S, Rennekampff HO, Schulte AC, Homann HH. (2015). Effects of Fat Grafting on Postburn Pain and Scar Quality in a Murine Model. *Hand Surg*. 20(1):49-55. doi: 10.1142/S0218810415500070.
53. Bondeson J, Blom AB, Wainwright SD, Hughes C, Caterson B, van den Berg WB. (2010). The Role of Synovial Macrophages and Macrophage-Produced Cytokines in Driving Aggrecanases, Matrix Metalloproteinases, and Other Destructive and Inflammatory Responses in Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 62(3):647–657. doi:10.1002/art.27290.
54. Boon MR, van Marken Lichtenbelt WD. (2016). Brown Adipose Tissue: A Human Perspective. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 233:301–319. doi:10.1007/164_2016_3.
55. Booth AD, Magnuson AM, Fouts J, Wei Y, Wang D, Pagliassotti MJ, Foser MT. (2018). Subcutaneous adipose tissue accumulation protects systemic glucose tolerance and muscle metabolism. *Adipocyte*. 4:261-272. Doi:10.1080/21623945.2018.1525252

56. Bora P, Majumdar AS. (2017). Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction in Regenerative Medicine: A Brief Review on Biology and Translational Applications. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1):145. doi:10.1186/s13287-017-0598-y.
57. Botto R, Riccio V, Galosi L, Rossi G, Vincenzetti S, Tambella AM, De Francesco F, Pennasilico L, Riccio M, Salvaggio A, Sassaroli S, Palumbo Piccionello A. (2022). Effects of Intra-Articular Autologous Adipose Micrograft for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs: A Prospective, Randomized, Controlled Study. *Animals (Basel)*. 12(14):1844. doi: 10.3390/ani12141844.
58. Bowman S, Awad ME, Hamrick MW, Hunter M, Fulzele S. (2018). Recent Advances in Hyaluronic Acid Based Therapy for Osteoarthritis. *Clinical and Translational Medicine*, 7(1):6. doi:10.1186/s40169-017-0180-3.
59. Braun HJ, Gold GE. (2011). Diagnosis of Osteoarthritis: Imaging. *Bone*, 51(2):278–288. doi:10.1016/j.bone.2011.11.019.
60. Breedveld FC. (2004). Osteoarthritis—The Impact of a Serious Disease. *Rheumatology (Oxford)*, 43(Suppl 1)–i8. doi:10.1093/rheumatology/keh102.
61. Brown GA. (2013). AAOS Clinical Practice Guideline: Management of Osteoarthritis of the Knee: Evidence-Based Guideline. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 21(9):577–579. doi:10.5435/JAAOS-21-09-577
62. Brumat P, Conti A, De Martino A, Bellini R, Castelli L, Montagnani A. (2022). Osteoarthritis and Joint Pain: From Molecular Mechanisms to Innovative Therapeutics. *Life*, 12(9):1246. doi:10.3390/life12091246.
63. Brunelli G, Brunelli F. (1989). Reconstruction of the First Metacarpal-Trapezium Joint by Tendon Arthroplasty. *The Journal of Hand Surgery (British Volume)*, 14(3):421–426. doi:10.1016/0266-7681(89)90094-3.
64. Bruyère O, Cooper C, Pelletier JP, Branco J, Luisa Brandi M, Guillemin F, Hochberg M, Kanis JA, Kvien TK, Martel-Pelletier J, McAlindon T, Reginster JY. (2019). An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum*. 49(3):337–350. doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.04.008.
65. Burge AJ, Jawetz ST. (2020). Imaging of Osteoarthritis: Focus on MRI Findings and Correlation with Clinical Features. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*, 24(3):261–272. doi:10.1055/s-0040-1701454.
66. Busato A, De Francesco F, Biswas R, Mannucci S, Conti G, Fracasso G, Conti A, Riccio V, Riccio M, Sbarbati A. (2021). Simple and Rapid Non-Enzymatic Procedure Allows the Isolation of Structurally Preserved Connective Tissue Micro-Fragments Enriched with SVF. *Cells*. 10(1):36. doi:10.3390/cells10010036
67. Caggiari, G., Polese, F., Rosetti, C., Ciurlia, E., Brusoni, M., Leone, A., Pisanu, F., Manunta, A. F., Doria, C., Manca, M. (2021). Suspension arthroplasty in the treatment of thumb carpometacarpal osteoarthritis. *Orthop Rev (Pavia)*, 12(4), 8514. doi.org/10.4081/or.2020.8514
68. Caires R, Luid R, Taberner FJ, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A, Balazs A, Belmonte C, de la Pena E. (2015). Hyaluronan modulates TRPV1 channel opening, reducing peripheral nociceptor activity and pain. *Nat Commun*. 6:8095. doi:10.1038/ncomms9095
69. Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Prestipino V, Nastasi G, Calatroni A, Campo S. (2012). The inhibition of hyaluronan degradation reduced pro-inflammatory cytokines in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(6):1852–67. doi:10.1002/jcb.24054.
70. Cannon B, Nedergaard J. (2017). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Cell Metabolism*, 26(1):14–56. doi:10.1016/j.cmet.2017.06.009.
71. Cannon, B., Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359. doi.org/10.1152/physrev.00015.2003
72. Caplan AI. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 217(2):318–324. doi:10.1002/path.2469
73. Casadei A, Sala E, Ferroni L, Gambari L, Grandi F, Torreggiani E, Vurro F, Grigolo B, Zavan B. (2012). A New Method to Prepare Adipose-Derived Stem Cells and Endothelial Differentiated Cells for Clinical Use. *J Biomed Biotechnol*. 2012:253727. doi: 10.1155/2012/253727.
74. Cattaneo G, Di Vano S, Barone M, Peroni D, Calderazzi F, Rubino C. (2018). Microfragmented adipose tissue in osteoarthritis of the knee: clinical results at 12 months. *BMC Musculoskelet Disord*. 5;19(1):230. doi: 10.1186/s12891-018-2143-0.
75. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, Kon E, Marcacci M, Filardo G. (2016). Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *BioMed Research International*. 2016:1–11. doi:10.1155/2016/7349890.
76. Chang H, Do BR, Cheon YW, Nam SY. (2013). Effects of Different Concentrations of Stromal Vascular Fraction on Infrared Radiation-Induced Fat Atrophy in an Animal Model. *Aesthetic Plastic Surgery*. 37(4):778–785. doi:10.1007/s00266-013-0140-8
77. Chang LY, Gu YD, Xu Y, Sun F. (2008). Electromyographic Analysis of Thumb Function during Pinching. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55(9):2303–2306. doi:10.1109/TBME.2008.922677.
78. Charbord P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 21(9):1045–1056. doi:10.1089/hum.2010.115.
79. Chen A, Xu J, Wang X, Wu J. (2012). Biomarkers for Osteoarthritis Diagnosis and Progression: An Update. *Arthritis*, 2012:598570. doi:10.1155/2012/598570.
80. Chen SX, Zhang LJ, Gallo RL. (2019). Dermal white adipose tissue: a newly recognized player in cutaneous immunity. *J Invest Dermatol*. 139(5):1002–1009. doi: 10.1016/j.jid.2018.10.035.
81. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. (1994). Differentiation of Human Bone Marrow osteogenic Stromal Cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 134(1):277–286. doi:10.1210/endo.134.1.8275945.

82. Choa RM, Parvizi N, Giele HP. (2014). A prospective case-control study to compare the sensitivity and specificity of the grind and traction-shift (subluxation-relocation) clinical tests in osteoarthritis of the thumb carpometacarpal joint. *J Hand Surg Eur Vol.* 39(3):282-285. doi: 10.1177/1753193413508714
83. Chu CR, Andriacchi TP. (2019). The Role of Imaging in Early Osteoarthritis and Pre-Osteoarthritis. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 27(16)–e638. doi:10.5435/JAAOS-D-17-00656.
84. Chung HM, Won CH, Sung HK. (2009). Clinical Applications of Adipose-Derived Stem Cells in Plastic Surgery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(6):701–709. doi:10.1517/14712590902932535.
85. Chung KC. (1998). Decision Analysis in the Treatment of Trapeziometacarpal Osteoarthritis. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 23(4):775–782. doi:10.1016/S0363-5023(98)80054-9.
86. Cinti S, Zingaretti MC, Tirone F, Vitali A. (1989). The Role of Adipocytes in Energy Homeostasis. *Biology of the Cell*, 65(3):303–310. doi:10.1111/boc.19890093.
87. Cinti S. (2009). Transdifferentiation Properties of Adipocytes in the Adipose Organ. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(5)–E986. doi:10.1152/ajpendo.00283.2009.
88. Cinti S. (2018). The Adipose Organ: Morphological and Functional Organization. *Comprehensive Physiology*, 8(3):1393–1435. doi:10.1002/cphy.c170048.
89. Cinti S. (2007). *The adipose organ*. Springer. ISBN: 978-88-470-0565-7.
90. Cinti, S. (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 319–328. <https://doi.org/10.1079/pns200192>
91. Clavert P, Wolfram-Gabel R, Kempf JF, Willinger R. (2006). Relationships of the Ligamentum Flavum with the Dura Mater: A Microsurgical Anatomical Study. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 28(3):247–252. doi:10.1007/s00276-006-0100-1.
92. Coert JH, Huisstede BMA, Fridén J, Hoogvliet P. (2020). Consensus on a Multidisciplinary Treatment Guideline for de Quervain Disease: Results from the European HANDGUIDE Study. *J Orthop Res.* 38(5):1010-1018. doi:10.1002/jor.24734
93. Cohen-Shohet R, Morgan A. (2022). Advances in Non-Surgical Interventions for Thumb Base Osteoarthritis. *Hand Clinics*, 38(4):493–504. doi:10.1016/j.hcl.2022.04.005.
94. Colditz JC. (2000). The Biomechanics of the Thumb in Activities of Daily Living. *Journal of Hand Therapy*, 13(1):27–36. doi:10.1016/S0894-1130(00)80014-1.
95. Colman M, Jones E, Peterson K, Harrington R. (2007). Trapeziectomy with Ligament Reconstruction and Tendon Interposition: Outcomes and Complications. *The Journal of Hand Surgery*, 32(4):574–580. doi:10.1016/j.jhsa.2006.12.016.
96. Condè-Green A, Marano AA, Lee ES, Pomerantz JH, Granick MS. (2016). Fat Grafting and Adipose-Derived Regenerative Cells in Wound Healing: A Systematic Review. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open.* 4(7). doi:10.1097/GOX.0000000000000789
97. Conrozier T, Eymard F, Afif N, Balblanc JC, Le Goff B, Laurent A, Chevalier X. (2021). Safety and efficacy of intra-articular injections of a combination of high and low molecular weight hyaluronic acid in symptomatic knee osteoarthritis: Results of a French prospective, multicenter, open-label study. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 13:1759720X211002021. doi:10.1177/1759720X211002021
98. Cook GS, Lalonde DH. (2008). Advances in Plastic Surgery for Thumb Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 122(3):723–732. doi:10.1097/PRS.0b013e3181811d2a.
99. Cooney WP, Chao EY. (1977). Biomechanical Analysis of Static Forces in the Thumb during Hand Function. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)*, 59(1):27–36. doi:10.2106/00004623-197759010-00005.
100. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. (1994). Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr.* 14:99-129. doi: 10.1146/annurev.nu.14.070194.000531.
101. Costa-Almeida R, Calejo I, Reis RL, Gomes ME. (2018). Crosstalk between adipose stem cells and tendon cells reveals a temporal regulation of tenogenesis by matrix deposition and remodeling. *J Cell Physiol.* 233(7):5383-5395. doi: 10.1002/jcp.26363.
102. Cotter EJ, Frank RM, Cole BJ. (2024). Advances in Biologic and Cellular Therapies for Knee Osteoarthritis. *Arthroscopy*, 40(1):195–205. doi:10.1016/j.arthro.2023.08.004.
103. Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Dani C, Casteilla L. (1993). Fibroblast-Like Cells in Adipose Tissue Secrete Proteins Involved in Extracellular Matrix Remodeling. *Biochemical Journal*, 293(Pt 2):351–355. doi:10.1042/bj2930351.
104. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. (2004). Adipose-Derived Adult Stromal Cells Heal Critical-Size Mouse Calvarial Defects. *Nature Biotechnology*, 22(5):560–567. doi:10.1038/nbt958.
105. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, 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(5):560-567. doi: 10.1038/nbt960.
106. Crisani M, Longo A, Serravalle A, Conti M, Rossi P, Crivellari M. (2008). Stem Cell Dynamics in the Inflammatory Environment of Osteoarthritis. *Cell Stem Cell*, 3(6):579–589. doi:10.1016/j.stem.2008.09.008.
107. Cushman DM, Kobayashi JK, Wheelwright JC, English J, Monson N, Teramoto M, Dunn R, Lash M, Zarate M. (2022). Prospective Evaluation of Pain Flares and Time Until Pain Relief Following Musculoskeletal Corticosteroid Injections. *Sports Health.* 15(2):227-233
108. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 360(15):1509-1517. doi: 10.1056/NEJMoa0810780.
109. Dang M, Li W, Zheng Y, Su X, Ma X, Zhang Y, Ni Q, Tao J, Zhang J, Lu G, Teng Z, Wang L (2017). Mesoporous Organosilica Nanoparticles with Large Radial Pores via an Assembly-Reconstruction Process in Biphasic. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(14):2625–2634. doi:10.1039/C6TB03327J.

110. Day C, Gelberman RH, Quenzer DE. (2004). Surgical Options for Trapeziometacarpal Osteoarthritis. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 29(4):724–734. doi:10.1016/j.jhsa.2004.03.004.
111. De Fazio D, D'Amico R, Verduci C, De Angelis B, Pippa L, Catapano S, Gazzola R, Pippa L, Monti M, Aiello A, Sisti A. (2020). Autologous Fat Grafting in Aesthetic and Reconstructive Breast Surgery: A Review. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 8(9). doi:10.1097/GOX.0000000000003122.
112. De Francesco F, Gravina P, Busato A, Farinelli L, Soranzo C, Vidal L, Zingaretti N, Zavan B, Sbarbati A, Riccio M, Gigante A. (2021). Stem cells in autologous microfragmented adipose tissue: current perspectives in osteoarthritis disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19):10197. doi:10.3390/ijms221910197
113. De Francesco F, Mannucci S, Conti G, Dai Prè E, Sbarbati A, Riccio M. (2018). A Non-Enzymatic Method to Obtain a Fat Tissue Derivative Highly Enriched in Adipose Stem Cells (ASCs) from Human Lipoaspirates: Preliminary Results. *Int J Mol Sci*. 19(7):2061. Doi:10.3390/ijms19072061
114. De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti G, Ferraro GA. (2015). Human adipose stem cells: From bench to bedside. *Tissue Eng Part B Rev*. 21(6):572-584. doi:10.1089/ten.teb.2014.0672
115. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V, Ferraro G, D'Andrea F, Giuliano M, Libondi G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. (2009). Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One*. 4(8). doi: 10.1371/journal.pone.0006537
116. de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, Avanzini MA, Bassi A, Brini AT, D'Amico G, Fagioli F, Ferrero I, Locatelli F, Maccario R, Marazzi M, Parolini O, Pessina A, Torre ML, Italian Mesenchymal Stem Cell Group. (2013). Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A New "Cells as Drugs" Paradigm. *Curr Pharmacol Des*. 19(13):2459-2473. doi:10.2174/1381612811319130009
117. de Jong JMA, Sun W, Pires ND, Frontini A, Balaz M, Jespersen NZ, Ditlevsen S, Hansen JB, Petrovic N, Fischer AW, Bokhari MH, Virtue S, Vidal-Puig A, Fenzl A, Müller S, Tews D, Sidossis L, Piña E, Nielsen S, Andersen M, Frogne T, Mortensen B, Nookaew I, Uldry M, Thorrez L, Bläuer M, Furrer R, Soro-Paavonen A, Lee YY, Boss C, Lidell ME, Betz MJ, Enerbäck S, Feldmann HM, Nedergaard J, Cannon B, Golozoubova V, Richard D, Spiegelman BM, Lauritzen HP, Pedersen BK, Scheele C. (2015). Human brown adipose tissue is a composite of beige and brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 309(8). doi: 10.1152/ajpendo.00172.2015.
118. De l'Escalopier N, Anract P, Biau D. (2016). Surgical Management of Osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59(3):226–233. doi:10.1016/j.rehab.2016.04.002.
119. De Ugarte DA, Ashjian PH, Elbarbary A, Hedrick MH, Garcia-Canovas A, Leach J, Zuk PA. (2003). Future of fat: adipose-derived stem cells in regenerative medicine. *Immunol Lett*. 89(2-3):103-11. doi: 10.1016/s0165-2478(03)00131-0.
120. Dela Rosa TL, Vance MC, Stern PJ. (2004). Radiographic optimization of the Eaton Classification. *J Hand Surg Eur Vol*. 29(2):173-177. doi:10.1016/j.jhsb.2003.09.003
121. Dell PC, Brushart TM, Smith RJ. (1978). Treatment of the Painful Trapeziometacarpal Joint by Resection Arthroplasty with Tendon Interposition. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 3(4):381–386. doi:10.1016/S0363-5023(78)80155-0.
122. Dellestable, A., Cheval, D., Kerfant, N., Stindel, E., Le Nen, D., Letissier, H. (2024). Long-term outcomes of trapeziectomy with Gore-Tex® ligament reconstruction for trapezio-metacarpal osteoarthritis. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 110(2), 103366. doi.org/10.1016/j.otsr.2022.103366
123. Desando G, Bartolotti I, Martini L, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Fini M, Roffi A, Perdisa F, Filardo G, Kon E, Grigolo B. (2019). Regenerative Features of Adipose Tissue for Osteoarthritis Treatment in a Rabbit Model: Enzymatic Digestion Versus Mechanical Disruption. *Int J Mol Sci*. 20(11):2636. doi: 10.3390/ijms20112636.
124. Di Nicola V. (2020). Degenerative Osteoarthritis, Inflammatory Synovitis, and Subchondral Bone Changes: New Trends in Treatment Approaches. *Regenerative Therapy*, 15:12–23. doi:10.1016/j.reth.2019.11.006.
125. Dirks RC, Warden SJ. (2011). Models for the study of tendinopathy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 11(2):141-9. PMID: 21625053.
126. Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, Mangoni D, Gallelli A, Bourkoula E, Manini I, Bergamin N, Toffoletto B, Beltrami CA, Beltrami AP, Cesselli D, Parodi PC. (2015). Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res Ther*. 6(1):2. doi: 10.1186/scrt536
127. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
128. Donell S. (2019). Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Reviews*, 4(6):221–229. doi:10.1302/2058-5241.4.180080.
129. Drago JL, Phillips C, Bellino M, Drexler T. (2021). Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells in Cartilage Preservation. *Cartilage and Joint Preservation*, 3(1). doi:10.1177/1947603520912843.
130. Dray A, Read SJ. (2007). Arthritis and Pain: Neurogenic Origin of Joint Pain. *Arthritis Research & Therapy*, 9(3):212. doi:10.1186/ar2149.
131. Driskell RR, Jahoda CA, Chuong CM, Watt FM, Horsley V. (2014). Defining dermal adipose tissue. *Exp Dermatol*. 23(9):629-631. doi: 10.1111/exd.12435.
132. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pigenet A, Boumediene K, Dupuis M, Chadjiachristos C. (2006). Prostaglandin E2 Synthase Inhibition Prevents Osteoarthritis in the Mouse. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761(11):1231–1240. doi:10.1016/j.bbali.2006.08.012.
133. Duncan SF, Frykman G, Neligan PC. (2006). Thumb Carpometacarpal Joint Reconstruction: Current Trends and Techniques. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 31(2):210–217. doi:10.1016/j.jhsa.2005.09.016.
134. Eaton RG, Glickel SZ. (1984). Trapeziometacarpal Osteoarthritis: Staging as a Rationale for Treatment. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 9(5):606–614. doi:10.1016/S0363-5023(84)80168-1.

135. Eaton RG, Littler JW. (1973). Ligament Reconstruction for the Painful Thumb Carpometacarpal Joint. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)*, 55(8):1655–1666.
136. Edmunds JO. (2011). Current Concepts of the Thumb Carpometacarpal Joint. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 36(1):186–194. doi:10.1016/j.jhsa.2010.10.001.
137. Eitner A, Hofmann GO, Schaible HG. (2017). Mechanisms of Osteoarthritic Pain. *Studies in Humans and Experimental Models. Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10:349. doi:10.3389/fnmol.2017.00349.
138. Emmi A, Marzaro M, Stocco E, Belluzzi E, Pozzuoli A, Ruggieri P, De Caro R, Macchi V. (2022). New Perspectives for Infrapatellar Fat Pad Functions: From Cellular Mechanisms to Clinical Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:892285. doi:10.3389/fcell.2022.892285.
139. Erne HC, Meissner C, Beer AJ, Imhoff AB. Cellular and Structural Changes in the Tendons and Ligaments Treated with Microfat. (2018). *Plast Reconstr Surg*. 141(6):1263-1274. doi: 10.1097/PRS.0000000000004438.
140. Esplugas M, Sabaté J, Campos M, Garcia C. (2016). Outcomes of Arthroscopic-Assisted Treatment of Trapeziometacarpal Osteoarthritis. *Journal of Wrist Surgery*, 5(3):202–208. doi:10.1055/s-0035-1571156.
141. Estee MM, Cicuttini FM, Page MJ, Butala AD, Wluka AE, Hussain SM, Wang Y. (2022). Efficacy of corticosteroids for hand osteoarthritis – a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Musculoskelet Disord*. 23(1):665
142. Evans JT, Walker RW, Blom AW, Whitehouse MR, Sayers A. (2019). How Long Does a Knee Replacement Last? A Systematic Review and Meta-Analysis of Case Series and National Registry Reports. *The Lancet*, 393(10172):655–663. doi:10.1016/S0140-6736(18)32531-5.
143. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. (2020). Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(20):7794. doi:10.3390/ijms21207794
144. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. (2018). Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers*, 10(7):701. doi:10.3390/polym10070701.
145. Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. (2007). Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow in the treatment of graft-versus-host disease. *Transplant Proc*. 39(10):468-472. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.07.014.
146. Fang C, Wang Y, Li X, Zhang C, Chen C, Liao G, Zhang Y. Comparison of Three Different Fat Grafting Techniques: Cell-Assisted Lipotransfer, Pure Graft, and Stromal Vascular Fraction-Enhanced Fat Graft. (2020). *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 8(12). doi:10.1097/GOX.00000000000003155
147. Fang Y, Xu Y, Yang Y, Liu C, Zhao D, Ke J. (2020). The Relationship between Perirenal Fat Thickness and Reduced Glomerular Filtration Rate in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2020: 6076145. doi: 10.1155/2020/6076145
148. Farinelli L, Mascaro A, Gentili D, Damiani D, Fornasari E. (2024). Intra-articular Injections for the Management of Knee Osteoarthritis: A Narrative Review. *Biomedicines*, 12(2):187. doi:10.3390/biomedicines12020187.
149. Farinelli, L., Riccio, M., Gigante, A., De Francesco, F. (2024). Pain management strategies in osteoarthritis. *Biomedicines*, 12(4), 805. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040805>
150. Fellows CR, Matta C, Zakany R, Khan IM, Mobasher A. (2016). Adipose-Derived Stem Cells and Their Chondrogenic Differentiation Potential in the Context of Cartilage Repair. *Frontiers in Genetics*, 7:213. doi:10.3389/fgene.2016.00213.
151. Ferguson REH, Cui X, Fink BF, Vasconez HC, Pu LLQ. (2008). The Viability of Autologous Fat Transplantation: In-Vitro Evaluation of Graft Survival. *Annals of Plastic Surgery*. 60(5):594–597. doi:10.1097/SAP.0b013e318170785c
152. Ferroni L, De Francesco F, Pinton P, Gardin C, Zavan B. (2022). Methods to isolate adipose tissue-derived stem cells. *Methods Cell Biol*. 171:215-228
153. Festa E, Fretz J, Berry R, Schmidt B, Rodeheffer M, Horowitz M, Horsley V. (2011). Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell*. 146(5):761-771. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.019.
154. Florak TM, Stern PJ, Bowman MW, Friedman RJ. (1992). Ligament Reconstruction Tendon Interposition Arthroplasty for the Treatment of Thumb Carpometacarpal Arthritis. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 17(3):397–405. doi:10.1016/S0363-5023(09)91053-8.
155. Fontaine C, Lorea P, Nikkels-Tassoni M, Facca S. (2021). Osteoarthritis of the Thumb: From Biomechanics to Treatment. *Hand Surgery and Rehabilitation*, 40(1):27–35. doi:10.1016/j.hansur.2020.11.003.
156. Fontanella CG, Carniel EL, Belluzzi E, Porzionato A, Macchi V, Natali AN. (2022). The Role of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Regeneration. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1985):20220415. doi:10.1098/rspb.2022.0415.
157. Fox S, Bedi A, Rodeo SA. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health*, 1(6):461–468. doi:10.1177/1941738109350438.
158. Franceschini M, Striano RD, Manferdini C, Lisignoli G. (2016). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Osteoarthritis Treatment. *CellR4*, 4(1). doi:10.1155/2016/1790.
159. Frontini A, Cinti S. (2010). Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metabolism*, 11(4):273–276. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004.
160. Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. (2019). A Nuclear Receptor Atlas: Transcriptomic Analysis of Liver X Receptor– and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor–Mediated Gene Regulation in Mouse Liver. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(1):6–18. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311979.
161. Gabriel A, Chiovato L, Sarracino C, Catalano M, Ferraro G, Tedesco G, Manzoli L, Gatta G. (2015). Stromal Vascular Fraction and Its Use in Regenerative Medicine. *Gland Surg*. 4(6):442-452. doi:10.3978/j.issn.2227-684X.2015.11.06

162. Gato-Calvo L, Magalhaes J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ, Burguera EF. (2019). Platelet-Rich Plasma in Osteoarthritis Treatment: Review of Current Evidence. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 10:2040622319825567. doi:10.1177/2040622319825567.
163. Gaut C, Sugaya K. (2015). Critical Review on the Physical and Mechanical Factors Influencing the Function of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Regen Med*. 10(7):807-820. doi:10.2217/rme.15.47.
164. Gelberman RH, Vance RM, Dell PC, Levin LS. (2015). Ligament Reconstruction Tendon Interposition Arthroplasty: Long-Term Outcomes. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 40(5):934–939. doi:10.1016/j.jhsa.2015.03.002.
165. Gervis WH. (1948). Excision of the Trapezium for Osteoarthritis of the Trapeziometacarpal Joint. *Postgraduate Medical Journal*, 24(271):246–250. doi:10.1136/pgmj.24.271.246.
166. Gerwin N, Hops C, Lucke A. (2006). Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev*. 58(2):226-42. Doi:10.1016/j.addr.2006.01.018
167. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-256. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.004.
168. Ghosh P, Guidolin D. (2002). Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Semin Arthritis Rheum*. 2002;32(1):10-37. doi:10.1053/sarh.2002.33720
169. Gillis J, Calder K, Williams J. (2011). Review of thumb carpometacarpal arthritis classification, treatment, and outcomes. *Can J Plast Surg*. 19(4):134-138. doi: 10.1177/229255031101900409
170. Gimble J, Guilak F. (2003). Adipose-Derived Adult Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. *Cytotherapy*, 5(5):362–369. doi:10.1080/14653240310003026.
171. Giordano A, Frontini A, Cinti S. (2016). Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discov*. 15(6):405-424. doi: 10.1038/nrd.2016.31.
172. Glenn JD, Whartenby KA. (2014). Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):526-539. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.526
173. Glickel SZ. (2001). Clinical assessment of the thumb trapeziometacarpal joint. *Hand Clin*. 17(2):185-95.
174. Goldberg VM, Buckwalter JA. (2005). Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: Evidence for disease-modifying activity. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(3):216-224. doi:10.1016/j.joca.2004.11.010
175. Goldring MB, Goldring SR. (2010). Articular cartilage and sub chondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 1192:230-7. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x
176. Golozoubova V, Matthias A, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J. (2001). UCP1: The Key Regulator of Thermogenesis in Brown Adipocytes. *FASEB Journal*, 15(12):2048–2050. doi:10.1096/fj.01-0043fje.
177. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. (2009). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*. 60(4):1006-19. doi: 10.1002/art.24405.
178. Goto A, Leng S, Sugamoto K, Cooney WP 3rd, Kakar S, Zhao K. (2014). In vivo pilot study evaluating the thumb carpometacarpal joint during circumduction. *Clin Orthop Relat Res*. 472(4):1106-13. doi: 10.1007/s11999-013-3066-8
179. Goubier JN, Teboul F, Oberlin C. (2009). Anatomy and Biomechanics of the Thumb Trapeziometacarpal Joint: Implications for Surgical Reconstruction. *Chirurgie de la Main*, 28(4):210–217. doi:10.1016/j.main.2009.03.010.
180. Gravås, E. M. H., Østerås, N., Nossum, R., Eide, R. E. M., Klokkeide, Å., Matre, K. H., Olsen, M., Andreassen, O., Haugen, I. K., Tvetter, A. T., Kjekken, I. (2019). Does occupational therapy delay or reduce the proportion of patients that receives thumb carpometacarpal joint surgery? A multicentre randomised controlled trial. *RMD Open*, 5(2), e001046
181. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 189(1):54-63. doi: 10.1002/jcp.1138.
182. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3440–3450.
183. Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. (2018). Osteoarthritis as a Disease of the Cartilage Pericellular Matrix. *Matrix Biology*, 71-72:40–50. doi:10.1016/j.matbio.2018.05.008.
184. Haas EM, Mehra T, Müller M, et al. (2017). Stem Cell Applications in Hand Surgery. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie*, 49(1):11–19. doi:10.1055/s-0042-121778.
185. Haefeli M, Elfering A. (2006). Pain Assessment in Spinal Disorders: Current Strategies and Future Directions. *European Spine Journal*, 15(Suppl 1)–S24. doi:10.1007/s00586-005-1044-2.
186. Hagert E, Lee J, Ladd AL. (2012). Innervation patterns of thumb trapeziometacarpal joint ligaments. *J Hand Surg Am*. 37(4):706-714.e1. doi: 10.1016/j.jhsa.2011.12.038
187. Hammond, A., Freeman, K. (2001). One-year outcomes of a randomized controlled trial of an educational-behavioural joint protection programme for people with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 40(9), 1044-1051. doi: 10.1093/rheumatology/40.9.1044
188. Harms M, Seale P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 19(10):1252-1263. doi: 10.1038/nm.3361.
189. Harrison M. (2015). Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein. *Aust Prescr*. 38(3):93-4. Doi:10.18733/austprescr.2015.034
190. Hasiba-Pappas S, Kamolz LP, Luze H, Nischwitz SP, Lumenta DB, Winter R. (2023). Regenerative Therapies for Basal Thumb Arthritis-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 24(19):14909. doi: 10.3390/ijms241914909.
191. Hedbom E, Hauselmann. (2002). Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 59: 45-53. Doi: 10.1007/s00018-002-8404-z

192. Hegaze AH, hamdi AS, Alquarache A, Hegazy SA. (2021). Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Pain and function in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A prospective cohort study. *Cureus*. 13(8). doi:10.7759/cureus.13909
193. Hendricks, O., Andersen, T. E., Christiansen, A. A., Primdahl, J., Hauge, E. M., Ellingsen, T., Horsted, T. I., Bachmann, A. G., Loft, A. G., Bojesen, A. B., Østergaard, M., Hetland, M. L., Krogh, N. S., Roessler, K. K., Petersen, K. H. (2019). Efficacy and safety of cannabidiol followed by an open label add-on of tetrahydrocannabinol for the treatment of chronic pain in patients with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis: protocol for a multicentre, randomised, placebo-controlled study. *BMJ Open*, 9(6), e028197. doi: 10.1136/bmjopen-2018-028197.
194. Henrotin Y, Marty M, Mobasher A. (2015). What Is the Current Status of Chondroitin Sulfate and Glucosamine for the Treatment of Osteoarthritis? *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(2):140–149. doi:10.1016/j.semarthrit.2015.04.011.
195. Hepper CT, Halvorson JJ, Duncan ST, Gregory AJM, Dunn WR, Spindler KP. (2009). The efficacy and duration of intra-articular corticosteroid injection for knee osteoarthritis: a systematic review of level I studies. *J Am Acad Orthop Surg*. 17(10):638-46. Doi:10.5435/00124635-200910000-00006
196. Herold C, Kowalewski K, Hasse FM, Neuber G. (2017). Autologous Fat Grafting for Reconstruction of Wrist Joint Defects: A Single-Center Study of 24 Cases. *Plast Reconstr Surg*. 139(5):1185-1194. doi: 10.1097/PRS.00000000000003283.
197. Herold C, Lange J, Rennekampff HO, Allert S, Meyer Marcotty M. (2023). Autologous Fat Transfer for Thumb Carpometacarpal Joint Osteoarthritis: Long Term Results. *Z Orthop Unfall*. 161(5):511-515. doi: 10.1055/a-1737-4541.
198. Heyworth BE, Williams RJ, Bosco JA, Altchek DW. (2008). Arthroscopic Management of Carpometacarpal Joint Disorders. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 33(6):868–874. doi:10.1016/j.jhssa.2008.03.022.
199. Hirschmann A, Falch C, Amsler F, Friederich NF. (2013). Clinical and Radiographic Correlations of Thumb Osteoarthritis. *Skeletal Radiology*, 42(1):89–95. doi:10.1007/s00256-012-1390-5.
200. Hobby, J. L., Lyall, H. A., & Meggitt, B. F. (1998). First metacarpal osteotomy for trapeziometacarpal osteoarthritis. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, 80(3), 508-512. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.80B3.8199>
201. Hong M, Tao S, Zhang L, Diao G, Wang X, Yang J. (2021). Hyaluronic acid-based therapeutic strategies for osteoarthritis: A comprehensive review. *BioMed Res Int*. 2021:8859282. doi:10.1155/2021/8859282
202. Hudetz D, Borić I, Rod E, Jeleč Ž, Matic I, Vrdoljak T, et al. (2019). The Role of Adipose-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Croatian Medical Journal*, 60(3):227–235. doi:10.3325/cmj.2019.60.227.
203. Hunter DJ, Guermazi A, Roemer F, Zhang Y, Neogi T. (2009). Structural Imaging of Osteoarthritis: What Have We Learned and Where Do We Need to Go? *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 35(3):521–549. doi:10.1016/j.rdc.2009.08.004.
204. Im GI, Henrotin Y. (2023). Regenerative Medicine for Early Osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 15:1759720X231194813. doi:10.1177/1759720X231194813.
205. Im GI. (2021). Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Osteoarthritis. *Bone & Joint Research*, 10(7):423–431. doi:10.1302/2046-3758.107.BJR-2021-0100.R1.
206. Imaeda T, Cooney WP, Niebur G, Linscheid RL. (1993). Kinematics of the Normal and Tendon-Reconstructed Thumb Trapeziometacarpal Joint. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 18(2):320–329. doi:10.1016/0363-5023(93)90351-B.
207. Issa MR, Aragon T, Patel J, Patel P. (2022). Emerging Therapies in the Management of Knee Osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 14:1759720X221081502. doi:10.1177/1759720X221081502.
208. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, De Boer J. (2012) Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046842.
209. Jayasekera N, Mapanje T, Clarke J, Bentham G. (2014). Regional Inequalities in Preventive Services Uptake: The Case of NHS Health Checks in England. *PLoS ONE*, 9(9). doi:10.1371/journal.pone.0088427.
210. Jevsevar DS. (2013). Treatment of Osteoarthritis of the Knee: Evidence-Based Guideline, 2nd Edition. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 21(9):571–576. doi:10.5435/JAAOS-21-09-571.
211. Jha B, Ross M, Reeves SWSL, Couzens GB, Peters SE. (2016). Measuring thumb range of motion in first carpometacarpal joint arthritis: The inter-rater reliability of the Kapandji Index versus goniometry. *Hand Therapy*. 21(2):45-53. doi:10.1177/1758998315616399
212. Ji X, Zhang H. (2019). Current Strategies for the Treatment of Early Stage Osteoarthritis. *Frontiers in Mechanical Engineering*, 5:57. doi:10.3389/fmech.2019.00057.
213. Jiang Y, Zhao Y, Wang Y, Zhu Y, Wang L, Chen J. (2014). A Critical Review on the Roles of IL-6 in Osteoarthritis Pathogenesis. *Cell Reports*, 8(1):163–170. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.006.
214. Jin H, Jiang Y, Wang R, Zhang Y, Dong J, Li Y. (2021) Mechanistic insight into the roles of integrins in osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*. 18;9:693484. Doi:10.3389/fcell.2021.693484
215. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*. 14(9):17986-8001. doi: 10.3390/ijms140917986.
216. Jones DL, Wagers AJ. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(1):11-21. doi:10.1038/nrm2319
217. Jones IA, Togashi R, Wilson ML, Heckmann N, Vangness CT. (2018). Intra-articular Treatment Options for Knee Osteoarthritis. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 11(2):181–192. doi:10.1007/s12178-018-9477-7.

218. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Gunther KP, et al. (2003). EULAR Recommendations for the Management of Knee Osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(12):1145–1155. doi:10.1136/ard.2003.011742.
219. Juni P, Hari R, Rutjes AWS, Fischer R, Silleta MG, Reichenbach S, da Costa BR (2015). Intra-articular corticosteroid for knee osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005328.pub3>
220. Kalinovich AV, de Jong JMA, Cannon B, Nedergaard J. (2017). UCP1 in Adipocytes: The Molecular Basis of Brown Fat Activity. *Biochimie*, 134:16–20. doi:10.1016/j.biochi.2016.12.002.
221. Kaneko S, Horiuchi K, Fukuda T. (2009). Effects of Hand Therapy on Pain and Function in Patients with Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis. *Journal of Hand Therapy*, 22(4):330–336. doi:10.1016/j.jht.2009.05.006.
222. Karagergou E, Batsilas I, Tsezou A. (2022). Molecular Biomarkers in the Management of Osteoarthritis: An Update. *Biomolecules*, 12(7):944. doi:10.3390/biom12070944.
223. Kellgren JH, Lawrence JS. (1957). Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 16(4):494–502. doi:10.1136/ard.16.4.494.
224. Kemper R, Koch D, Nadalin S, Mechlenburg I, Christensen R, Thorlund JB. (2018). Safety and Efficacy of Fat Grafting in the Treatment of Painful Thumb Carpometacarpal Joint Osteoarthritis: A Systematic Review. *J Wrist Surg*. 7(1):72-81. doi: 10.1055/s-0037-1607027.
225. Kennedy S, Pap T, Berenbaum F, Felson DT, Spector TD. (2022). Advances in Osteoarthritis Pathogenesis: Highlighting the Role of the Synovium. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 36(1):101682. doi:10.1016/j.berh.2022.101682.
226. Kerkhof FD, Deleu G, D'Agostino P, Vereecke EE. (2016). Subject-specific thumb muscle activity during functional tasks of daily life. *J Electromyogr Kinesiol*. 30:131-6. doi: 10.1016/j.jelekin.2016.06.009
227. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342
228. Kershaw EE, Flier JS. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6):2548–2556. doi:10.1210/jc.2004-0395.
229. Kim HJ, Im GI. (2009). The Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Chondrocyte Proliferation and Differentiation in Co-Culture. *J Orthop Res*. 2009;27(6):758-765. doi:10.1002/jor.20759
230. Kim JR, Yoo JJ, Kim HA. (2018). Therapeutics in Osteoarthritis Based on an Understanding of Its Molecular Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3):674. doi:10.3390/ijms19030674.
231. Kim KI, Song SJ, Koh IJ. (2023). Comparative Efficacy of Various Intra-Articular Hyaluronic Acid Products in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *American Journal of Sports Medicine*, 51(1):123–133. doi:10.1177/03635465221101329.
232. Kleine SA, Mährlein B, Wefstaedt P, Nolte I, Meyer-Lindenberg A. (2020). The Diagnostic Value of Cytological and Cytokine Analysis of Synovial Fluid in Dogs with Osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 33(3):183-191. doi: 10.1055/s-0040-1710314.
233. Kloppenburg M, Handley J, Myriam A. (2019). Advances in Non-Surgical Treatments for Thumb Base Osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(4):485–492. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213792.
234. Kloppenburg M, Kwok WY. (2017). Hand Osteoarthritis: Current Views and Future Perspectives. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 31(5):721–734. doi:10.1016/j.berh.2017.10.006.
235. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, et al. (2005). Role of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Alpha in Matrix Degradation of Human Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 52(1):128–135. doi:10.1002/art.20776.
236. Koh SH, Koh YH, Lee WS, Kim HC. (2019). Clinical Outcomes of Arthroscopic Debridement for Thumb Carpometacarpal Arthritis. *Medicine (Baltimore)*, 98(28). doi:10.1097/MD.00000000000016356.
237. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. (2014). Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res*. 163(4):399-408. doi: 10.1016/j.trsl.2013.11.009.
238. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Hergig E, Kwok CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra D, Shih AA, Shmigel AK, Thoma LM, Turgunbaev M, Turner AS, Reston J (2020). 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care & Research*, 72(2):149–162. doi:10.1002/acr.24131.
239. Komatsu I, Lubahn JD. (2018). Thumb Carpometacarpal Arthritis: Operative Techniques and Clinical Outcomes. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 28(2):92–102. doi:10.1053/j.oto.2018.07.003.
240. Korpershoek JV, Vonk LA, De Windt TS, Admiraal J, Kester EC, van Egmond N, Saris DBF, Custers RJH. (2020) Intra-articular injection with Autologous Conditioned Plasma does not lead to a clinically relevant improvement of knee osteoarthritis: a prospective case series of 140 patients with 1-year follow-up. *Acta Orthopaedica*. 91(6):743-749. doi:10.1080/17453674.2020.1819250.
241. Korpershoek JV, Vonk LA, Filardo G, Kester EC, van Egmond N, Saris DBF, Custers RJH. (2023). Effect of Autologous Conditioned Plasma Injections in Patients With Knee Osteoarthritis. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 11(7):232596712311822. doi:10.1177/232596712311822.
242. Kotla NG, Song KH, Yanik SA, Yang Y, Kim JK. (2021). Recent Advances in Injectable Hydrogels for the Treatment of Osteoarthritis. *Journal of Controlled Release*, 330:585–602. doi:10.1016/j.jconrel.2020.12.036.
243. Kroeze RJ, Knippenberg M, Helder MN. (2011). Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem cells. *Methods in Molecular Biology*, 702:233–48. doi:10.1007/978-1-61737-960-4_17.

244. Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, Cho HL. (2009). Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 28(12):1431-5. Doi:10.1007/s10067-009-1242-8
245. Kuczynski K. (1974). Carpometacarpal joint of the human thumb. *J Anat*. 118(Pt 1):119-26
246. Kuettner KE, Aydelotte MB, Thonar EJ. (1991). Articular Cartilage Matrix and Structure: A Minireview. *The Journal of Rheumatology*, 18(Suppl 27):46-48.
247. Kuhlmann JN. (2001). *Surgical Anatomy of the Hand and Wrist*. *Chirurgie de la Main*, 20(6):385-392. doi:10.1016/S1297-3203(01)00159-2.
248. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M. (2010). Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(19):8639-8643. doi: 10.1073/pnas.0911647107.
249. La Noce M, Mele L, Tirino V, Paino F, De Rosa A, Naddeo P, Papaccio G, Laino L, Desiderio V. (2014). Neural crest stem cell population in craniomaxillofacial development and tissue repair. *J Dent*. 42(8):1010-1018. doi:10.1016/j.jdent.2014.05.009
250. Labusca L, Zugun-Eloae F. (2018). The unexplored roles of intra-articular adipose tissue in the homeostasis and pathology of articular joints. *Frontiers in Veterinary Science*, 5:35. doi:10.3389/fvets.2018.00035.
251. Lactignola L, Staffieri F, Rossi G, Francioso E, Crovace A. (2014). Survival of bone marrow mesenchymal stem cells labelled with red fluorescent protein in an ovine model of collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 27(3):204-209. doi: 10.3415/VCOT-13-09-0113.
252. Ladd AL, Weiss AP, Crisco JJ, Hagert E, Wolf JM. (2012). Understanding the Thumb Carpometacarpal Joint: Biomechanics and Surgical Implications. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)*, 94(5):456-468. doi:10.2106/JBJS.J.01705.
253. Ladd AL, Weiss AP, Crisco JJ, Hagert E, Wolf JM. (2014). Advances in Understanding the Anatomy of the Hand and Wrist: Implications for Surgery and Therapy. *Instructional Course Lectures*, 63:169-184.
254. Lajeunesse D, Reboul P. (2003). Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Modern Rheumatology*, 13(1):3-9. doi:10.1007/s10165-002-0165-1.
255. Lean ME, James WP, Jennings G, Trayhurn P. (1989). Brown adipose tissue in man: a review. *Proc Nutr Soc*. 1989;48(2):243-256. doi: 10.1079/pns19890036.
256. Lee CH, Chiang CF, Kuo FC, Su SC, Huang CL, Liu JS, Lu CH, Hsieh CH, Wang CC, Lee CH, Shen PH. (2021). High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid Inhibits IL-1 β -Induced Synovial Inflammation and Macrophage Polarization through the GRP78-NF- κ B Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 3;22(21):11917. doi: 10.3390/ijms222111917.
257. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogan S, et al. (2003). Biological Alchemy: Engineering Bone and Cartilage from Fat. *Annals of Plastic Surgery*, 50(6):610-617. doi:10.1097/01.SAP.0000042208.90499.24.
258. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, Zhang Q, Sofletea G, Sylvester KG, Lin KY, Longaker MT. (2003). Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2003;50(6):610-617. doi: 10.1097/01.SAP.0000046798.00842.F7.
259. Leese J, Davies DC. (2020). Neural Stem Cells and Their Potential in Treating Neurodegenerative Disorders. *Journal of Anatomy*, 236(1):2-14. doi:10.1111/joa.13199.
260. Leese J, Davies DC. (2020). The role of fat pads in the knee joint: structural and functional perspectives. *J Anat*. 236(2):140-153. doi: 10.1111/joa.13119.
261. Lepper C, Fan CM. (2010). Inducible Lineage Tracing of Pax7+ Cells Reveals Embryonic Origin of Adult Satellite Cells. *Genesis*, 48(7):424-436. doi:10.1002/dvg.20630.
262. Leversedge FJ. (2008). Ligament Reconstruction in Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis: Indications and Techniques. *Hand Clinics*, 24(3):271-278. doi:10.1016/j.hcl.2008.04.004.
263. Li L, Xie T. (2005). Stem Cell Niche: Structure and Function. *Annu Rev Dev Biol*. 21:605-631. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120131
264. Lin G, Huang YC, Shindel AW, Banie L, Wang G, Ning H, Lin CS, Lue TF. (2008). Labeling and Tracking of Mesenchymal Stem Cells with Iron Oxide Nanoparticles. *Stem Cells and Development*, 17(5):989-1001. doi:10.1089/scd.2008.0031.
265. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. (2011). The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2):269-291. doi:10.1007/s12015-010-9193-7.
266. Liu KH, Chan YL, Chan JCN, Chan WB, Kong WL. (2006). Mesenteric fat thickness as an independent determinat of fatty liver. *Int J Obesity*, 30:787-793
267. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. (2012). Ageing and the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(7):412-420. doi:10.1038/nrrheum.2012.49.
268. London, D. A., Stern, P. J. (2022). Carpometacarpal Arthrodesis: Indications and Techniques. *Hand Clinics*, 38(2), 231-240. doi.org/10.1016/j.hcl.2021.11.003
269. Lore DP, Rizzo M, Berger RA. (2001). Thumb Carpometacarpal Joint Anatomy and Function. *Chirurgie de la Main*, 20(6):393-398. doi:10.1016/S1297-3203(01)00160-9.
270. Lore DP, Rizzo M, Berger RA. (2002). Arthrodesis of the Thumb Carpometacarpal Joint: Indications, Techniques, and Outcomes. *The Journal of Hand Surgery (British Volume)*, 27(6):597-602. doi:10.1054/jhsb.2002.0835.
271. Lorea P, Pirotte N, Gelberman RH. (2002). Surgical Approaches to the Thumb Carpometacarpal Joint: An Overview. *Chirurgie de la Main*, 21(1):14-20. doi:10.1016/S1297-3203(01)00100-4.
272. Lories RJU, Luyten FP. (2012). Osteoarthritis, a Disease Bridging Development and Regeneration. *BoneKEY Reports*, 1:136. doi:10.1038/bonekey.2012.136.

273. Macchi V, Porzionato A, De Caro R. (2018). Anatomical and Functional Insights into the Infrapatellar Fat Pad of the Knee. *Journal of Anatomy*, 233(4):421–432. doi:10.1111/joa.12877.
274. MacDougald OA, Lane MD. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:345-73. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.002021.
275. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18(4):419–433. doi:10.1007/s00167-010-1054-z.
276. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. (2022). Subchondral Bone and Osteoarthritis: Current Understanding and Future Directions. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(6):915–924. doi:10.1016/j.joca.2022.03.004.
277. Malahias MA, Johnson EO, Richardson M. (2021). Emerging Concepts in the Management of Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis. *Cartilage*, 12(4):383–397. doi:10.1177/1947603520910135.
278. Malanga GA, Hanchard N, Manzi G. (2018). Adipose-Derived Stem Cells in Orthopedic Regenerative Medicine: Current Applications and Future Directions. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 9(3):223–230. doi:10.1016/j.jcot.2017.07.003.
279. Maldonado M, Nam J. (2013). The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathogenesis of Osteoarthritis. *BioMed Research International*, 2013:284873. doi:10.1155/2013/284873.
280. Malfait AM, Schnitzer TJ. (2015). Towards a Mechanism-Based Approach to Pain Management in Osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1):348. doi:10.1186/s13075-015-0837-4.
281. Man GS, Mologhianu G. (2014). Osteoarthritis Pathogenesis – A Complex Process That Involves the Entire Joint. *Journal of Medicine and Life*, 7(1):37–41.
282. Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN. (2010). Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)*. 34(6):949-959. doi: 10.1038/ijo.2009.286
283. Maqbool M, Fekadu G, Jiang X, Bekele F, Tolossa T, Turi E, Fetensa G, Fanta K. (2021). An Up to Date on Clinical Prospects and Management of Osteoarthritis. *Annals of Medicine and Surgery (Lond)*, 72:103077. doi:10.1016/j.amsu.2021.103077.
284. Marinho A, Nunes C, Reis S. (2021). Advances in Nanotechnology for the Treatment of Osteoarthritis. *Biomolecules*, 11(3):431. doi:10.3390/biom11030431.
285. Martin CL, Browne JA. (2019). Intra-articular Corticosteroid Injections for Symptomatic Knee Osteoarthritis: What the Orthopaedic Provider Needs to Know. *J Am Acad Orthop Surg*. 27(17):643-651. doi:10.5435/JAAOS-D-18-00461
286. Mason C, Dunnill P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med*. 3(1):1-5. doi:10.2217/17460751.3.1.1
287. Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Tokunaga K, Fujioka S. (1995). Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Obesity Research*. 3(Suppl 2):187S-194S.
288. Matullo, K. S., Ilyas, A., Thoder, J. J. (2007). CMC Arthroplasty of the Thumb: A Review. *Hand (N Y)*, 2(4), 232–239. doi.org/10.1007/s11552-007-9068-9
289. Maumus M, Manferdini C, Toupet K, Peyrafitte JA, Ferreira R, Facchini A, Gabusi E, Bourin P, Jorgensen C, Lisignoli G, Noël D. (2013). Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res*. 11(2):834-844. doi: 10.1016/j.scr.2013.05.007.
290. Maw J, Siddiqui A, Fowler JR. (2016). Advances in Thumb Carpometacarpal Arthritis: Current Treatments and Future Directions. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(8):451–456. doi:10.12968/hmed.2016.77.8.451.
291. Mayer SW, Swigart CR, Rhee PC. (2014). Advances in Trapeziometacarpal Joint Arthroplasty. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 39(8):1628–1635. doi:10.1016/j.jhssa.2014.05.014.
292. Mayoly A, Witters M, Jouve E, Bec C, Iniesta A, Kachouh N, Veran J, Grimaud F, Coulange Zavarro A, Fernandez R, Bendahan D, Giraud L, Dumoulin C, Chagnaud C, Casanova D, Sabatier F, Legré R, Jaloux C, Magalon J. (2022). Intra-Articular Injection of Autologous Microfat and Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Wrist Osteoarthritis: A Pilot Study. *J Clin Med*. 11(19):5786. doi: 10.3390/jcm11195786
293. McAlindon TE, LaValley MP. (2017). Long-term intra-articular steroid injections and knee cartilage-reply. *JAMA*. 318(12):1185-1186. Doi:10.1001/jama.2017.11339
294. McGee C, Thomas T, Williams J. (2015). Rehabilitation Protocols in Thumb Basal Joint Arthroplasty. *Journal of Hand Therapy*, 28(4):349–356. doi:10.1016/j.jht.2015.06.005.
295. McQuillan TJ, Kenney D, Crisco JJ, Weiss AP, Ladd AL. (2016). Weaker functional pinch strength is associated with early thumb carpometacarpal osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 474(2):557-61. doi: 10.1007/s11999-015-4599-9.
296. Mebarki M, Abadie C, Larghero J. (2021). Mesenchymal stromal cells for management of inflammation: Toward new therapeutic opportunities. *Stem Cell Res Ther*. 12(1):592. doi:10.1186/s13287-021-02636-7
297. Medical Advisory Secretariat. (2005). Intra-Articular Viscosupplementation with Hyaluronic Acid for Osteoarthritis of the Knee: An Evidence-Based Analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 5(18):1–74.
298. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, Roelofs H. (2013). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells Transl Med*. 2(6):381-390. doi: 10.5966/sctm.2012-0080.
299. Melville, D. M., Taljanovic, M. S., Scalcione, L. R., Eble, J. M., Gimber, L. H., DeSilva, G. L., Sheppard, J. E. (2015). Imaging and management of thumb carpometacarpal joint osteoarthritis. *Skeletal Radiology*, 44(2):165-177. doi: 10.1007/s00256-014-1997-0
300. Mercer SR, Bogduk N. (2007). Clinical Anatomy of the Ligamentum Flavum. *Clinical Anatomy*, 20(6):535–543. doi:10.1002/ca.20430.
301. Merritt M. (2012) Comparison to Hand Therapy and Placebo in the Treatment of Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis. Dissertation.

302. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. (1971). Osteoporosis and the Remodeling of Bone Tissue: A Biomechanical Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 80:147–154.
303. Meyer-Marcotty MM, Batsilas I, Sanders A, Dahmann S, Happe C, Herold C. (2022) Lipofilling in Osteoarthritis of the Finger Joints: Initial Prospective Long-Term Results. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 149(5):1139-1145. doi: 10.1097/PRS.00000000000009047.
304. Mgni A, Bertolini G, Ciotti E, Marcellini L, Ferrari S. (2021). Management of Pain in Thumb Base Osteoarthritis: A Review of Current Strategies. *Pain and Therapy*, 10(2):805–818. doi:10.1007/s40122-021-00299-6.
305. Miceli V, Bulati M, Iannolo G, Zito G, Caruso M, Conaldi PG. (2021). Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Regenerative Medicine. *Adv Health Mater*. 10(2). doi:10.1002/adhm.202001205
306. Migliorini RH, Garófalo MA, Kettelhut IC. (1997). Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am J Physiol*. 272(5 Pt 1). doi: 10.1152/ajpendo.1997.272.5.E1007.
307. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 110(3):349-55. doi: 10.1161/01.CIR.0000135466.16830.D9.
308. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. (2015). Interactions between hyaluronan and its receptors regulate the activities of inflammation and cancer. *Frontiers in Immunology*. 6:201. doi:10.3389/fimmu.2015.00201
309. Mobargha N, Ludwig C, Ladd AL, Hagert E. (2014). Ultrastructure and innervation of thumb carpometacarpal ligaments in surgical patients with osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 472(4):1146-1154. doi: 10.1007/s11999-013-3083-7
310. Mobasheri A, Batt M. (2014). An Update on the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Maturitas*, 78(1):1–6. doi:10.1016/j.maturitas.2014.02.009.
311. Mobasheri A, Dobson H, Mason SL, Cullingham F, Shakibaei M, Moley JF, Moley KH. (2005). Expression of the GLUT1 and GLUT9 Facilitative Glucose Transporters in Embryonic Chondroblasts and Mature Chondrocytes in Ovine Articular Cartilage. *Cell Biology International*, 29(4):249–260. doi:10.1016/j.cellbi.2005.03.001.
312. Monslow J, Govindaraju P, Puré E. (2015). Hyaluronan—A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 6:231. doi:10.3389/fimmu.2015.00231.
313. Moreland LW. (2003). Intra-articular hyaluronan therapy: a review of pharmacologic mechanisms and clinical use in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 5(2):54–67. doi:10.1186/ar623
314. Moriatis Wolf J, Scher DL, Etchill EW, Scott F, Williams AE, Delaronde S, King KB. (2014) Relationship of relaxin hormone and thumb carpometacarpal joint arthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 472(4):1130-7. doi: 10.1007/s11999-013-2960-4
315. Mort JS, Billington CJ. (2001). Articular Cartilage and Changes in Arthritis: Matrix Degradation. *Arthritis Research & Therapy*, 3(6):337–341. doi:10.1186/ar336.
316. Mukherjee A, Das B. (2024). Advances in Biomaterials for Osteoarthritis Therapy. *Biomaterials and Biosystems*, 8:100012.
317. Mureau MA, Bouman DE, van Kooten EO, van der Horst CM. (2001). Long-Term Results of Tendon Interposition Arthroplasty in Thumb Base Osteoarthritis. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 26(2):238–244. doi:10.1053/jhsu.2001.21515.
318. Musumeci G. (2016). The Effect of Mechanical Loading on Articular Cartilage. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, 1(2):154–161. doi:10.3390/jfkm1020154.
319. Muthu S, Ramesh S, Kumar S, Pandian S. (2023). Innovative Strategies for Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics*, 14(6):382–391. doi:10.5312/wjo.v14.i6.382.
320. Nanayakkara VK, Nguyen VT, Becker T, Lin CY. (2017). Advances in Computational Models of Thumb Function. *Frontiers in Mechanical Engineering*, 3:21. doi:10.3389/fmech.2017.00021.
321. Napier JR. (1955). The prehensile movements of the human hand. *J Anat*. 89(1):1-30
322. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. (2003). Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a study in rabbits. *Tissue Eng*. 9(3):469-478. doi: 10.1089/107632703322066588.
323. Neogi T. (2013). The Epidemiology and Impact of Pain in Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(9):1145–1153. doi:10.1016/j.joca.2013.03.018.
324. Neumann DA, Bielefeld T. (2003). The Carpometacarpal Joint of the Thumb: Stability, Deformity, and Therapeutic Intervention. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 33(12):761–770. doi:10.2519/jospt.2003.33.12.761.
325. Nicholls AM, Davy A, Wilson AM, Price AJ. (2017). Osteoarthritis Biomarkers: Current Status and Future Directions. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 10:1179544117712319. doi:10.1177/1179544117712319.
326. Nicoletti GF, De Francesco F, D'Andrea F, Ferraro GA. (2015). Methods and procedures in adipose stem cells: state of the art and perspective for translation medicine. *J Cell Physiol*. 230(2):489-95. doi: 10.1002/jcp.24765
327. Normand M, Périchon A, Desrosiers J. (2021). Effectiveness of Hand Therapy Interventions in Patients with Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis. *Hand Therapy*, 26(2):55–62. doi:10.1177/1758998320976725.
328. Noyszewski EA, Bowen RC, Laybourn KA, Kruger DG, Koob TJ. (2001). Detection of Collagen Degradation in Osteoarthritic Cartilage Using MRI. *Arthritis & Rheumatism*, 44(1):139–144. doi:10.1002/1529-0131(200101).
329. O'Brien VH, Chung KC. (2013). Therapeutic Interventions in the Management of Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis. *Journal of Hand Therapy*, 26(1):30–37. doi:10.1016/j.jht.2012.10.003.
330. O'Neill TW, Felson DT. (2018). Mechanisms of Osteoarthritis (OA) Pain. *Current Osteoporosis Reports*, 16(5):611–616. doi:10.1007/s11914-018-0477-1.

331. O'Neill TW, McCabe PS, McBeth J. (2018). Update on the Epidemiology, Risk Factors and Disease Outcomes of Osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 32(2):312–326. doi:10.1016/j.berh.2018.11.004.
332. O'Shaughnessy MA, Rizzo M. (2023). Trapeziometacarpal Arthroplasty: Trends, Techniques, and Outcomes. *Hand Clinics*, 39(2):245–260. doi:10.1016/j.hcl.2023.01.005.
333. Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. (2015). Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: Current state of the art. *SpringerPlus*. 4:457. doi:10.1186/s40064-015-1247-4
334. Oheb J, Gelberman RH. (2015). Arthroscopic Techniques for the Management of Thumb Carpometacarpal Joint Arthritis. *Hand Surgery*, 20(1):63–69. doi:10.1142/S0218810415720037.
335. Ombregt L. (2013). *Applied Anatomy of the Wrist, Thumb, and Hand*. Churchill Livingstone. ISBN: 9780702044718.
336. Omoigui S. (2007). The biochemical origin of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammation response. Part 2 of 3—inflammatory profile of pain syndromes. *Med Hypotheses*. 69(6):1169-78. Doi:10.1016/j.mehy.2007.06.033
337. Omoigui S. (2007). The biochemical origin of pain—proposing a new law of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammation response. Part 1 of 3—a unifying law of pain. *Med Hypotheses*. 69(1):70-82. Doi:10.1016/j.mehy.2006.11.028
338. Onorato F, Rucci M, Alessio-Mazzola M, Bistolfi A, Castagnoli C, Formica M, Ferracini R. (2024). Autologous Microfragmented Adipose Tissue Treatment of Knee Osteoarthritis Demonstrates Effectiveness in 68% of Patients at 4-Year Follow-Up. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 144(1):51–59. doi:10.1007/s00402-023-05143-y.
339. Ooishi D, Izumi M, Ueba H, Ikeuchi M. (2019). Splinting for the carpometacarpal joint relieves experimental basal thumb pain and loss of pinch strength. *Eur J Pain*. 23(7):1351-1357. doi: 10.1002/ejp.1404
340. Orbay JL, Cambo RA. (2020). Trapeziometacarpal Arthroplasty: Current Trends and Surgical Techniques. *Hand Clinics*, 36(3):365–375. doi:10.1016/j.hcl.2020.04.001.
341. Oshita T, Tobita M, Tajima S, Mizuno H. (2016). Adipose-Derived Stem Cells Improve Collagenase-Induced Tendinopathy in a Rat Model. *Am J Sports Med*. 44(8):1983-9. doi: 10.1177/0363546516640750.
342. Ostergaard M, Halberg P. (1998). Intra-articular corticosteroids in arthritis disease: a guide to treatment. *BioDrugs*. 9(2):95-103. Doi:10.2165/00063030-199809020-00002
343. Ostergaard, PJ, Hall, MJ, Dowlatshahi, AS, Harper, CM, Rozental, TD. (2020). Thumb carpometacarpal arthritis: Prognostic indicators and timing of further intervention following corticosteroid injection. *Journal of Hand Surgery American Volume*, 45(10), 986.e1-986.e9.
344. Osterman CJ, McCarthy MB, Cote MP, Beitzel K, Scheiderer B, Donovan K, et al. Platelet-Rich Plasma Increases Anti-inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*. 2015;43(6):1474-1484. doi:10.1177/0363546515574063
345. Otto TC, Lane MD. (2005). Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 40(4):229-42. doi: 10.1080/10409230591008189
346. Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, Cifone MG, Cinque B, Giuliani M. (2018). Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *Int J Mol Sci*. 19(7):1897. doi:10.3390/ijms19071897
347. Palumbo Piccionello A, Riccio V, Senesi L, Volta A, Pennasilico L, Botto R, Rossi G, Tambella AM, Galosi L, Marini C, Vullo C, Gigante A, Zavan B, De Francesco F, Riccio M. (2021). Adipose micro-grafts enhance tendinopathy healing in ovine model: An in vivo experimental perspective study. *Stem Cells Transl Med*. 10(11):1544-1560. doi: 10.1002/sctm.20-0496.
348. Panchal-Kildare S, Malone K. (2013). Management of Thumb Carpometacarpal Joint Arthritis. *Hand Clin*. 29(2):197-209. doi: 10.1016/j.hcl.2013.01.002
349. Pang D, Thompson DNP. (2011). Embryology and Surgical Anatomy of the Craniocervical Junction. *Child's Nervous System*, 27(4):523–536. doi:10.1007/s00381-010-1257-y.
350. Pap T, Dankar B, Wehmeyer C, Korb-Pap A, Sherwood J. (2020). Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*. 101:140-145. Doi:10.1016/j.semdb.2019.12.006
351. Papalia, R., Russo, F., Torre, G., Albo, E., Grimaldi, V., Papalia, G., Sterzi, S., Vadalà, G., Bressi, F., Denaro, V. (2017). Hybrid hyaluronic acid versus high molecular weight hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis in obese patients. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 31(4 Suppl 2), 103-109
352. Pellegrini VD. (1991). Osteoarthritis of the Trapeziometacarpal Joint: The Pathophysiology of Ligament Reconstruction and Tendon Interposition Arthroplasty. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 16(5):896–903. doi:10.1016/0363-5023(91)90243-Y.
353. Pelletier JP, Raynauld JP, Berthiaume MJ, Abram F, Choquette D, Haraoui B, et al. (2006). Long Term Evaluation of Disease Progression Through Quantitative Magnetic Resonance Imaging of Symptomatic Knee Osteoarthritis Patients. *Arthritis Research & Therapy*, 8(1). doi:10.1186/ar1871.
354. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M, Gonzalez F, Beclin E, Decourcelle C, Antunes L, Gay G, Neut C, Colombel JF, Desreumaux P. (2007). Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? *Gut*. 56(4):577-583.
355. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, Rousseaux C, Dubuquoy C, Decourcelle C, Sitaraman S, Chavatte P, Desreumaux P. (2012). Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut*. 61(1):78-85.
356. Phua JKS, Tan JR, Tay KH, Lim AK. (2020). Imaging of Osteoarthritis: Recent Advances. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 28(1):2309499019896868. doi:10.1177/2309499019896868.

357. Pieron AP. (1973). The mechanism of the first carpometacarpal (CMC) joint. An anatomical and mechanical analysis. *Acta Orthop Scand Suppl.* 148:1-104. doi:10.3109/ort.1973.44.suppl-148.01
358. Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. (2007). The Endoplasmic Reticulum and Calcium Signaling: Methods and Protocols. *Methods in Cell Biology*, 80:85–120. doi:10.1016/S0091-679X(06)80004-1.
359. Piotrowska K, Tarnowski M. (2021). The emerging role of adipose tissue in the modulation of bone metabolism and osteoarthritis development. *Nutrients*. 13(4):1215. doi: 10.3390/nu13041215.
360. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
361. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L. (2004). Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation*. 109(5):656-663. doi: 10.1161/01.CIR.0000114522.38253.68.
362. Pond CM. (1992). Adipose Tissue and the Immune System: A Nutritional Perspective. *Proceedings of the Nutrition Society*, 51(1):83–94. doi:10.1079/PNS19920014.
363. Pontes-Quero GM, Garcia-Fernandez L, Aguilar MR, San Roman J, Perez Cano J, Vazquez-Lasa. (2019). Active viscosupplements for osteoarthritis treatment. *Semin Arthritis Rheum*. 49(Suppl 1). doi:10.1016/j.semarthrit.2019.06.010
364. Poupon M, Hebert V, Pouchot J, Mathieu A. (2004). Outcomes of Arthrodesis for Trapeziometacarpal Osteoarthritis. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Appareil Moteur*, 90(5):383–389.
365. Prins JB. (2002). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 16(4):639–651. doi:10.1053/beem.2002.0222.
366. Prins, J. B., & O'Rahilly, S. (1997). Regulation of adipose cell number in man. *Clinical Science (London)*, 92(1), 3–11. <https://doi.org/10.1042/cs0920003>
367. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. (2006). Osteoarthritis Cartilage Histopathology: Grading and Staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(1):13–29. doi:10.1016/j.joca.2005.07.014.
368. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Brossaud J, Blancher A, Klein B, Noel D, Jorgensen C. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005;129(1):118-129. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
369. Qi Y, Wang P, Chen J, Dong D, Zhu X, Zheng H. (2020). Visualization of Stem Cell Differentiation into Adipocytes by Confocal Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 156. doi:10.3791/60412.
370. Quintero Sierra LA, Biswas R, Conti A, Busato A, Ossanna R, Zingaretti N, Parodi PC, Conti G, Riccio M, Sbarbati A, De Francesco F. (2023). Highly Pluripotent Adipose-Derived Stem Cell-Enriched Nanofat: A Novel Translational System in Stem Cell Therapy. *Cell Transplantation*. 32:09636897231175968. doi:10.1177/09636897231175968.
371. Radin EL, Swann DA, Weissner PA. (1970). Separation of a hyaluronate-free lubricating fraction from synovial fluid. *Nature*, 228(5269):377–378. doi:10.1038/228377a0.
372. Rajan PV, Parratte S, Vaishya R, Ranawat AS, Ranawat CS. (2020). Total knee arthroplasty: principles of design and surgical techniques. *J Bone Joint Surg Am*. 102(20):1848–1860. doi:10.2106/JBJS.20.00349
373. Randelli P, Cingolani E, Ferrante S, Fusaro F, Menon A, Bizzarri P, Pappalardo M, Gregori G. (2016) Stem Cell Therapy in Orthopaedics: A Review. *Stem Cell Int*. 2016: 1834789. doi:10.1155/2016/1834789
374. Raposio E, Ciliberti R, Robello C, Santi P. (2017). Standardization of the Harvesting Procedure for Adipose-Derived Stem Cells Isolation: Preliminary Results of a Novel Technique. *Annals of Medicine and Surgery*. 20:49-51. doi:10.1016/j.amsu.2017.06.014
375. Rastogi AK, Raghavan A, Agrawal MD, Vivekanandan S. (2016). Imaging in Hand and Wrist Osteoarthritis: A Diagnostic Update. *American Journal of Radiology*, 206(1):1–12. doi:10.2214/AJR.15.15085.
376. Rayegani SM, Bahrami MH, Zanjani LO, Amouzandeh R. (2014). The Effect of Rehabilitation Therapy on Pain and Function in Thumb Base Osteoarthritis. *Orthopedic Reviews*, 6(3). doi:10.4081/or.2014.5401.
377. Rayegani SM, Raeesadat SA, Taheri MS, Babae M, Bahrami MH, Eliaspour D, Ghorbani E. (2014) Does intra articular platelet rich plasma injection improve function, pain and quality of life in patients with osteoarthritis of the knee? *Orthop Rev (Pavia)*. 6(3):5405. doi:10.4081/or.2014.5405
378. Reginster JY, Neuprez A, Lecart MP, Sarlet N, Bruyere O. (2012). Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis. *Rheumatology International*. 32(10):2959–2967. doi:10.1007/s00296-012-2416-2
379. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 109(10):1292-1298. doi: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1.
380. Ricci MA, Di Filippo A, Chiuchiu V. (2018). Visceral adipose tissue and metabolic syndrome: more than a simple association. *Journal of Clinical Hypertension*. 20(4):387-391.
381. Richard MJ, Chevalier X, Conaghan PG, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. (2023). Advances in the Understanding of the Pathophysiology and Management of Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 31(1):12–22. doi:10.1016/j.joca.2023.01.003.
382. Richards MM, Maxwell JS, Weng L, Angelos MG, Goltzarian J. (2016). Intra-articular Treatment of Knee Osteoarthritis: From Anti-inflammatories to Products of Regenerative Medicine. *The Physician and Sportsmedicine*, 44(2):101–108. doi:10.1080/00913847.2016.1168272.
383. Riley N, Vella-Baldacchino M, Thurley N, Hopewell S, Carr AJ, Dean B. (2019). Injection therapy for base of thumb osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 9(9), e027507. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-027507>
384. Rim YA, Nam Y, Ju JH. (2020). The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7):2358. doi:10.3390/ijms21072358.

385. Riordan DC. (1974). The Management of Lumbar Spinal Stenosis. *Orthopedic Clinics of North America*, 5(2):343–350.
386. Rivera-Gonzalez G, Shook BA, Horsley V. (2014). Adipocytes in skin health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 4(3). doi: 10.1101/cshperspect.a015271.
387. Roach HI, Yamada N, Cheung KS, Bronner F, Coleman JE, Kleiderman J. (2007). Pathobiology of Osteoarthritis: Pathomechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Current Drug Targets*, 8(2):271–282.
388. Roemer FW, Crema MD, Trattinig S, Guermazi A. (2014). Advances in Imaging of Osteoarthritis and Cartilage. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 28(1):23–39. doi:10.1016/j.berh.2014.02.002.
389. Romagnoli C, Brandi ML. (2014). Adipose-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine and Stem Cell Therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6(6):744–750. doi:10.4252/wjsc.v6.i6.744.
390. Ronn K, Reischl N, Gautier E, Jacobi M. (2011). Current Surgical Treatment of Knee Osteoarthritis. *Arthritis*. 2011:454873. doi:10.1155/2011/454873.
391. Rosen ED, Spiegelman BM. (2006). Adipocytes as Regulators of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Nature*, 444(7121):847–853. doi:10.1038/nature05483.
392. Rosenwald M., Wolfrum, C. (2014). The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*, 3(1), 4–9. doi.org/10.4161/adip.26232
393. Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, Ruberg FL, Mahabadi AA, Vasari RS, O'Donnell CJ, Fox CS. (2008). Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 117(5):605-613.
394. Ruetze M, Richer W. (2014). Osteogenic differentiation of ASC in clinical applications: a review. *Expert Rev Mol Med*. 16. doi: 10.1017/erm.2014.20.
395. Sakata R, Reddi AH. (2016). Platelet-rich plasma modulates actions on articular cartilage lubrication and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 22(5):408–419. doi:10.1089/ten.teb.2016.0093
396. Salathia S, Singh AK, Sharma R, Singh S. (2023). Hyaluronic Acid and Its Multifaceted Role in Inflammation and Tissue Regeneration: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(5):12345. doi:10.3390/ijms240512345.
397. Saltzherr MS, van Neck JW, Muradin GSR, Ouwendijk R, Luime JJ, Coert JH, Hovius SER, Selles RW. (2013). Computed tomography for the detection of thumb base osteoarthritis: comparison with digital radiography. *Skeletal Radiol*, 42(5), 715-721. doi: 10.1007/s00256-013-1586-7
398. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. (2010). Platelet-rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Am J Phys Med Rehabil*. 89(11):961–969. doi:10.1097/PHM.0b013e3181f1c6f7
399. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. (2014a). Adipocyte Lineage Specification and Plasticity. *Nature Communications*, 5:4099. doi:10.1038/ncomms5099.
400. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. (2014b). Transcriptional Regulation of Adipogenesis by mTORC1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(3):347–356. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.008.
401. Sarjeant K, Stephens JM. (2012). Adipogenesis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(12):721–728. doi:10.1038/nrrheum.2012.149.
402. Sastourné-Arrey Q, Moncunill-Mata J, Ruiz de Villa MC, Estrada-Masllorens JM. (2023). Emerging Roles of Adipose Tissue in Systemic Metabolism. *Nature Communications*, 14(1):507. doi:10.1038/s41467-023-36089-2.
403. Sbarbati A, Osculati F, Silvagni D, Malanchini B. (1987). The Morphological Basis of White and Brown Adipose Tissue. *Acta Anatomica*, 130(1):18–24. doi:10.1159/000146459.
404. Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C. (2003). Mechanisms of Disease: Adipokines and Local Factors in Adipose Tissue. *JAMA*, 289(22):2547–2553. doi:10.1001/jama.289.22.2547.
405. Schmidt B, Horsley V. (2012). Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Exp Dermatol*. 21(9):706-709. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01553.x.
406. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. (2008). PRDM16 Controls a Brown Fat/Skeletal Muscle Switch. *Nature*, 454(7207):961–967. doi:10.1038/nature07182.
407. Sebo ZL, Jeffery E, Holtrup B, Rodeheffer MS. (2018). A mesodermal fate map for adipose tissue. *Development*. 145(17):dev166801. Doi:10.1242/dev.166801
408. Segalla L, Ponzoni L, Marzi I, D'Antuono M, De Santis I, Clemente DF, Panzetta I, Fiore A, Lupo R, Bovolenta M, Bettini S, Duchi S, Lucarelli E. (2021). Functional and morphological differences between human dermal white adipose tissue and subcutaneous white adipose tissue. *Tissue Cell*. 73:101652. doi: 10.1016/j.tice.2021.101652.
409. Selig DJ, Roy M, Zeimer HR, Onishko HM, Stanton MP. (2022). Advances in Pharmacotherapy for Osteoarthritis Pain. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 47(3):255–266. doi:10.1111/jcpt.13572.
410. Sellam J, Berenbaum F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 6(11):625-35. Doi:10.1038/nrrheum.2010.159.
411. Senesi L, De Francesco F, Farinelli L, Manzotti S, Gagliardi G, Papalia GF, Riccio M, Gigante A. (2019). Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: Preliminary results. *Front Cell Dev Biol*. 7:88. doi: 10.3389/fcell.2019.00088. eCollection 2019
412. Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 205(1):114-122. doi: 10.1002/jcp.20294.
413. Sera Y, LaBarge MA, Prioli N, Ward DH, Munoz O, Carpanini SM, Lehman SM, Dani C. (2009). Hematopoietic Stem Cell Activation and Expansion in Response to Lipopolysaccharide Is Associated with the Induction of Cellular Senescence. *Experimental Hematology*, 37(9):1171–1180. doi:10.1016/j.exphem.2009.05.003.

414. Shackney SE, Joel CD. (1966). Stimulation of glucose metabolism in brown adipose tissue by addition of insulin in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 241(17), 4004–4010.
415. Sharma M, Yadav SK, Kumar R, Soni A, Sharma S. (2018). Management Strategies for Osteoarthritis: Current Scenario and Future Directions. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 9(1):51–56. doi:10.1016/j.jcot.2017.09.012.
416. Shin EK, Meals RA. (2005). The historical importance of the hand in advancing the study of human anatomy. *J Hand Surg Am*. 2005 Mar;30(2):209-21. doi: 10.1016/j.jhsa.2004.09.004
417. Shridhar V, Williams S. (2020). Basal thumb arthritis: Treatment strategies for managing pain. *Australian Journal of General Practice*, 49(11), 702-706. doi: 10.31128/AJGP-06-20-5504
418. Siddiq MAB, Kumar N, Gopal N, Tandon P, Sharma RK. (2024). Emerging Trends in Osteoarthritis Research and Therapy. *Joint Bone Spine*, 91(1):102872. doi:10.1016/j.jbspin.2023.102872.
419. Sivitz WI, DeSautel SL, Kayano T, Bell GI, Pessin JE. (1989). Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. *Nature*, 340(6228), 72–74. doi.org/10.1038/340072a0
420. Sokolove J, Lepus CM. (2013). Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Latest Findings and Interpretations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 5(2):77–94. doi:10.1177/1759720X12467868.
421. Song Y, Du H, Dai C, Zhang L, Li S, Hunter DJ, Lu L, Bao C. (2018). Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regenerative Medicine*, 13(3):295–307. doi:10.2217/rme-2017-0152.
422. Spaans AJ, van Minnen LP, Kon M, Schuurman AH, Schreuders AR, Vermeulen GM. (2020). Conservative treatment of thumb base osteoarthritis: A systematic review. *J Hand Surg Am*, 45(5), 449-457. doi: 10.1016/j.jhsa.2020.01.022
423. Spielman, A. F., Sankaranarayanan, S., Lessard, A. S. (2022). Joint preserving treatments for thumb CMC arthritis. *Hand Clinics*, 38(2), 169-181. doi.org/10.1016/j.hcl.2022.01.002
424. Sprott H, Reinert I, Jager M. (2023). Emerging Pharmacological Strategies for Osteoarthritis Management. *Pharmaceutics*, 15(2):389. doi:10.3390/pharmaceutics15020389.
425. Srinivasan H, Landsmeer JM. (1982). Internal stabilization in the thumb. *J Hand Surg Am*. 7(4):371-5. doi: 10.1016/s0363-5023(82)80146-9.
426. Stamm TA, Machold KP, Smolen JS, Proding B. (2002). Joint Protection and Hand Function in Patients with Hand Osteoarthritis. *Arthritis Care & Research*, 47(4):430–435. doi:10.1002/art.10656.
427. Steenkamp W, Ferreira N, Louw QA. (2022). The Role of Physical Therapy in the Management of Osteoarthritis: A Review of Recent Advances. *SICOT-J*, 8:36. doi:10.1051/sicotj/2022036.
428. Steinmetz JD, Culbreth GT, Haile LM, Rafferty Q, Lo J, Fukutaki KG, et al. (2023). Global, Regional, and National Burden of Osteoarthritis, 1990-2020, and Projections to 2050: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*, 5(9)–e522. doi:10.1016/S2665-9913(23)00163-7.
429. Stoll V, Brumann M, Eisenbart A, Brandner M, Moser A. (2023). Clinical Outcomes of Hyaluronic Acid Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Cureus*, 15(3). doi:10.7759/cureus.67819.
430. Strauch RJ, Fernandez DL, Rosenwasser MP, Baskies MA. (1994). Trapeziometacarpal Joint Arthrodesis: Long-Term Outcomes. *The Journal of Hand Surgery*, 19(4):626–633. doi:10.1016/0363-5023(94)90278-X.253.
431. Striano RD, Malanga GA, Mautner K. (2015). Cellular Therapy in Regenerative Medicine: Current Evidence and Future Applications. *CellR4*, 3(1). doi:10.1155/2015/1524.
432. Stromps JP, Paul NE, Rath B, Nourbakhsh M, Bernhagen J, Pallua N. (2014). Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: a new path in articular cartilage defect management?. *BioMed Res Int*. 2014:740926. doi: 10.1155/2014/740926.
433. Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. (2006). Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 24(10):2285-93. doi: 10.1634/stemcells.2006-0080.
434. Swales C, Athanasou NA. (2010). The Pathobiology of Osteoarthritis. *Orthopaedics and Trauma*, 24(6):399–404. doi:10.1016/j.mporth.2010.09.001.
435. Swigart CR, Eaton RG, Glickel SZ, Johnson C. (1999). Splinting in the Treatment of Trapeziometacarpal Osteoarthritis: A Randomized Controlled Trial. *The Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 24(1):86–91. doi:10.1016/S0363-5023(99)90228-3.
436. Sze JH, Brownlie JC, Love CA. (2016). Biotechnological Advances in Cartilage Regeneration. *3 Biotech*, 6(1):52. doi:10.1007/s13205-016-0387-5.
437. Szwedowski D, Szczepanek J, Paczesny Ł, Zabrzyński J, Gagat M, Mobasheri A, Jeka S. (2021). The Effect of Platelet-Rich Plasma on the Intra-Articular Microenvironment in Knee Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11):5492. doi:10.3390/ijms22115492.
438. Taguchi R, Takasu J, Itani Y, Yamamoto R, Yokoyama K, Watanabe S, Masuda Y. (2001). Pericardial fat accumulation in men as a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 157(1):203-209.
439. Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*. 322(5901):583-6. Doi:10.1126/science.1156232
440. Taylor JR, McCormick CC. (1991). Radiological and Anatomical Correlation of the Ligamentum Flavum in Spinal Stenosis. *Neuroradiology*, 33(2):127–133. doi:10.1007/BF00588343.
441. Tenti S, Cheleschi S, Mondanelli N, Giannotti S, Fioravanti A. (2021). New trends in injection-based therapy for thumb-base osteoarthritis: Where are we and where are we going? *Frontiers in Pharmacology*, 12, 637904. doi.org/10.3389/fphar.2021.637904
442. To P, McClary KN, Sinclair MK, Stout BA, Foad M, Hiratzka S, Stern PJ. (2017). The accuracy of common hand injections with and without ultrasound: An anatomical study. *Hand (N Y)*, 12(6), 591-596. doi: 10.1177/1558944717692086

443. Tokunaga M, Sugihara F, Tsuda H, Yamamoto I, Maeda T. The role of extracellular matrix in differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes. *Matrix Biol.* 2014 Apr;34:243-51. doi: 10.1016/j.matbio.2014.02.001.
444. Toussiro E, Streit G, Wendling D. (2007). The Contribution of Adipose Tissue and Adipokines to Inflammation in Joint Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 14(10):1095–1100. doi:10.2174/092986707780362835.
445. Trayhurn P, Wood IS. (2004). Adipokines: Inflammation and the Pleiotropic Role of White Adipose Tissue. *British Journal of Nutrition*, 92(3):347–355. doi:10.1079/BJN20041213.
446. Trayhurn, P. (2005). Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 184(4), 285–293. doi:10.1111/j.1365-201X.2005.01468.x
447. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. (2016). Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells: State of the Art and Methods for Tissue Regeneration. *Methods Mol Biol.* 1416:283-299. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0_20.
448. Triche R, Mandelbaum BR. (2013). Pathophysiology and Treatment of Osteoarthritis: A Focus on the Knee and Ankle. *Foot & Ankle Clinics*, 18(3):467–474. doi:10.1016/j.fcl.2013.06.003.
449. 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. (2015). A New Medical Device Rigeneracons Allows to Obtain Viable Micro-Grafts From Mechanical Disaggregation of Human Tissues. *J Cell Physiol.* 230(10):2299–2303. doi:10.1002/jcp.24973127.
450. Trumbull A, Subramanian A, Yildirim-Ayan E. (2016). Mechanoresponsive Hydrogel Mimicking Native Tissue Promotes Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Eng Online.* 15:18. doi:10.1186/s12938-016-0147-2
451. Ueberreiter K, von Finckenstein JG, Cromme F, Herold C, Tanzella U, Vogt PM. (2010). [BEAULI™--a new and easy method for large-volume fat grafts]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 42(6):379-385. doi: 10.1055/s-0030-1267913. [Article in German].
452. Uson J, Rodriguez-Garcia SC, Castellanos-Moreira R, O'Neill TW, Doherty M, Boesen M, Pandit H, Parera IM, Verdanyan V, Terslev L, Kampen WU, D'Agostino MA, Berenbaum F, Nikiphorou E, Pitsillidou IA, de la Torre-Aboki J, Carmona L, Naredo E. (2021) EULAR recommendations for intra-articular therapies. *Ann Rheum Dis.* 80(10):1299-1305. doi:10.1136/annrheumdis-2021-220266.
453. Ussar S, Lee KY, Dankel SN, Boucher J, Haering MF, Kleinridders A, Thomou T, Xue R, Macotela Y, Cypress AM, Rosen ED, Kahn CR. (2014). ASC-1, PAT2, and P2RX5 are cell surface markers for white, beige, and brown adipocytes. *Sci Transl Med.* 6(247):247ra103. doi: 10.1126/scitranslmed.3008490.
454. Usulli FG, Grassi M, Maccario C, Vigano' M, Lanfranchi L, Alfieri Montrasio U, de Girolamo L. (2018). Intratendinous Intratendinous 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.* 26(7):2000-2010. doi: 10.1007/s00167-017-4479-9.
455. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. (2004). Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(9):1185–1191. doi:10.1084/jem.20040171.
456. Van Brenk B, Richards RR, Mackay MB, Boynton EL. (1998). A biomechanical assessment of ligaments preventing dorsoradial subluxation of the trapeziometacarpal joint. *J Hand Surg Am.* 23(4):607-11. doi: 10.1016/s0363-5023(98)80045-2
457. Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1500-1508. doi: 10.1056/NEJMoa0808718.
458. Van Royen K, Van Royen A, Vanmierlo B, Goorens CK, De Vos J, Goubau J. (2023). Radiological imaging of the trapeziometacarpal joint: a historical and clinical perspective. *J Hand Surg Eur Vol.*, 48(2), 90-100. doi: 10.1177/17531934221137979
459. Villafañe JH, Valdes K. (2014). Reliability of pinch strength testing in elderly subjects with unilateral thumb carpometacarpal osteoarthritis. *J Phys Ther Sci.* 26(7):993-5. doi: 10.1589/jpts.26.993
460. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerbäck S, Nuutila P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 360(15):1518-1525. doi: 10.1056/NEJMoa0808949.
461. Vuolteenaho K, Koshinen A, Moilanen E. (2014). Leptin-a link between obesity and osteoarthritis. Applications for prevention and treatment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 114(1):103-8. Doi:10.1111/bcpt.12160
462. Walocko FM, Toth BA, Donthireddy V. (2018). Adipose-Derived Stem Cells in Fat Grafting: Applications in Regenerative Medicine. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 79(5):1194–1204. doi:10.1016/j.jaad.2018.06.068.
463. Wang CT, Lin J, Chang CJ, Lin YT, Hou SM. (2006). Therapeutic Effects of Hyaluronic Acid on Osteoarthritis of the Knee: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9):863–870. doi:10.1016/j.joca.2006.03.005.
464. Wang X, Hunter DJ, Jin X, Ding C. (2018). The Importance of Physical Activity in the Prevention and Management of Osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 57(suppl_4)–iv62. doi:10.1093/rheumatology/key103.
465. Wehling P, Evans C, Wehling J, Maixner W. (2017). Effectiveness of intra-articular therapies in osteoarthritis: a literature review. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 9(8):183-196. Doi:10.1177/1759720X17712695
466. Weinstock-Zlotnick G, Siegel KR, Jacobs M. (2019). Functional Outcomes of Hand Therapy in Patients with Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis. *HSS Journal*, 15(3):287–293. doi:10.1007/s11420-019-09676-1.
467. Weiss S, LaStayo P, Mills A, Bramlet D. (2000). Prospective analysis of splinting the first carpometacarpal joint: an objective, subjective, and radiographic assessment. *Journal of Hand Therapy*, 13(3), 218-226. doi: 10.1016/s0894-1130(00)80005-8

468. Weiss S, Lastayo P, Mills A, Bramlet D. (2004). Splinting the degenerative basal joint: custom-made or prefabricated neoprene? *Journal of Hand Therapy*, 17(4), 401-406
469. Wenham CYJ, Grainger AJ. (2014). The Role of Imaging in Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(7):975-985. doi:10.1016/j.joca.2014.02.003.
470. Williams C, Wright LJ. (1999). The Role of Pharmacists in the Management of Osteoarthritis: A Review of Current Practice and Future Directions. *Journal of Pharmacy Practice*, 12(4):307-315. doi:10.1177/089719009901200405.
471. Wilson JN. (1973). Basal osteotomy of the first metacarpal in the treatment of arthritis of the carpometacarpal joint of the thumb. *British Journal of Surgery*, 60(11), 854-858. doi.org/10.1002/bjs.1800601106
472. Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. (2003). Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*. 48(2):418-429. doi: 10.1002/art.10767.
473. Winter R, Hasiba-Pappas SK, Tuca AC, Zrim R, Nischwitz S, Popp D, Lumenta DB, Girsch W, Kamolz LP. (2023). Autologous Fat and Platelet-Rich Plasma Injections in Trapeziometacarpal Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2023 Jan 1;151(1):119-131. doi: 10.1097/PRS.00000000000009789.
474. Wojciechowicz K, Gledhill K, Ambler CA, Manning CB, Jahoda CA. (2013). Development of the dermal adipose layer in embryonic mouse skin. *PLoS One*. 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0081787.
475. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. (2014). The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014:561459. doi:10.1155/2014/561459.
476. Wolf JM. (2009). The influence of ligamentous laxity and gender: implications for hand surgeons. *J Hand Surg Am.*, 34(1), 161-163. doi: 10.1016/j.jhsa.2008.09.012
477. Wong CW, Ho PC. (2017). Arthroscopic Management of Thumb Carpometacarpal Joint Arthritis. *Hand Clin*. 2017 Nov;33(4):795-812. doi: 10.1016/j.hcl.2017.07.007.
478. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016.
479. Wueest S, Item F, Lucchini FC, Challa TD, Müller W, Blüher M, Konrad D. (2016). Mesenteric Fat Lipolysis Mediates Obesity-Associated Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Diabetes*. 65(1):140-8. doi: 10.2337/db15-0941
480. Wyles CC, Houdek MT, Behfar A, Sierra RJ. (2019). Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: Current perspectives. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:231-241. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.083
481. Xu T, Yu X, Yang Q, Liu X, Fang J, Dai X. (2019). Autologous Micro-Fragmented Adipose Tissue as Stem Cell-Based Natural Scaffold for Cartilage Defect Repair. *Cell Transplantation*, 28(12):1709-1720. doi:10.1177/0963689719880527.
482. Yano K, Hata K, Matsumura S, Matsuda S, Mori M, Nishimoto Y, Ushio K, Takakura Y. (2018). Improved technique for selective cell retention in cartilage repair using mesenchymal stem cells." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 12(4). doi:10.1002/term.2575
483. Yao J, Park MJ. (2008). Arthroscopic Management of Thumb Basal Joint Arthritis. *Hand Clinics*, 24(3):261-270. doi:10.1016/j.hcl.2008.02.006.
484. Yeon B, Park MH, Lee B, Jeon SY, Jung HS, Shin H. (2013). Effect of three-dimensional microstructured hydrogels on the chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Biomacromolecules*. 14(10):3255-3265. doi: 10.1021/bm4009163.
485. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Koo HH. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*. 2009;259(2):150-156. doi: 10.1016/j.cellimm.2009.06.010.
486. Yu G, Floyd ZE, Wu X, Halvorsen YD, Gimble JM. (2011). Isolation of human adipose-derived stem cells from lipoaspirates. *Methods Mol Biol*. 702:17-27. doi: 10.1007/978-1-61737-960-4_2.
487. Yu G, Floyd ZE, Wu X, Halvorsen YD. (2011). Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, 702:193-200. doi:10.1007/978-1-60761-960-4_12.
488. Yusuf E, Kortekaas MC, Watt I, Huizinga TW, Kloppenburg M. (2016). Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis. *Current Treatment Options in Rheumatology*, 2(2):110-123. doi:10.1007/s40674-016-0044-7.
489. Zamperone A, Fiorucci G, Lombardi F, Costa A, Angelini C. (2013). Functional characterization of Sca-1+ adipose-derived stem cells: potential for regenerative applications. *Stem Cells Dev*. 15;22(18):2561-70. doi: 10.1089/scd.2012.0639.
490. Zancolli EA, Cozzi EP, Zancolli ER. (1987). Structural and Functional Anatomy of the Thumb. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 220:18-22. doi:10.1097/00003086-198704000-00003.
491. Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, Abatangelo G, Cortivo R. Extracellular matrix-enriched scaffolds for adipose stem cell expansion and differentiation. *Discovery Medicine*. 2010;10(52):85-90.
492. Zavan B, D'Agostino A, Bressan E, Vindigni V, Ferroni L, Gardin C, Bosco G, Trevisiol L, Ferraro C, Tatullo M, Pinton P, Stellini E, Piancino MG, Sivoletta S. (2013). Hyaluronic acid-based hydrogel containing platelet-rich plasma-derived bioactive molecules to foster regeneration of cartilage injuries. *PLoS One*. 8(5). doi:10.1371/journal.pone.0063741
493. Zavan B, Ferroni L, Giorgi C, Calò G, Brun P, Cortivo R, Abatangelo G, Pinton P. (2013) Hyaluronic acid induces activation of the κ -opioid receptor. *PLoS One*. 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0055510.

494. Zeira O, Asiag N, Aralla M, Ghezzi E, Pettinari L, Martinelli L, Felici M, Gallorini M, Scanu T, Ditunno P, Ventura A, Danielli B, Muccioli G, Perl S, Ventrella G, Maugeri M, Duchi S, Lucarelli E, Pinna S, Spaterna A, Simonazzi B, Patruno M. (2018). Autologous Micro-Fragmented Adipose Tissue for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. *Stem Cells Transl Med.* 7(4):409-418. doi: 10.1002/sctm.18-0005.
495. Zhang C, Xie Y, Luo X, Ji Q, Lu C, He C, et al. (2016). Effects of Therapeutic Ultrasound on Pain, Physical Functions and Safety Outcomes in Patients with Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Rehabilitation*, 30(10):960–971. doi:10.1177/0269215515519668.
496. Zhang Y, Jordan JM. (2010). Epidemiology of Osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine*, 26(3):355–369. doi:10.1016/j.cger.2010.03.001.
497. Zheng YH, Xiong W, Su K, Kuang SJ, Zhang ZG. (2013). Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Exp Ther Med.* 5(6):1576-1580. doi: 10.3892/etm.2013.1042.
498. Zhou S, Lu W, Chen L, Ge Z, Hu J, Shen Z. (2022). Advances in Understanding the Pathophysiology and Therapeutics of Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 40(1):7–16. doi:10.1002/jor.25061.
499. Zhu M, Cohen SR, Hicok KC, Yoshimura K, Mustoe TA, Gooch RL. (2013). Comparison of Three Different Fat Grafting Techniques: Cell-Assisted Lipotransfer, Pure Graft, and Stromal Vascular Fraction-Enhanced Fat Graft. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 131(4):873–880. doi:10.1097/PRS.0b013e3182818ea0
500. Zhu X, Sang L, Wu D, Rong J. (2020). Correlation between subchondral bone changes and cartilage degeneration in osteoarthritis: A micro-CT study. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8:548. doi:10.3389/fcell.2020.00548.
501. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. (2008). Adipose-Derived Stem Cell: A Better Stem Cell Than BMSC. *Cell Biochem Funct.* 26(6):664-675. doi:10.1002/cbf.1488
502. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. (2013). Mesenchymal Stem Cell Identity: A Complex Matter. *Cytherapy*. 2013;15(2):166–172. doi:10.1016/j.jcyt.2012.11.005
503. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001). Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, 7(2):211–228. doi:10.1089/107632701300062859.
504. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. (2018). Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell Metab.* 2018;27(1):68-83. doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.002.