

[Digitare il testo]

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

**Dipartimento Clinico Veterinario**

**Direttore: Chiar.mo Prof. Gaetano Mari**

**Dottorato di Ricerca in**

**“Clinica e Terapia d’Urgenza Veterinaria”**

**XXI Ciclo**

**Settore Scientifico Disciplinare: Clinica Ostetrica e Ginecologia  
Veterinaria-VET 10**

## **IMPIEGO DI CELLULE STAMINALI IN TERAPIA VETERINARIA**

**Presentata da: Dott.ssa Eleonora Iacono**

**Coordinatore Dottorato:**

**Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Gaetano Mari**

**Esame Finale Anno 2010**

---

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	7
<b>PARTE GENERALE</b>	
<b>1. LE CELLULE STAMINALI</b>	9
<b>1.1 Definizione e classificazione</b>	9
<b>1.2 Staminalità e caratteristiche fondamentali di una cellula staminale</b>	10
1.2.1 Determinazione mediante differenziazione	12
1.2.2 Determinazione mediante antigeni di superficie	14
1.2.3 Determinazione mediante espressione genica e proteica	17
<b>1.3 Cellule staminali embrionali</b>	18
<b>1.4 Cellule staminali adulte</b>	24
<b>2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI</b>	29
<b>2.1 Generalità</b>	29
<b>2.2 Cellule staminali mesenchimali da tessuti adulti</b>	36
2.2.1 Midollo Osseo	36
2.2.2 Tessuto Adiposo	44
2.2.3 Sangue periferico	48
<b>2.3 Cellule staminali mesenchimali da tessuti extra-embryonali</b>	52
2.3.1 Sangue cordonale	52
2.3.2 Gelatina di Wharton	55
2.3.3 Liquido Amniotico e Invogli Fetali	60
<b>3. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE IN MEDICINA VETERINARIA</b>	69

## PARTE SPECIALE

<b>1. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAMENTO, CARATTERIZZAZIONE E APPLICAZIONI CLINICHE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ISOLATE DA TESSUTO ADIPOSO E MIDOLLO OSSEO NELLA SPECIE EQUINA</b>	<b>82</b>
<b>1.1 Materiali e Metodi</b>	<b>82</b>
1.1.1 Prelievo dei campioni e isolamento delle cellule	82
<i>1.1.1.1 Tessuto Adiposo</i>	82
<i>1.1.1.2 Midollo Osseo</i>	84
1.1.2 Espansione cellulare in vitro	85
1.1.3 Differenziazione in vitro	86
<i>1.1.3.1 Differenziazione Condrogenica</i>	86
<i>1.1.3.2 Differenziazione Osteogenica</i>	87
<i>1.1.3.3 Differenziazione Adipogenica</i>	88
1.1.4 Caratterizzazione molecolare	89
<b>1.2 Applicazioni Cliniche</b>	<b>89</b>
<b>1.3 Risultati</b>	<b>105</b>
1.3.1 Isolamento, differenziazione, caratterizzazione	105
1.3.2 Applicazioni Cliniche	116
<b>1.4 Discussioni</b>	<b>125</b>
<b>1.5 Conclusioni</b>	<b>129</b>

<b>2. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAZIONE, CARATTERIZZAZIONE E</b>	
<b>APPLICAZIONI CLINICHE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA</b>	
<b>SANGUE CORDONALE, GELATINA DI WHARTON E LIQUIDO AMNIOTICO</b>	
<b>NELLA SPECIE EQUINA</b>	<b>130</b>
<b>2.1 Materiali e Metodi</b>	<b>130</b>
2.1.1 Prelievo dei campioni e isolamento delle cellule	130
2.1.1.1 <i>Liquido Amniotico</i>	130
2.1.1.2 <i>Sangue Cordonale</i>	131
2.1.1.3 <i>Gelatina di Wharton</i>	132
2.1.2 Espansione cellulare in vitro	134
2.1.3 Differenziazione in vitro	135
2.1.3.1 <i>Differenziazione Condrogenica</i>	135
2.1.3.2 <i>Differenziazione Osteogenica</i>	136
2.1.3.3 <i>Differenziazione Adipogenica</i>	136
2.1.4 Caratterizzazione molecolare	137
<b>2.2 Applicazioni Cliniche</b>	<b>138</b>
<b>2.3 Risultati</b>	<b>145</b>
2.3.1 Isolamento, differenziazione e caratterizzazione	145
2.3.2 Applicazioni Cliniche	161
<b>2.4 Discussioni</b>	<b>166</b>
<b>2.5 Conclusioni</b>	<b>177</b>

<b>3. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ISOLATE DA LIQUIDI FETALI, INVOGLI FETALI ED ENDOMETRIO NELLA SPECIE FELINA</b>	<b>178</b>
<b>3.1 Materiali e Metodi</b>	<b>178</b>
3.1.1 Prelievo dei campioni e isolamento delle cellule	178
3.1.2 Espansione cellulare in vitro	180
3.1.3 Differenziazione in vitro	181
3.1.3.1 <i>Differenziazione Condrogenica</i>	181
3.1.3.2 <i>Differenziazione Osteogenica</i>	182
3.1.3.3 <i>Differenziazione Adipogenica</i>	183
3.1.4 Caratterizzazione molecolare	183
<b>3.2 Risultati</b>	<b>184</b>
<b>3.3 Discussioni</b>	<b>197</b>
<b>3.4 Conclusioni</b>	<b>200</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>202</b>

## **ABBREVIAZIONI**

AECs= Amniotic Epithelial Cells (Cellule Epiteliali Amniotiche)

AFSCs= Amniotic Fluid Stem Cells (Cellule staminali da liquido amniotico)

AMSCs=Amniotic Mesenchymal Stem Cells (Cellule Staminali Mesenchimali da membrana amniotica)

ANOVA= Analisi di Varianza

APC= Antigen-Presenting Cell (Antigene cellulare)

APGAR= Appearance (Colore delle mucose), Pulse (Frequenza Cardiaca), Grimace (Presenza dei riflessi), Activity (Tono Muscolare), Respiration (Frequenza Respiratoria).

ASCs = Adult Stem Cells (Cellule Staminali Adulte)

BMMSCs= Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (Cellule staminali mesenchimali da midollo osseo)

CD= Cluster of Differentiation molecule (Molecole di differenziazione cellular)

CD= Cell Doubling (numero di duplicazioni cellulari)

CMSCs= Chorion Mesenchymal Stem Cells (Cellule staminali mesenchimali da corion)

CT= Culture Time (tempo di coltura cellulare)

DMEM= Dulbecco's Modified Essential Medium (Medium Essenziale Modificato secondo Dulbecco)

DT= Doubling Time (tempo di duplicazione cellulare)

EDTA= EthyleneDiaminoTetracetic Acid (Acido EtilenDiaminoTetracetico)

EGCs= Embryo Germinal Cells (Cellule Germinali Embrionali)

ESCs= Embryo Stem Cells (Cellule Staminali Embrionali)

FACS= Fluorescece-Activated Cell Sorting (separazione cellule attivate con fluorescenza)

FBS = Fetal Bovine Serum (siero fetale bovino)

FITC= Fluorescein IsoThioCyanate (Fluoresceina IsoTioCianato)

G= Gauge

g=Gravity (accelerazione di gravità)

GFP=Green Fluorescent Protein (Proteine Fluorescenti Verdi)

GVHD= Graft Versus Host Disease (Malattia del trapianto contro l'ospite)

HLA= Human Leukocyte Antigen (antigene leucocitario umano)

HSCs= Hemopoietic Stem Cells (Cellule Staminali Emopoietiche)

hTGF- $\beta$ 1= human Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (Fattore di crescita trasformante umano)

ICM=Inner Cell Mass (Massa Cellulare Interna)

ITS = Insulina-Transferrina-Selenio

LA=Liquido Amniotico

MSCs= Mesenchymal Stem Cells (Cellule Staminali Mesenchimali)

$N_f$  = numero finale di cellule

$N_i$  = numero iniziale di cellule

Oct-4= Octamer-4

PBMSCs= Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells (Cellule staminali mesenchimali isolate da sangue periferico)

PBS = Phosphate Buffered Solution (Soluzione salina tamponata)

PCR = Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della polimerasi)

PRP=Platelet Reached Plasma (Plasma arricchito con piastrine)

Rpm= Rotazioni per minuto

SSEA= Stage Specific Embryonic Antigen (antigene embrionale stadio-specifico)

TCM199 = Tissue Culture Medium 199 (terreno per coltura tissutale 199)

VEGF=Vascular Endothelial Growth Factor (fattore di crescita vascolare endoteliale)

## INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio la ricerca sulle cellule staminali è divenuta un'area di grande interesse data la potenziale applicazione in medicina rigenerativa. La possibilità di riparare organi danneggiati o di creare *in vitro* tessuti da trapiantare è oggi ormai una realtà. La cura della salute degli animali domestici, come cavallo, cane e gatto, e i relativi prodotti utilizzati per preservarne la salute e la longevità, hanno un forte impatto economico in tutto il mondo. In particolare l'industria equina frutta ogni anno 300 bilioni di dollari in tutto il mondo (Grahaman 2003). Nonostante gli ingenti incassi, ogni anno vengono spesi nel mondo circa 6.5 bilioni di dollari a seguito di traumi e malattie di questi animali (Graham 2003). Oltre il 5% dei cavalli da corsa va incontro a lesioni tendinee e legamentose durante la propria carriera sportiva e solo il 25-50% di questi può essere nuovamente utilizzato dopo tali danni (Perkins 2005). Anche animali da compagnia come cani e gatti hanno un grosso impatto economico, e ancor più affettivo. Per questi motivi la medicina rigenerativa sta suscitando un sempre maggiore interesse anche in ambito veterinario, in particolare perché, rispetto alle metodiche tradizionali, garantirebbe un minor periodo di ricovero e una maggior possibilità di recupero, portando a benefici maggiori sia per l'animale che per l'economia (Tayfur Tecirlioglu 2007). Patologie croniche, neoplasie e lesioni sono spesso di grave entità negli animali da compagnia ed in particolare in soggetti anziani, i cui proprietari sempre più spesso richiedono nuovi e più sofisticati trattamenti e strategie di prevenzione. Tali patologie, così come patologie ereditarie o spontanee trovano riscontro anche nell'uomo: per esempio sono circa 95 le patologie genetiche nell'equino, 220 nel cane e 137 nel gatto che hanno un'elevata analogia con patologie genetiche umane (Online Mendelian Inheritance in Animals 2007). Gli animali domestici, sono quindi modelli eccellenti per lo studio e l'applicazione della medicina rigenerativa alla prevenzione e cura



di patologie umane, molto più di quanto non lo sia il topo, utilizzato fino ad ora. In particolare il cane può essere preso quale modello nello studio di patologie cardiache (Vela et al 2009) o spinali (Hiyama et al 2008); il gatto invece può essere utilizzato per lo studio di patologie virali o ereditarie (Martin et al., 2002) mentre il cavallo è il miglior modello per patologie muscolo-scheletriche, quali osteoartriti che si verificano spesso sia nella specie equina che umana (Frisbie e McIlwraith 2000; Koch e Betts 2007).

Le fonti di cellule staminali più utilizzate fino a questo momento, in queste specie, sono rappresentate dal tessuto adiposo e dal midollo osseo. Entrambe, però, presentano diversi inconvenienti che potrebbero essere superati recuperando cellule staminali dai così detti “tessuti di scarto”, ovvero quelli che non comportano un prelievo dall’animale *in vivo*, evitando in tal modo procedure invasive sugli animali.

In questo studio sono stati messi a punto protocolli di isolamento di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo, tessuto adiposo, da sangue cordonale, gelatina di Wharton e liquido amniotico nella specie equina. Nella specie felina è invece stato messo a punto un protocollo di isolamento di cellule staminali mesenchimali da liquidi ed invogli fetali. Per tutte le linee cellulari studiate si è provveduto a verificarne la capacità differenziativa in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico e si è provveduto alla caratterizzazione molecolare. Le cellule isolate da midollo osseo e tessuto adiposo sono state utilizzate per il trattamento di lesioni tendine in cavalli sportivi, mentre le cellule isolate da liquido amniotico di cavallo sono state impiegate per il trattamento di piaghe cutanee in un puledro setticemico.

## PARTE GENERALE

### 1. LE CELLULE STAMINALI

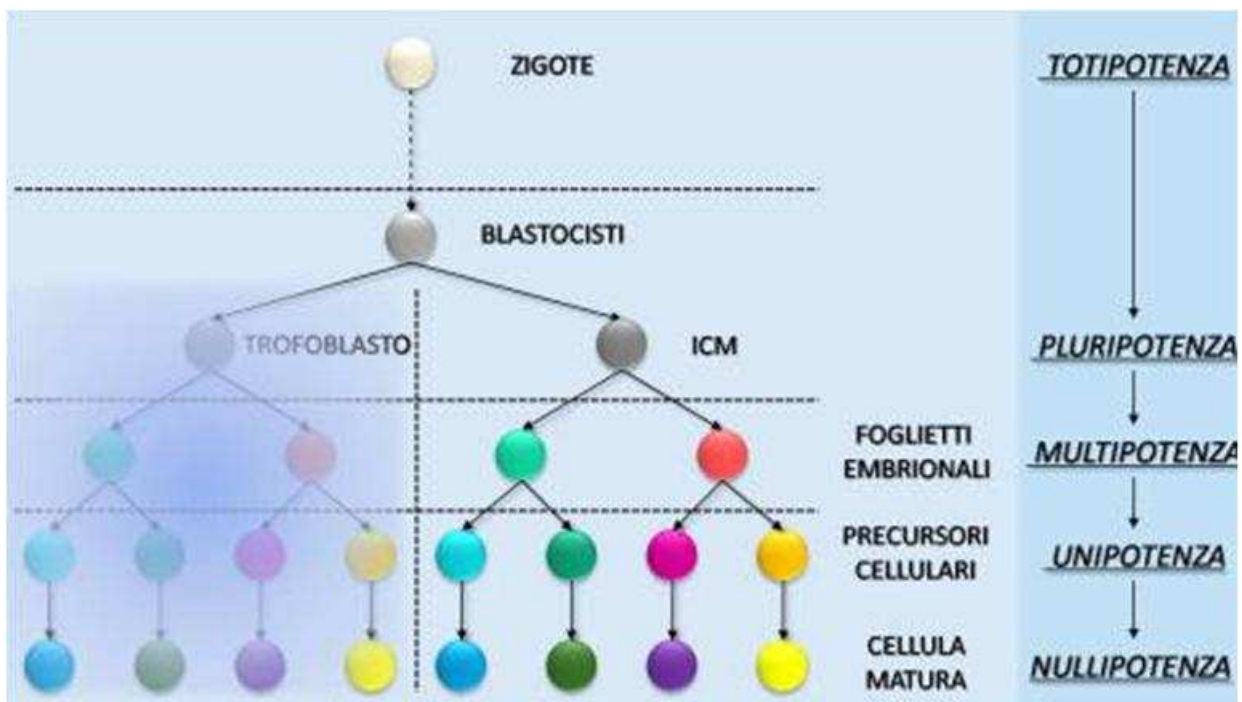
#### 1.1 Definizione e classificazione

Il termine di cellula staminale fu coniato per la prima volta nel diciannovesimo secolo da Edmund Beecher Wilson che utilizzò tale termine quale sinonimo di cellula germinale primordiale mitoticamente quiescente (Wilson 1896). Nel 2000, Gheron e Robey e Watt et al definirono le cellule staminali quali cellule immature o non differenziate clonogeniche, ovvero in grado di produrre identiche cellule figlie. L'auto-rinnovamento di queste cellule può perpetuarsi infinitamente oppure per un periodo di tempo limitato (Weissman 2000), risultando in una notevole amplificazione del numero di cellule staminali. Caratteristica peculiare della cellula staminale è la divisione ineguale, che consiste nella formazione di cellule figlie, di cui una sarà cellula staminale e una, progredendo nel processo di sviluppo, sarà precursore e perderà progressivamente la capacità di proliferare (Cedar et al 2007). Questa cellula può moltiplicarsi e differenziarsi in fenotipi cellulari che a loro volta danno origine ad una progenie con diminuito potenziale differenziativo, fino alla formazione di cellule differenziate mature (Baksh et al 2004; Ryan et al 2005; Weissman 2000).

In cima alla piramide delle cellule staminali ci sono lo zigote e i discendenti delle prime tre divisioni cellulari. Queste cellule sono così dette *totipotenti*, perché in grado di formare un intero individuo e i trofoblasti della placenta (Alison et al 2002; Fortier 2005; Lee e Hui 2006). Dopo circa quattro giorni, allo stadio embrionale di otto cellule, i singoli blastomeri riducono il proprio potenziale differenziativo, iniziano a formare la

blastocisti caratterizzata da un accumulo di cellule chiamato embrioblasto o inner cell mass (ICM), cellule da cui si sviluppa l'embrione. Le cellule dell'embrioblasto sono considerate cellule *pluripotenti*, ovvero cellule in grado di dare origine a quasi tutte le linee cellulari dei tre foglietti germinali, ma che non possono formare un embrione in toto poiché non sono in grado di dare origine a placenta e tessuti di supporto (Conley et al 2004).

Molti tessuti adulti hanno invece al loro interno cellule staminali *multipotenti*, ovvero cellule in grado di produrre un numero limitato di linee cellulari, appropriate alla loro collocazione (Lee e Hui 2006). Alla base della piramide si trovano invece le cellule staminali *unipotenti*, cellule in grado di generare solo una specifica linea cellulare e la cellula matura che ne deriva è definita *nullipotente* (Cedar et al 2007).



**Fig.1.:**Classificazione delle cellule staminali in base al loro potenziale differenziativo (Gianaroli et al 2009)

## 1.2 Staminalità e caratteristiche fondamentali di una cellula staminale

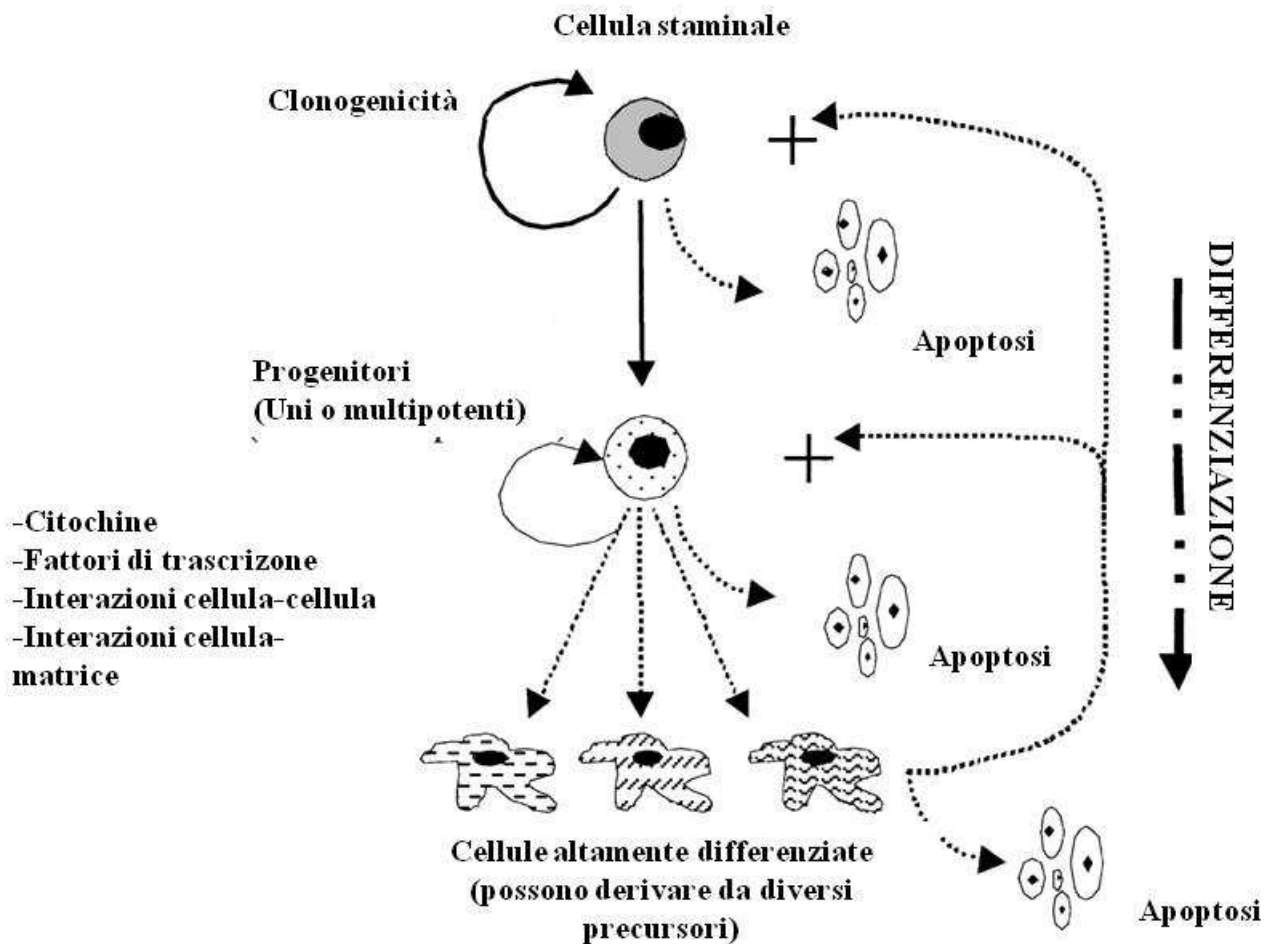
La definizione di cellula staminale e staminalità è in costante evoluzione; le principali caratteristiche di una cellula staminale possono però essere così riassunte:

1. Le cellule staminali sono cellule in grado di auto-mantenersi dando origine, ad ogni divisione cellulare, ad una cellula staminale e un precursore cellulare (Cedar et al 2007) (Fig.2). Come riportato precedentemente, sono cellule clonogeniche e in grado di andare incontro a differenziazione in una o più linee cellulari (plasticità);

2. Le cellule staminali si trovano in microambienti, nicchie (niches), che, attraverso la presenza di citochine e fattori di trascrizione, interazioni cellula-cellula e cellula-matrice ne impediscono l'eccessiva proliferazione e la trasformazione in cellule cancerogene. Grazie ai microambienti viene inoltre controllata la produzione di cellule progenitrici e stimolata la riparazione tissutale quando necessaria (Moore e Lemischka 2006) (Fig.2). Al momento si presume che la niche staminale sia presente in diversi tessuti tra cui il midollo osseo, cervello, fegato, epidermide, muscolo scheletrico, tratto gastrointestinale, pancreas, occhi, sangue e polpa dentale, mentre sembrano essere assenti nel tessuto cardiaco (Hipp et al 2008);

3. Le cellule staminali costituiscono una minima percentuale delle cellule di un organismo. Per esempio Bjerknes e Cheng (1999) dimostrarono che nel piccolo intestino di topo sono 4-5 le cellule staminali presenti in un anello vicino alla base della cripta. Allo stesso modo, nel muscolo scheletrico sono circa il 5%, mentre nel midollo osseo la percentuale è dello 0.001-0.01% sul totale di cellule mononucleate isolate mediante gradiente di Ficoll (Pittenger et al 1999; Martin et al 2002);

4. Le cellule staminali hanno un ciclo cellulare lento, ma sono altamente clonogeniche, come dimostrato da Wright (2000) relativamente alle cellule staminali intestinali.



**Fig.2:** Panoramica semplificata del destino della cellula staminale. (Vats et al 2002)

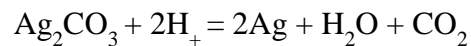
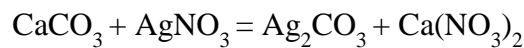
La staminalità può essere determinata tramite differenziazione in vitro, determinazione di antigeni di superficie, determinazione dell'espressione genica e proteica.

### 1.2.1 Determinazione mediante differenziazione

La possibilità differenziativa delle cellule staminali è stata ampiamente studiata in vitro e la maggior parte degli Autori considera dimostrata la staminalità di una linea cellulare qualora vada incontro alla differenziazione in almeno tre differenti tipi cellulari: osteociti, condrociti e adipociti.

La differenziazione in senso osteogenico viene stimolata dall'aggiunta al medium di coltura 0.1  $\mu\text{M}$  di desametazone, 50  $\mu\text{M}$  di acido ascorbico (Mizuno e Hyakusoku, 2003).

L'avvenuta differenziazione può essere dimostrata mediante quantificazione dell'espressione del gene Runx2, gene che regola l'osteogenesi, oppure istologicamente può essere valutato l'incremento della attività della fosfatasi alcalina o l'aumentato deposito di sali di calcio mediante colorazione di Von Kossa o Alizarin Red (Pittinger et al 1999). Alla base della prima colorazione vi è una reazione di sostituzione. Le cellule vengono trattate con una soluzione di nitrato d'argento; l'argento cationico presente in soluzione si sostituisce al calcio nel sale originario formando un sale d'argento che viene evidenziato riducendo l'argento ione ad argento metallico. La reazione è la seguente:

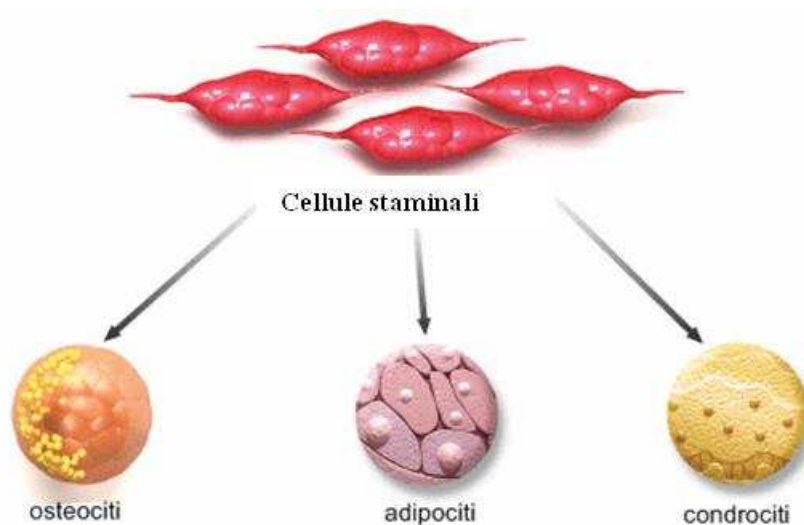


I sali di calcio in grado di reagire con il nitrato d'argento sono: il carbonato, il fosfato, l'ossalato, il solfato, l'urato, il cloruro, il solfocianuro. Poichè il calcio è presente nei tessuti dei mammiferi essenzialmente sotto forma di calcio carbonato e fosfato il metodo è da considerarsi idoneo a rilevarne la presenza anche in cellule staminali sottoposte a differenziazione osteogenica. I depositi di calcio sono evidenziati dal colore nero. L'Alizarin Red, antrachinone derivato, forma con il calcio un complesso mediante processo di chelazione, dando una colorazione bi-rifrangente. Tale molecola però può andare incontro a reazione anche con magnesio, manganese, bario, stronzio e ferro, presenti però solitamente in concentrazioni insufficienti per creare artefatti.

La differenziazione in senso condrogenico viene solitamente effettuata in pellet, con medium addizionato con 6.25 µg/ml di insulina, 50 nM di acido ascorbico, 0.1 µM di desametazone, 10 ng/ml hTGF-β1 e 1% FBS (Mizuno e Hyakusoku, 2003). L'avvenuta differenziazione può essere valutata mediante determinazione dell'espressione del gene SOX9 oppure mediante istologia con colorazione Alcian Blu o Safranin O (Chang et al 2006). L'Alcian blue, gruppo di coloranti basici polivalenti, in soluzione di acido acetico

al 3% (pH 2,5), colora sia i mucopolisaccaridi acidi solfati che carbossilati (glicosamminoglicani) e le sialomucine solfate e carbossilate (glicoproteine); probabilmente forma legami salini con il gruppo acido dei mucopolisaccaridi acidi. Il colore blu è dovuto alla presenza di rame nella molecola. La colorazione con Safranin O, invece, colora da arancione a rosso mucine e glicosaminoglicani.

La differenziazione adipocitica viene invece indotta mediante aggiunta al medium di coltura di siero di coniglio al 15%, 1  $\mu$ M di desametazone, 0.5 mM di isobutilmetilxantina, 10 mM di insulina, 0.2 mM di indometacina, (Mizuno e Hyakusoku 2003; Koch et al 2007). Per determinare l'effettiva differenziazione in senso adipogenico delle cellule può essere utilizzata la determinazione del gene PPAR $\gamma$ , oppure può essere impiegata la colorazione Oil Red O che, basandosi sulla maggiore solubilità del colorante in sostanze lipidiche che in solventi, colora in rosso i depositi lipidici.



**Fig.3:** Differenziazione cellulare. Modificato da [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)

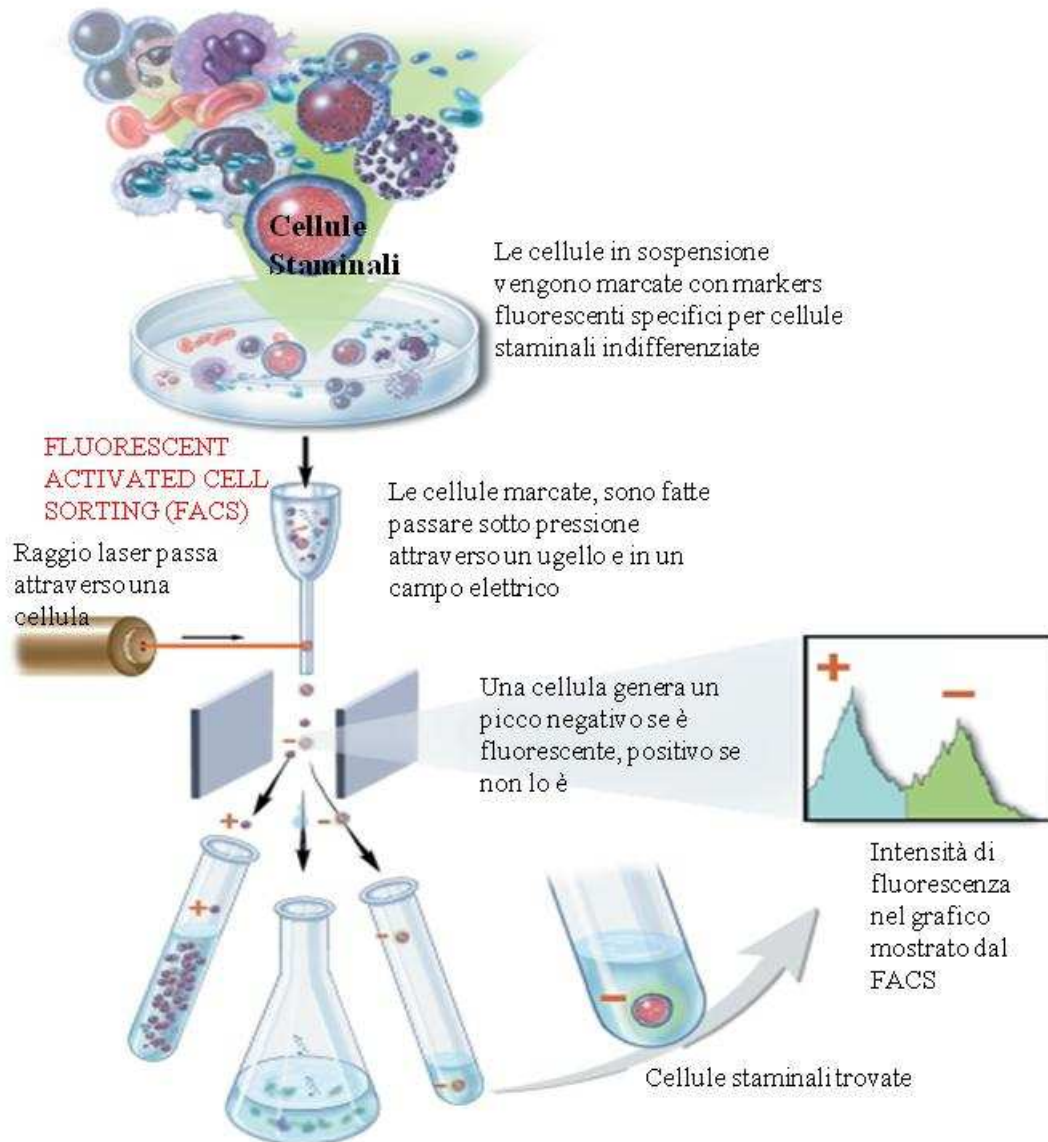
### 1.2.2 Determinazione mediante antigeni di superficie

Tutte le cellule di un organismo sono caratterizzate dalla presenza sulla loro superficie di proteine specializzate, dette recettori, in grado di legare o aderire ad altre molecole di segnale. Esistono numerosi recettori differenti per struttura e per i tipi di

molecole a cui si vanno a legare. Solitamente le cellule utilizzano tali proteine di superficie per comunicare con altre cellule adiacenti ed esplicare le loro proprie funzioni nell'organismo. Gli stessi recettori di superficie sono presenti sulle cellule staminali; tali recettori sono stati denominati in base alle molecole con cui entrano in legame e sono spesso utilizzati per indicare uno specifico tipo di cellula staminale (Jackson et al 2001).

Da diversi anni è stato sviluppato un metodo di determinazione di tali recettori che prevede il legame di questi con molecole fluorescenti qualora vengano attivate da un raggio laser. Oggi i ricercatori hanno a disposizione numerosi markers che emettono luci differenti per colore ed intensità. Una delle metodiche maggiormente impiegate per la lettura di tali emissioni prevede l'impiego di un citofluorimetro ed è detta *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)* (Bonner et al 1972; Herzenberg e De Rosa 2000) (Fig.4). I ricercatori utilizzano spesso tale metodica per separare le cellule staminali da un pool di cellule e per confermarne la staminalità. Ad oggi sono pochi i markers disponibili per cellule di origine animale perciò nella maggior parte dei casi vengono impiegati markers umani che potrebbero però falsare una eventuale negatività a causa di una mancata cross reazione.





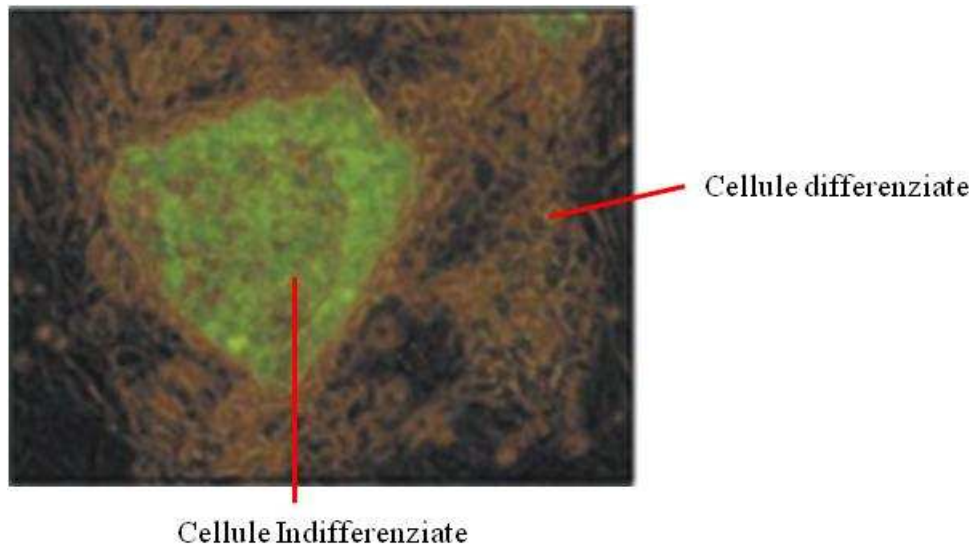
**Fig.4:** Descrizione della metodica Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS).  
Modificato da <http://stemcells.nih.gov>

Una seconda metodica invece consiste nel visualizzare l'emissione di luce fluorescente al microscopio. Tale tecnica è utilizzata soprattutto per identificare la presenza di cellule staminali all'interno dei tessuti e prevede la preparazione di una sottile porzione di tessuto e la marcatura delle cellule con markers fluorescenti che una volta attivati da speciali fasci di luce e da reazioni chimiche emetteranno luci visibili al microscopio.

### 1.2.3 Determinazione mediante espressione genica e proteica

Tecniche genetiche e biologiche vengono ampiamente utilizzate per studiare come una cellula all'interno dell'organismo si specializzi. Per questo i ricercatori hanno identificato geni e fattori di trascrizione (proteine che si trovano all'interno della cellula e regolano l'attività genica) che sono specifici delle cellule staminali. La tecnica maggiormente impiegata è la reazione di polimerizzazione a catena (*Polymerase chain reaction, PCR*); grazie a questa è possibile determinare la presenza di uno specifico gene che è attivo e gioca un importante ruolo nel guidare la differenziazione cellulare. Negli ultimi anni anche in medicina veterinaria questa tecnica di determinazione della staminalità sta assumendo sempre maggiore importanza (Taylor et al 2007).

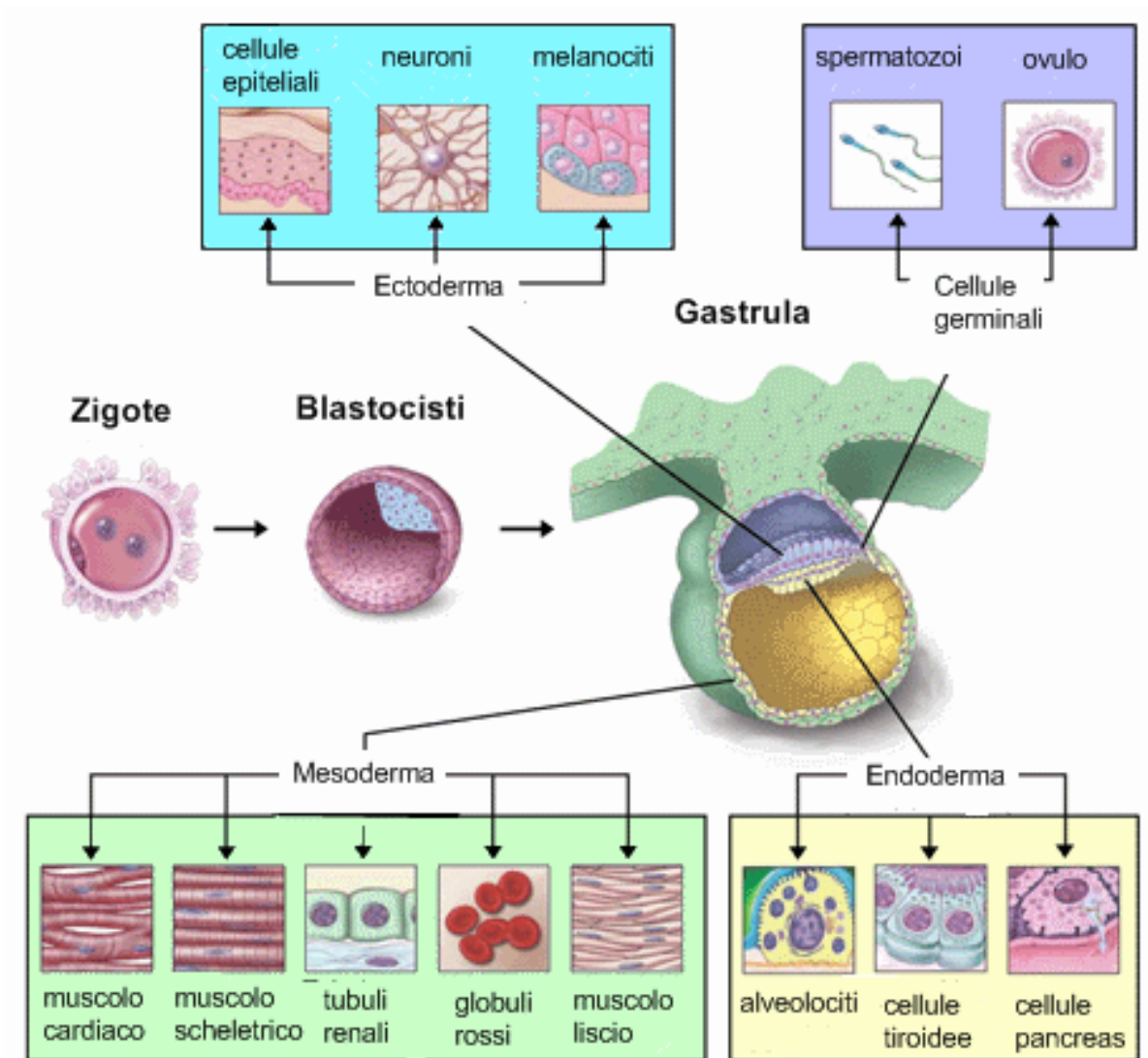
Recentemente i ricercatori hanno applicato all'ingegneria genetica l'utilizzo della fluorescenza, inserendo all'interno di cellule staminali geni chiamati proteine fluorescenti verdi (*Green Fluorescent Protein*) o GFP (Eiges et al 2001). Tali geni si attivano solo quando la cellula è indifferenziata, mentre si inattivano una volta verificatasi la differenziazione. Una volta attivati i geni indirizzano la cellula staminale verso la produzione di una proteina fluorescente di colore verde (Fig.5). L'importanza di questa metodica è dovuta al fatto che grazie ad essa è possibile verificare l'avvenuta differenziazione di cellule staminali una volta impiantate *in vivo* in tessuti danneggiati.



**Fig.5:** Cellule staminali trattate con GFP. Modificato da <http://stemcells.nih.gov>.

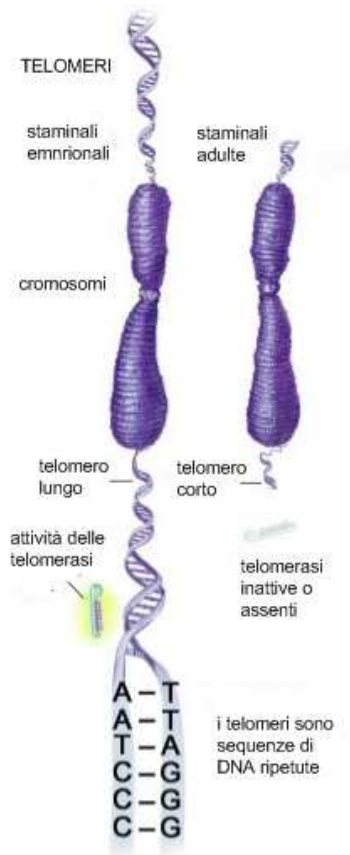
### 1.3 Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (ESCs) vengono isolate da embrioni allo stadio di blastocisti (Martin GR 1981; Thomson 1998); in particolare è l'embrioblasto ad essere ricco di cellule staminali, mentre il trofoblasto che lo circonda è in grado di portare alla formazione dei soli annessi embrionali. Cellule staminali embrionali sono anche state isolate con successo dalle gonadi di feti di 5-10 settimane e sono state denominate cellule embrionali germinali (EGCs); con il progredire dello sviluppo tali cellule porteranno allo sviluppo di oociti e spermatozoi (Matsui et al 1992). Le ESCs e EGCs sono cellule pluripotenti in grado di generare *in vivo* e *in vitro* tutte le linee cellulari fetali ed adulte (Wiles e Johansson 1999) (Fig.6).



**Fig.6:** Origine e possibile sviluppo di cellule staminali embrionali.  
Modificato da <http://stemcells.nih.gov>

Le ESCs sono in grado di andare in contro in vitro fino a 300 duplicazioni, mentre le EGCs possono proliferare solo per 80 duplicazioni (Thomson et al 1998). Tale differenza sembra essere imputabile ad alti livelli dell'attività telomerica che persiste nelle ESCs (Odorico et al 2001). I telomeri sono regioni non codificanti che costituiscono l'estremità dei cromosomi lineari eucarioti, contenenti una sequenza ripetuta centinaia di volte (es. nei mammiferi è AGGGT). L'enzima telomerasi ha la funzione di aggiungere sequenze di basi all'estremità dei cromosomi, impedendo così il loro progressivo accorciamento man mano che la cellula va in contro a divisione (Wright e Shay 2002).



**Fig.7:** Telomeri. Modificato da <http://stemcells.nih.gov>

Negli animali la telomerasi è un enzima altamente regolato, la cui massima attività si registra appunto nelle prime fasi dello sviluppo e va poi scemando con la senescenza.

Oltre che dalla dimostrazione della pluripotenzialità e capacità replicativa pressoché infinita, le cellule staminali embrionali sono state caratterizzate utilizzando specifici markers di superficie e molecolari (Tab.1).

Nome del Marker	Significato
Fosfatasi alcalina	L'elevata espressione di questo enzima è associata a cellule indifferenziate pluripotenti
Cluster Designation-30 (CD30)	Recettore di superficie specifico di cellule staminali pluripotenti
Cripto (TDGF-1)	Gene che regola la produzione di fattori di crescita in ESCs, ectoderma primitivo e cardiomiociti
GCTM-2	Anticorpo verso matrice extracellulare specifica
Genesis	Fattore di trascrizione espresso unicamente da ESCs pluripotenti
Germ cell nuclear factor	Fattore di trascrizione espresso unicamente da ESCs pluripotenti
Octamer-binding protein (Oct-4)	Fattore di trascrizione necessario per mantenere lo stato di pluripotenzialità
Stage-specific embryonic antigen-3 e 4 (SSEA-3; SSEA-4)	Glicoproteine espresso dagli embrioni a stadi precoci e cellule pluripotenti
Stem cell factor (SCF or c-Kit ligand)	Proteina di membrane che migliora la proliferazione cellulare; lega il recettore c-Kit
Telomerasi	Enzima unicamente associato ad immortalità cellulare
Trafalgar (TRA)-1-60 e 1-81	Anticorpi verso matrice extracellulare specifica
Nanog	Fattore di trascrizione espresso unicamente da ESCs pluripotenti

**Tab.1:** Markers cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali solitamente necessitano per la loro coltura in vitro di uno strato di fibroblasti così detto *feeder layer*, derivanti per lo più da embrioni di topo e irradiati o chimicamente inattivati prima del loro utilizzo in modo tale che non possano replicare, ma possano produrre proteine e fattori di crescita non ancora ben determinati, fondamentali per mantenere le ESCs vive ed in uno stato indifferenziato quasi infinitamente (Wiles e Johansson 1999). In assenza di *feeder layer*, le cellule staminali embrionali spontaneamente formano aggregati detti corpi embrioidi che contengono cellule differenziate di ectoderma, endoderma e mesoderma (Wiles e Johansson 1999).

Attualmente l'interesse dei ricercatori è rivolto alla messa a punto di sistemi di coltura che non richiedano l'utilizzo di fibroblasti di topo, i quali non solo richiedono dispendio energetico ed economico, ma comportano anche eventuali rischi infettivi. Una valida alternativa sembrano essere la placenta o substrati di collagene, laminina o fibronectina con vari terreni colturali (Miyamoto et al 2004; Amit et al 2004). In ogni caso la coltura viene prima intrapresa su *feeder layer*, poi le cellule vengono espanse in terreni di coltura senza fibroblasti.

Le cellule staminali embrionali sono state fonti di notevole interesse clinico data la loro potenzialità replicativa e differenziativa che equivale alla disponibilità potenziale di tutti i tipi cellulari nelle quantità desiderate (Gianaroli L et al 2009). Tuttavia in medicina la loro applicazione è pressoché stata accantonata non solo a seguito delle ripercussioni etiche che accompagnano l'impiego di tali cellule, ma anche a seguito dei diversi svantaggi ad esse legati:

- Impiego, come *gold standard* di coltura di fibroblasti animali e il conseguente rischio di contaminazioni con elementi non-umani;
- Rischio di sviluppo di teratocitomi nel caso in cui la popolazione cellulare trapiantata non sia completamente priva di ESCs allo stato indifferenziato;
- Instabilità epigenetica delle cellule differenziate in vitro;
- Rischio di rigetto delle cellule trapiantate, potenzialmente risolvibile mediante trasferimento nucleare (Gianaroli et 2009).

Mentre cellule staminali embrionali di topo e uomo sono state isolate fin dai primi anni '80, negli animali domestici, come cavallo, bovino, cane e gatto i primi lavori di isolamento di tali cellule risalgono a circa 10 anni fa ed ancora oggi, nonostante l'aumentato interesse, risulta difficoltoso, a causa soprattutto delle difficoltà riscontrate nell'approvvigionamento di oociti, qualitativamente idonei per la produzione embrionale in

vitro, e di embrioni (Tecirlioglu et al 2007). Nella specie equina, Saito et al isolarono per primi nel 2002 cellule staminali embrionali dall'ICM di quattro ponies di razza Hokkaido. Le cellule vennero mantenute in vitro su feeder-layer di fibroblasti bovini per 56 passaggi e caratterizzate dimostrando la presenza di markers caratteristici delle ESCs di topo e uomo, come fosfatasi alcalina, Oct-4, SSEA. Nello stesso lavoro inoltre gli Autori differenziarono positivamente le cellule in linee ematopoietiche e endoteliali (Saito et al 2002). Altri lavori sono stati condotti successivamente su ESCs equine coltivate su fibroblasti murini mitoticamente inattivati, ed in particolare Li et al nel 2006 dimostrarono come tali cellule, a differenza di quelle umane, non vadano incontro alla formazione di teratocitomi una volta impiantate *in vivo*: caratteristica questa che le renderebbe particolarmente adatte per l'applicazione clinica se non esistesse l'attuale difficoltà di reperimento di oociti ed embrioni in questa specie (Li et al 2006). Nel cane ad oggi esistono solo 4 lavori in cui sono state isolate ESCs. Nel 2006 Hatoya et al riportarono l'isolamento di ESCs da blastocisti di cane che mostravano markers specifici quali Oct-4, SSEA e fosfatasi alcalina. Tali cellule inoltre si dimostrarono in grado di formare corpi embrioidi e di differenziare in linee neuronali, epiteliali e miocardiche (Hatoya et al 2006). Schneider et al nel 2007 ne dimostrarono invece la potenzialità differenziativa in linee ematopoietiche; inoltre mentre i primi Autori erano riusciti a coltivare le ESCs solo fino al passaggio 8, i secondi sono riusciti a mantenerle in coltura fino al passaggio 10-12 (Schneider et al 2007). Più recentemente, l'isolamento da numerose blastocisti canine di linee cellulari con caratteristiche di cellule staminali è stato riportato da un terzo gruppo (Hayes et al 2008). Una di queste linee è stata mantenuta in coltura fino al passaggio 34; tutte le linee esprimevano markers quali Oct-4, Nanog, telomerasi e sono andate incontro a differenziazione *in vitro* (Hayes et al 2008). Gli stessi Autori riportano inoltre come anche nel cane, così come già dimostrato nel cavallo, lo sviluppo di teratomi a seguito di



inoculazione in topi immunodepressi sia un'eventualità alquanto rara (Hayes et al 2008). Anche per la specie felina esistono ben pochi dati circa l'isolamento di ESCs. Per primi Serrano et al nel 2006 riportarono l'isolamento di tali cellule da blastocisti prodotte *in vitro*. Tali cellule risultarono positive per fosfatasi alcalina, Oct-4 e SSEA. Nello stesso anno anche Kehler et al (2006) isolarono ESCs sia da embrioni prodotti *in vitro* che *in vivo* dopo superovulazione. Di tali cellule non è però riportata né la caratterizzazione molecolare né la differenziazione *in vitro*. Più recentemente Yu et al (2007) hanno isolato cellule staminali da ICM di blastocisti feline prodotte *in vivo*, risultate positive per fosfatasi alcaline, Oct-4 e SSEA. Al contrario di cavallo e cane, in questa specie non esistono dati circa la clonogenicità e la potenzialità neoplastica delle cellule isolate.

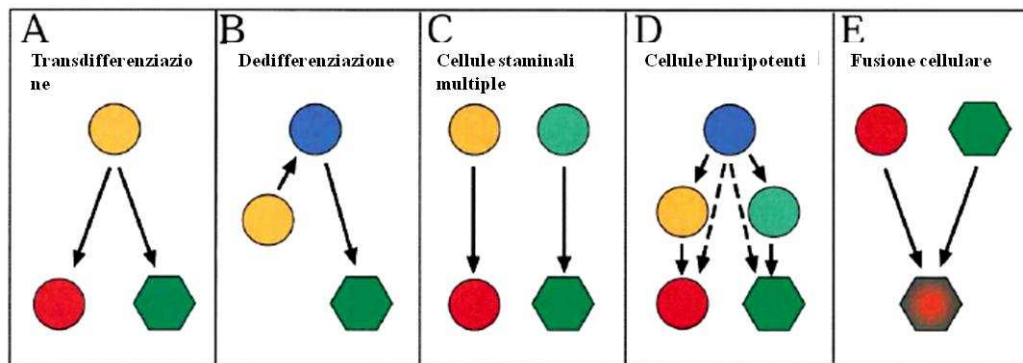
#### **1.4 Cellule staminali adulte**

Le cellule staminali adulte (ASCs) sono cellule indifferenziate collocate in particolari “nicchie ambientali” presenti in diversi tessuti o organi il cui ruolo principale è quello di mantenere l'integrità di tessuti specifici, in particolare quello di tessuti con turnover cellulare molto elevato, quali pelle, midollo osseo, sangue, osso. Sono comunque presenti anche in quei tessuti solitamente considerati perenni come il tessuto nervoso (Tab.2), mentre sembrano essere assenti a livello cardiaco.

A differenza delle ESCs, le cellule staminali adulte sono cellule considerate multipotenti o unipotenti. Per molti anni le cellule staminali ematopoietiche (HSCs), cellule tra le più studiate, sono state considerate plastiche per la loro capacità di mantenere l'equilibrio tra mantenimento del comparto staminale e produzione di un numero sufficiente di cellule progenitrici in grado di rispondere alla domanda di cellule ematiche necessarie per il mantenimento della normale omeostasi (Lemischka 2002; McCulloch 2003). Studi più recenti su cellule staminali ematopoietiche o isolate da altri tessuti, hanno

portato ad un nuovo concetto di plasticità delle cellule staminali adulte, secondo cui tale termine si riferisce alla capacità di una data cellula staminale, isolata da uno specifico tessuto o organo, di acquisire il fenotipo di un'altra cellula di un tessuto o organo differente e, in alcuni casi, di dare origine a linee mesodermiche, ectodermiche, neurali ed endodermiche (Martin-Rendon e Watt 2003a) (Tab.2). Secondo diversi Autori (Martin-Rendon e Watt 2003a,b; Wager e Weissman 2004) tale concetto può essere spiegato utilizzando 5 differenti vie, anche se in realtà i meccanismi che ne sono alla base non sono ancora del tutto chiariti. La prima via consiste nella transdifferenziazione, meccanismo attraverso il quale la cellula staminale potenzialmente potrebbe contribuire alla produzione di diverse linee cellulari. I primi a suggerirla sono stati Ferrari et al nel 1998 e Bjornson et al nel 1999: i primi sottolinearono come le cellule presenti nel midollo osseo e nel sangue periferico potessero contribuire alla riparazione di tessuti non ematopoietici, mentre i secondi dimostrarono che cellule staminali neurali potevano prendere parte alla produzione di cellule ematiche. Questa conversione di linee cellulari si verificherebbe direttamente, grazie all'attivazione di un programma differenziativo silente che altera la specificità di linea delle cellule (Fig.8A). Tale conversione teoricamente potrebbe verificarsi anche attraverso dedifferenziazione di una cellula matura in una cellula progenitrice immatura, multipotente, seguita da una successiva redifferenziazione in altra linea cellulare (Fig.8B); questo meccanismo è stato evidenziato per la prima volta da Brookes e Kumar nel 2002, i quali dimostrarono come attraverso la dedifferenziazione gli anfibi sono in grado di ricostruire arti amputati, coda, strutture oculari e cardiache. Per quanto riguarda però le cellule umane tale meccanismo non è ancora stato chiaramente e univocamente dimostrato e ad oggi non vi è alcuna dimostrazione *in vivo* (Wager e Weissman 2004). Altra possibilità è data dalla presenza, all'interno di tessuti come midollo osseo o muscolo periferico, di diversi tipi di cellule staminali o popolazioni di cellule progenitrici, incluse

cellule ematopoietiche e non, precursori endoteliali o muscolari, che possono quindi contribuire ad ognuna delle differenti linee cellulari (Fig.8C) (Wager e Weissman 2004). Ancora potrebbero essere presenti cellule staminali pluripotenti all'interno di tessuti quali quelli sopra menzionati (Fig.8D) (Wager e Weissman 2004). Infine la plasticità potrebbe essere spiegata attraverso il meccanismo di fusione cellulare (Fig.7E), meccanismo coinvolto in numerosi processi fisiologici che si verificano nei tessuti di un organismo (generazione di miofibre multinucleate; formazione di tessuto granulomatoso, reazioni a patologie virali etc.) (Wager e Weissman 2004).



**Fig.8:** Plasticità delle cellule staminali. Ovali ed esagoni rossi/aroncioni/verdi=cellule tissutali; Ovali blu=cellule pluripotenti. (Wager e Weissman 2004).

<b>Tipo Cellulare</b>	<b>Collocazione</b>	<b>Cellule o tessuti prodotti</b>
Cellule staminali Emopoietiche	Midollo osseo, sangue periferico	Midollo osseo, cellule ematiche linfemopoietiche
Cellule staminali mesenchimali	Midollo osseo, sangue periferico, tessuto adiposo, invogli e liquidi fetali	Osso, Cartilagine, tessuto adiposo, tendini, muscolo, stroma midollare, cellule neurali
Cellule staminali neurali	Sistema Nervoso Centrale	Neuroni, astrociti, oligodendrociti
Cellule staminali epatiche	Dentro o vicino ai dotti biliari terminali	Epatociti e cellule dei dotti
Cellule staminali pancreatiche	Isole pancreatiche	Cellule beta
Cellule staminali del muscolo scheletrico	Fibre muscolari	Fibre muscolo scheletrico
Cellule staminali della cute	Strato basale dell'epidermide, bulbo follicolo pilifero	Epidermide, follicolo pilifero
Cellule staminali epiteliali del polmone	Mucosa tracheale, bronchioli, alveoli	Cellule mucose e ciliate, pneumociti di tipo I e II
Cellule staminali dell'epitelio intestinale	Cellule epiteliali collocate attorno alla base di ogni cripta	Enterociti, cellule di Paneth, cellule mucose, cellule enteroendocrine dei villi

**Tab.2:** Cellule staminali adulte e loro principale differenziazione

A differenza delle cellule staminali embrionali, le cellule staminali adulte hanno un potenziale di replicazione finito, oltre il quale non riescono più a dividersi, ovvero raggiungono uno stadio di così detta senescenza replicativa (Pittinger et al 1999). Il potenziale replicativo delle cellule è infatti direttamente correlato alla attività telomerastica (Brook e Gardner 1997; Thomson et al 1998; Rosler et al 2004) che, come riportato precedentemente è una caratteristica di cellule ai primi stadi di sviluppo embrionale (Wight e Shay 2002; Rubin 2002).

## 2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

### 2.1 Generalità

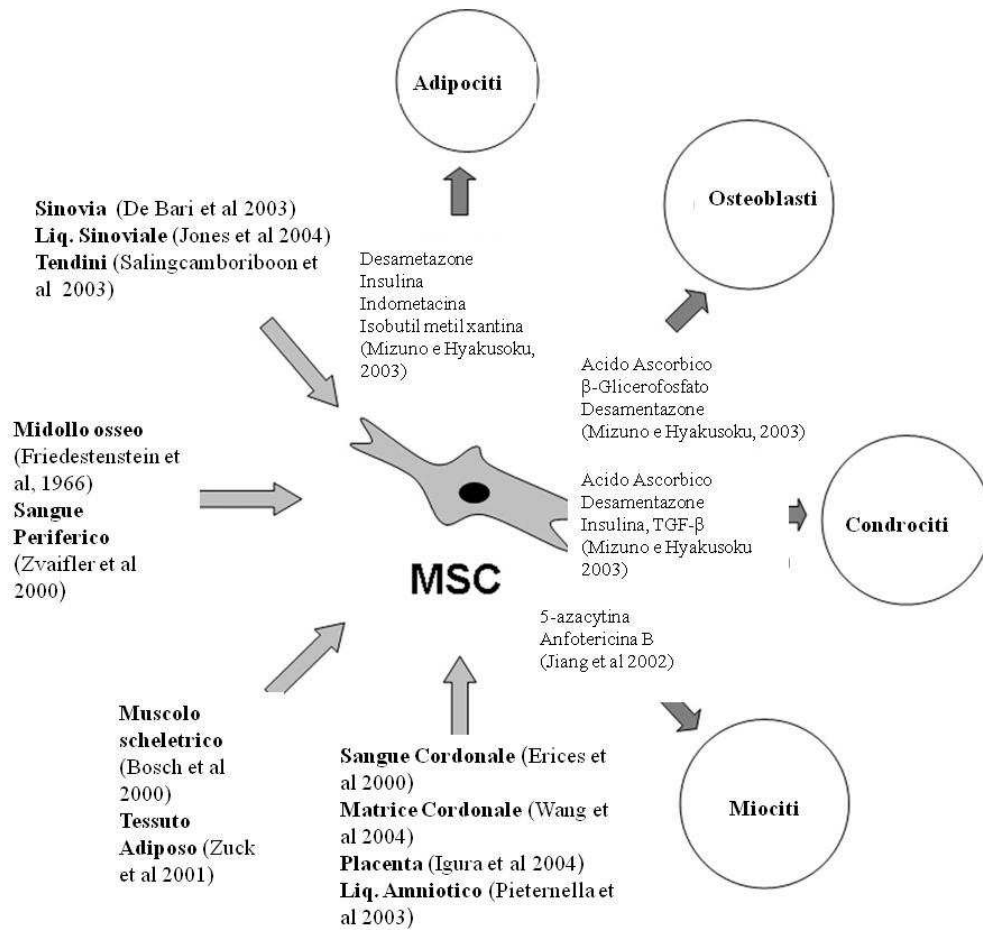
Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) adulte vennero scoperte da Friedenstein et al, nel 1966, che descrissero una popolazione di cellule, isolate dallo stroma di midollo osseo di topo, clonogeniche, aderenti alle piastre e in grado di andare incontro *in vitro* a differenziazione in osso, tessuto adiposo e cartilagine. Negli anni successivi venne effettuato un intenso lavoro di ricerca su identificazione, isolamento e caratterizzazione di tali cellule che evidenziò come le cellule staminali mesenchimali risiedano all'interno non solo del midollo osseo ma anche della maggior parte dei tessuti connettivi di un organismo come sangue periferico (Zvaifler et al 2000), tessuto adiposo (Zuck et al 2001), osso trabecolare (Sottile et al 2002), derma (Chunmeng e Tianmin 2004), membrana sinoviale (De Bari et al 2003), liquido sinoviale (Jones et al 2004), tendini (Salingcanboriboon et al 2003), muscolo scheletrico (Bosh et al 2000), così come nel sangue, fegato e midollo osseo fetali (Campagnoli et al 2001; In't Anker et al 2003). Altre popolazioni di cellule staminali mesenchimali sono poi state isolate da sangue e matrice di cordone ombelicale (Erices et al 2000; Wang et al 2004), villi placentari (Igura et al 2004), liquido amniotico (Pieternella et al 2003). Si può quindi affermare che cellule staminali mesenchimali risiedono virtualmente in tutti gli organi e tessuti dopo la nascita. In ogni caso la relazione tra queste cellule e quelle isolate dallo stroma midollare non è ancora stata chiarita, e cellule MSC-simili possono essere isolate anche da tessuti patologici come dimostrato da Marinova-Mutafchieva et al (2000). Cellule staminali mesenchimali isolate da tessuti differenti mostrano caratteristiche fenotipiche simili, quali l'adesione al fondo della piastra di coltura e la propensione a proliferare e differenziare in risposta a esposizione a vari fattori di crescita; rimane però da chiarire se si tratta dalle medesime MSCs. In uno studio effettuato nel 2005 (Sakaguchi et al), vennero comparate

cellule isolate da midollo osseo, periostio, sinovia, muscolo scheletrico e tessuto adiposo: i risultati dimostrarono come le cellule isolate dalla sinovia avessero una maggiore capacità di differenziazione condrogenica, seguite da quelle isolate da midollo osseo e periostio (Sakaguchi et al 2005). In uno studio successivo, Sotiropoulou et al (2006) riportarono come la tecnica di isolamento, il medium e i substrati di coltura, la densità di coltura, i fattori di crescita, ma anche l'età del donatore e l'eventuale presenza di patologie possano influenzare l'espansione, la differenziazione e le proprietà immunogeniche di queste cellule.

Tre diversi approcci sono stati descritti per l'isolamento di MSCs e possono essere impiegati separatamente o insieme per ottenere una coltura maggiormente omogenea. Il metodo di isolamento più tradizionale sfrutta la caratteristica delle MSCs di aderire alle plastiche, mentre le altre cellule galleggiano (Luria et al 1971): in questo modo quando il medium di coltura viene sostituito, le cellule contaminanti vengono eliminate, progressivamente l'eterogeneità della coltura si riduce e dopo un certo numero di passaggi restano solamente MSCs. Un altro protocollo di isolamento, utilizzato principalmente per midollo osseo e sangue, prevede la centrifugazione su gradiente di Percoll o Ficoll: in questo modo le cellule vengono separate in base alla loro densità e vengono così isolate cellule nucleate (Dazzi et al 2006). Entrambi questi metodi non sono però altamente specifici e per questo devono essere affiancati dalla separazione con FACS, basata sulla reattività delle cellule a specifici anticorpi fluorescenti. Gli anticorpi utilizzati per identificare le cellule staminali mesenchimali sono numerosi e talvolta differiscono tra i vari gruppi di lavoro rendendo difficoltoso il confronto tra i risultati ottenuti. Secondo quanto riportato dall'International Society for Cytotherapy, le cellule staminali mesenchimali sono definite tali qualora, oltre a crescere in colture aderenti alle piastre, esprimano markers Cluster Designation (CD) 105, CD73 e CD90 in percentuale superiore

al 95% , mentre esprimano i markers CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 in percentuale non superiore al 2% (Dominici et al 2006).

Le MSCs sono poi solitamente coltivate in monostrato in medium di coltura composto da glucosio, amminoacidi, ioni (calcio, magnesio, potassio, sodio e fosfati), solitamente addizionato con 10% di siero fetale bovino, a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Come accennato precedentemente, le cellule staminali mesenchimali, così come stabilito dall'International Society for Cytotherapy, sono in grado di andare incontro a differenziazione osteogenica, condrogenica ed adipogenica sia *in vitro* (Muraglia et al 2000; Chen et al 2008) che *in vivo* (Aslan et al 2006), fattore che rimane l'unico reale criterio di distinzione di queste cellule, secondo quanto riportato da Halleux et al (2001). Anche se ancora esistono pareri discordanti, sembra che queste cellule siano in grado di andare incontro a trans-differenziazione e dare origine a cellule viscerali del mesoderma, neuro-ectoderma ed endoderma se sottoposte a specifiche condizioni sperimentali *in vitro* (Jiang et al 2002) (Fig.9).

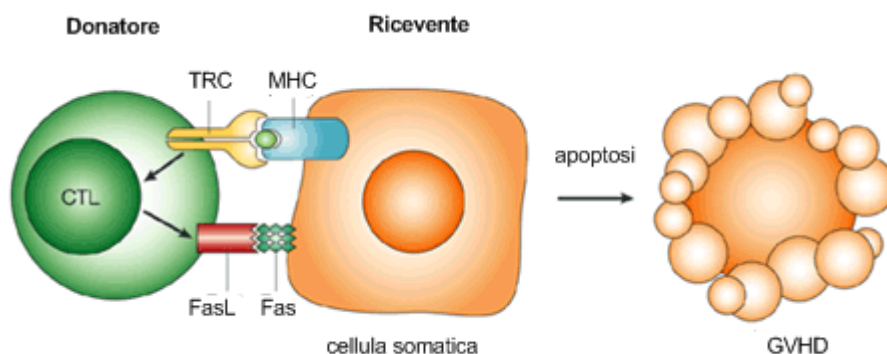


**Fig.9:** Origine e differenziazione di MSCs coltivate in vitro (Bajada et al 2008).



Data la loro capacità differenziativa, le MSCs sono diventate oggetto di diverse ricerche nell'ambito della terapia rigenerativa alla cui base risiede la possibilità di poter avere a disposizione una popolazione cellulare con un alto tasso di moltiplicazione ed in grado di differenziarsi nel senso del tessuto danneggiato. Nell'ultimo decennio sono infatti stati messi a punto i più svariati protocolli terapeutici con MSCs. Orlic et al. (2003) hanno mostrato come MSCs da midollo osseo possano generare cellule miocardiche mentre Stamm et al. (2003) hanno dimostrato come queste cellule possano essere utili per la riparazione di infarti miocardici. In tempi meno recenti, in campo ortopedico, MSCs da midollo osseo erano state impiegate nella riparazione di difetti ossei (Quarto et al 2001), difetti focali della cartilagine articolare (Ponticello et al 2000) e difetti tendinei (Young et al 1998).

Oltre a quanto riportato fino qui, caratteristica fondamentale delle MSCs è data dalla loro scarsa immunogenicità e della scarsa percentuale di soggetti con GVHD (Graft Versus Host Disease) malattia da trapianto contro l'ospite (Fig.10) a seguito di trapianti di cellule da donatori non compatibili, come riportato da Horwitz et al (1999) in soggetti con osteogenesi imperfetta.

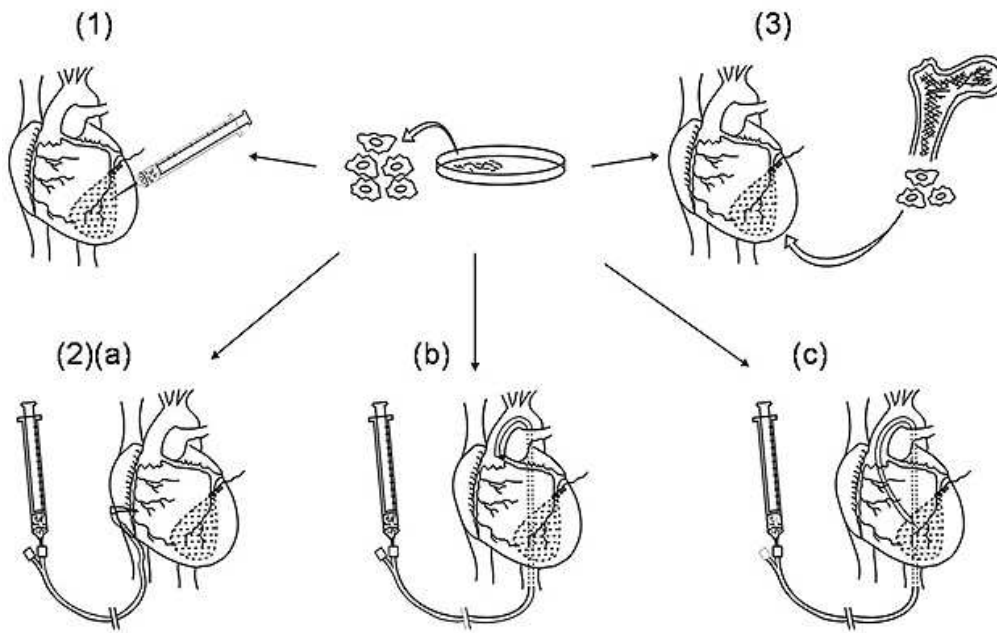


**Fig.10:** Graft Versus Host Disease (Trapani e Smyth 2002).

I punti fondamentali da tenere presente nello studio di questi fenomeni sono i seguenti:

- la risposta immunitaria dell'ospite; recenti studi hanno dimostrato come le MSCs siano in grado di sopprimere la reazione linfocitaria: Di Nicola et al. (2002) hanno evidenziato come la proliferazione di cellule T umane stimulate dalla presenza di linfociti irradiati e cellule dendritiche, venga sensibilmente depressa dalla presenza in co-cultura di MSCs. Inoltre, Le Blanc et al nel 2003 dimostrarono che le stesse MSCs sono prive delle proteine HLA (Human Leukocyte Antigen) di classe II anche una volta differenziate ed esprimono a bassi livelli proteine co-stimolatorie, evitando in questo modo di suscitare una reazione linfocitaria;

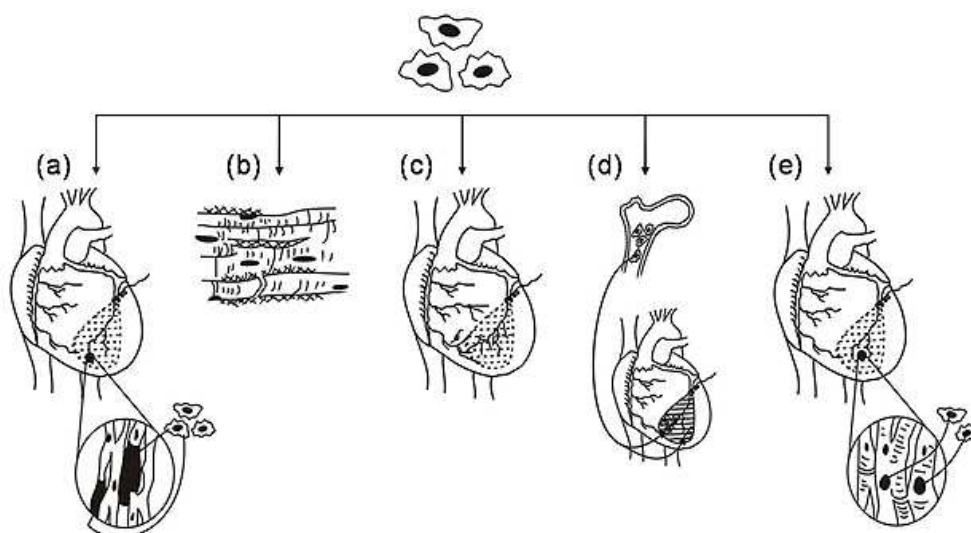
- i meccanismi tramite cui le MSCs si dirigono verso la zona danneggiata; risultati sperimentali mostrano chiaramente che MSCs iniettate tramite infusione endovenosa sono in grado di migrare fino al sito danneggiato. Questa straordinaria capacità è stata dimostrata in casi di fratture ossee, di infarti miocardici (Shake et al. 2002), e di danni ischemici al cervello (Wang et al., 2002). Quando invece le MSCs sono iniettate localmente, come nel caso di una sospensione somministrata per via intra-articolare nel ginocchio a seguito di un trauma, si sono rivelate in grado di attaccarsi e riparare il menisco e la cartilagine nelle zone in cui queste strutture avevano subito i maggiori danni (Murphy et al. 1999). I meccanismi che guidano queste cellule verso il danno sono ancora da chiarire; Wang et al. hanno dimostrato come una chemioquina monocitaria espressa in un danno ischemico cerebrale sia in grado di richiamare le MSCs iniettate in prossimità del danno stesso (Wang et al., 2002). Gli stessi Autori hanno inoltre osservato che la suddetta chemioquina non era presente in cervelli sani, ma a seguito della lesione questa molecola veniva prontamente espressa in grandi quantità. Le cellule staminali potrebbero quindi essere inoculate in differenti siti: direttamente nel sito lesionato (Fig.11-1); con l'impiego di catetere arterioso (Fig.11-2); per via endovenosa (Fig.11-3) (Ka et al 2007).



**Fig.11:** Diverse tecniche per la somministrazione terapeutica di staminali (Ka et al 2007).

Rombouts e Ploemacher (2003), invece, hanno osservato come la capacità di migrazione cali notevolmente in funzione del tempo in cui le cellule sono rimaste in coltura.

Una volta migrate nel sito danneggiato le cellule devono poi differenziare in un fenotipo appropriato per rigenerare il tessuto danneggiato. Ad oggi non si conoscono ancora i meccanismi alla base di questo fenomeno (Fig.12) e gli unici studi disponibili sono alquanto empirici (Arinzeh et al 2003).



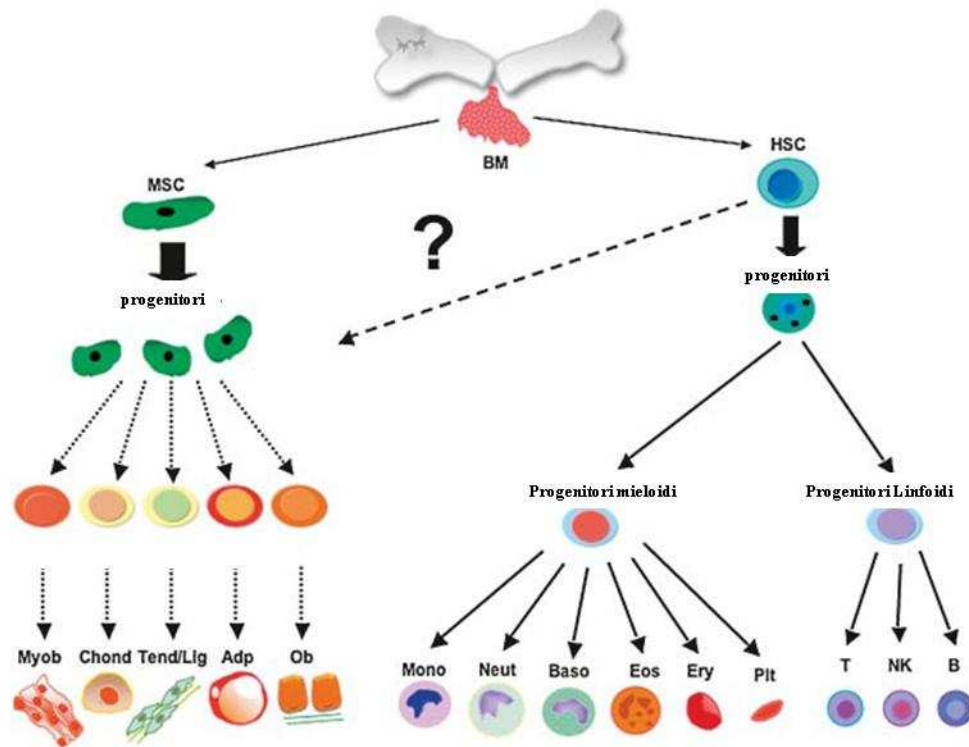
**Fig.12:**Possibili meccanismi secondo cui le staminali possono agire nel sito danneggiato: (a) le cellule sopravvivono nel tessuto del ricevente; (b) la presenza delle staminali stabilizza l'ambiente extracellulare; (c) stimolazione dell'angiogenesi; (d) induzione della mobilizzazione e dell'impianto di staminali residenti nel tessuto; (e) fusione delle cellule iniettate col miocardio dell'ospite. (Ka et al., 2007).

## 2.2 Cellule staminali mesenchimali da tessuti adulti

### 2.2.1 Midollo Osseo

La presenza di cellule non ematopoietiche nel midollo osseo fu per la prima volta suggerito da un patologo tedesco, Cohnheim, circa 130 anni fa; Cohnheim ipotizzò che il midollo osseo potesse essere una risorsa di fibroblasti implicati nella riparazione di numerosi tessuti periferici (Schipani e Kronenberg 2009). Alla fine degli anni '60 Friedenstein et al (1966) dimostrarono come il midollo osseo di roditori contenesse cellule fibroblastoidi in grado di formare colonie se coltivate *in vitro*. Gli stessi Autori (Friedenstein et al 1974) dimostrarono come queste cellule una volta impiantate sotto cute fossero in grado di formare osso o ricostruire il microambiente ematopoietico. Nel 1980 Castro-Malaspina et al isolarono le stesse cellule anche da midollo osseo di uomo. Nel 1999 Pittenger et al dimostrarono inequivocabilmente la multipotenzialità di queste cellule, già denominate da Caplan et al Mesenchymal stem cells (1991). Gli studi successivi si focalizzarono principalmente sulle tecniche di isolamento e purificazione di queste cellule

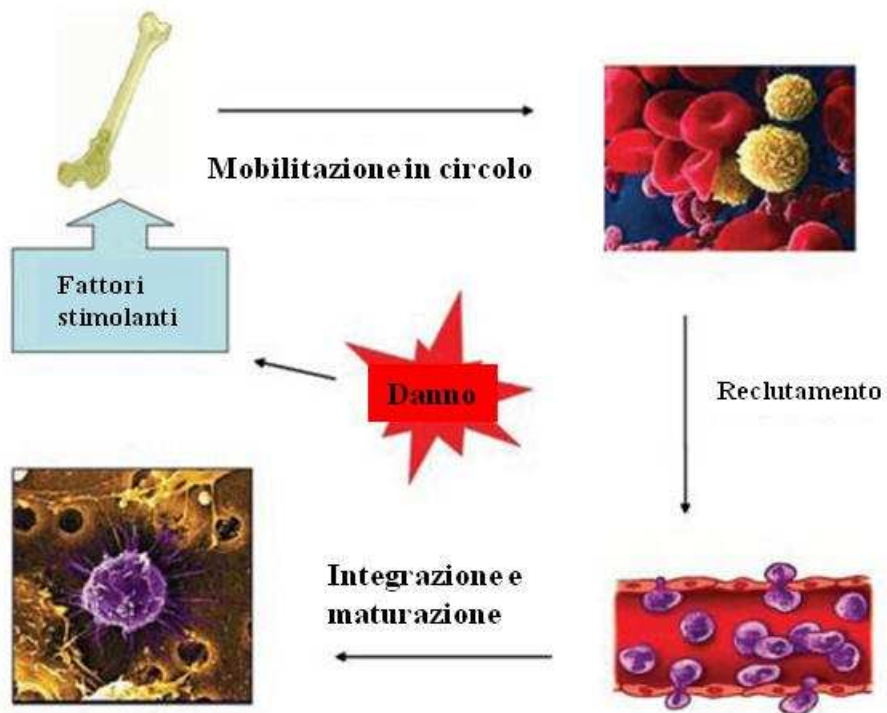
da quelle ematopoietiche, dato che le MSCs, solitamente isolate dallo stroma midollare sono solo 0,01-0,0001% delle cellule midollari nucleate (Sakaguchi et al 2005; Dazzi et al 2006), la cui restante parte è composta da HSCs (Fig.13)



**Fig.13:** Cellule staminali presenti nel midollo osseo (Ohishi e Schipani 2010)

Secondo recenti studi, si può postulare che la presenza di diverse popolazioni cellulari all'interno del midollo osseo sia il risultato di una migrazione di cellule staminali durante l'ontogenesi e della presenza di un microambiente che le attrae nel midollo osseo. Infatti secondo quanto dimostrato da diversi Autori (Ratajczak et al. 2003; Kucia et al. 2005), HSCs e non-HSCs sarebbero attratte da fattori chemiotattici secreti dalle cellule stromali del midollo osseo e da osteoblasti; in tal modo le cellule colonizzerebbero il midollo osseo alla fine del secondo o all'inizio del terzo trimestre di gestazione nell'uomo. Le cellule staminali non ematopoietiche presenti nel midollo osseo giocherebbero un ruolo fondamentale nell'omeostasi/turnover dei tessuti periferici e, qualora necessario verrebbero rilasciate in circolo dal midollo in caso di danno o stress tissutale, facilitando la

rigenerazione dei tessuti danneggiati (Kucia et al. 2005). Il rilascio di MSCs dalla loro nicchia all'interno del midollo osseo in circolo è detta mobilitazione e i meccanismi molecolari che ne sono alla base sono ancora per molti aspetti sconosciuti (Fig.14). Una ipotesi è quella secondo cui le citochine o le chemiochine prodotte in condizioni patologiche vengano rilasciate e in circolo e stimolino le MSCs a lasciare il midollo osseo. Un fattore che sembra avere un ruolo cruciale nella mobilitazione di MSCs è lo Stromal cell-derived factor (SDF)-1, che interagisce con molecole sovra espresse durante fenomeni patologici (Zhang et al 2008); altri autori hanno invece recentemente dimostrato l'importanza della glicoproteina CD44 nella migrazione di MSCs verso un determinato organo piuttosto che un altro (Sackstein et al 2008). Lo studio di tali fenomeni risulta di fondamentale importanza per lo sviluppo di strategie terapeutiche basate sull'impiego di cellule staminali al fine di migliorare la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule stesse.



**Fig.14:** Mobilitazione di MSCs dal midollo osseo dopo danno tissutale (Li uet al 2009)

Di fondamentale importanza per l'applicazione terapeutica è anche la scoperta da parte di diversi Autori di un decremento nel numero di cellule staminali mesenchimali all'interno del midollo osseo lungo il corso della vita di un individuo, con una riduzione fino a 10 volte dalla nascita all'adolescenza e dall'adolescenza alla vecchiaia (Haynesworth et al 1994). Questo decremento è parallelo all'incrementare del periodo di guarigione delle fratture ossee. In contrapposizione invece le HSCs restano costanti nel corso della vita di un organismo (Caplan 2009).

In medicina veterinaria, cellule staminali mesenchimali sono state isolate dal midollo osseo di diverse specie di animali domestici tra cui bovino (Bosnakovski et al 2004), pecora (Jessop et al 1994; Rhodes et al 2004; Zhang et al 2004; McCarty et al 2009), maiale (Ringe et al 2002; Vacanti et al 2005), cane (Kadiyala et al 1997; Kamishina et al 2006; Csaki et al 2008), gatto (Martin et al 2002) e cavallo (Fortier et al 1998; Worster et al 2000). Bosnakovski et al (2004), riportano l'isolamento da midollo osseo di vitello di una popolazione di cellule omogenee, fibroblasto-simili che vanno incontro a differenziazione osteogenica, adipogenica e condrogenica; in quest'ultimo caso però, gli stessi Autori dimostrano come queste cellule vadano incontro a condrogenesi spontanea se coltivate in pellet in medium privo di siero, senza che sia necessaria l'aggiunta di fattori di crescita come TGF $\beta$ 1, solitamente utilizzato per la differenziazione osteogenica nelle altre specie (Johnstone et al 1998). Nella specie ovina, i primi studi riguardanti l'isolamento di MSCs dal midollo osseo risalgono al 1994 (Jessop et al 1994); McCarty et al (2009), recentemente hanno poi dimostrato come l'incidenza, le caratteristiche morfologiche e differenziative delle cellule isolate da midollo osseo di pecora siano simili a quelle delle BMMSCs umane. Gli stessi Autori sottolineano come d'altro lato siano alquanto scarse le conoscenze circa le caratteristiche molecolari superficiali di tali cellule nella specie ovina, dato anche il ridotto numero di anticorpi utilizzabili specifici per questa specie. Così come

le BMMSCs umane anche quelle bovine si sono rivelate essere positive per CD44, CD166 e CD29, negative per CD31, CD45 e scarsamente positive per CD14 probabilmente a seguito di una contaminazione da parte di macrofagi (McCarty et al 2009). Altri anticorpi come CD105, CD146, CD90 specifici per l'uomo non danno cross-reazione con cellule ovine (McCarty et al 2009). Ringe et al nel 2002, isolarono per primi cellule con caratteristiche morfologiche e differenziative simili alle BMMSCs umane. Vacanti et al (2005) dimostrarono come anche per il suino, come per altre specie, la capacità proliferativa ed il numero di MSCs siano maggiori in campioni di midollo osseo prelevati da animali giovani. Entrambi gli Autori sottolineano le lacune ancora esistenti circa la caratterizzazione molecolare delle MSCs in questa specie (Ringe et al 2002; Vacanti et al 2005). Nel cane la capacità osteogenica di cellule mesenchimali isolate da midollo osseo venne dimostrata per la prima volta nel 1997 da Kadiyala et al; gli stessi Autori evidenziarono però come, a differenza delle cellule mesenchimali isolate da midollo osseo umano, quelle isolate da midollo osseo di cane perdevano tale potenzialità già dopo il secondo passaggio in coltura e come non andassero incontro a formazione di noduli calcificati durante l'osteogenesi. Successivamente Csaki et al (2008) dimostrarono che MSCs isolate da midollo osseo di cane potevano andare incontro a differenziazione condrogenica ed adipogenica mentre Kamishina et al (2006) evidenziarono come queste cellule fossero negative per CD34 e CD45, mentre esprimano CD90 e CD105 così come le BMMSCs umane. Martin et al (2002) isolarono cellule con morfologia fibroblasto simile dallo stroma midollare di gatto anche se in numero inferiore rispetto ad altre specie. Le cellule isolate in questa specie si dimostrarono in grado di proliferare per un numero inferiore di passaggi, rispetto a quelle isolate in altre specie, ma presentarono profilo antigenico di superficie e potenzialità differenziativa simili a quelli delle cellule isolate nell'uomo e nei roditori (Martin et al 2002). Nella specie equina, infine, i primi ad isolare



dal midollo cellule mesenchimali con morfologia fibroblasto-simile e in grado di andare incontro a differenziazione condrogenica furono Fortier et al (1998) e Worster et al (2000). Recentemente, Vidal et al (2006) calcolarono un tasso di duplicazione cellulare di  $1,4 \pm 0,22$  giorni per queste cellule, caratterizzate da una iniziale fase di riposo e successivo incremento del numero di duplicazioni, come per altre specie animali. A differenza però dell'uomo, in cui il tempo di duplicazione è stato dimostrato essere maggiore nelle cellule di adulto rispetto al neonato (Montjovent et al 2004), Vidal et al (2006) non trovarono invece differenze tra puledri e cavalli adulti; secondo gli Autori questo potrebbe essere dovuto al numero di animali dei due gruppi, al sistema di coltura *in vitro* che ottimizza la crescita cellulare o all'effettiva mancanza di differenze, anche se ulteriori studi sono necessari per avvalorare tali tesi (Vidal et al 2006). Mentre nel cane il numero di MSCs isolate da midollo osseo è di 1 in  $2,5 \times 10^4$  (Kadiyala et al 1997) e nel gatto di 1 in  $3,8 \times 10^5$  (Martin et al 2002), Vidal et al dimostrarono invece che nel cavallo il numero di cellule isolate è di circa 1 in  $4,2 \times 10^3$ , valore di gran lunga più vicino a quelli riportati in uomo e topo (Phinney et al 1999). Le differenze riscontrate potrebbero essere imputabili ai differenti metodi impiegati per l'analisi quantitativa, all'età dei donatori impiegati nei diversi studi o ad alcune caratteristiche intrinseche nelle varie specie. Come per altre specie animali anche per la specie equina gli studi relativi alla caratterizzazione molecolare delle MSCs sono alquanto scarsi dato l'esiguo numero in commercio di markers di superficie specifici per questa specie; Arnhold et al (2007) riportano come le cellule isolate da midollo osseo equino siano positive per CD90 e vadano incontro a differenziazione osteogenica, condrogenica ed adipogenica.

### 2.2.2 Tessuto Adiposo

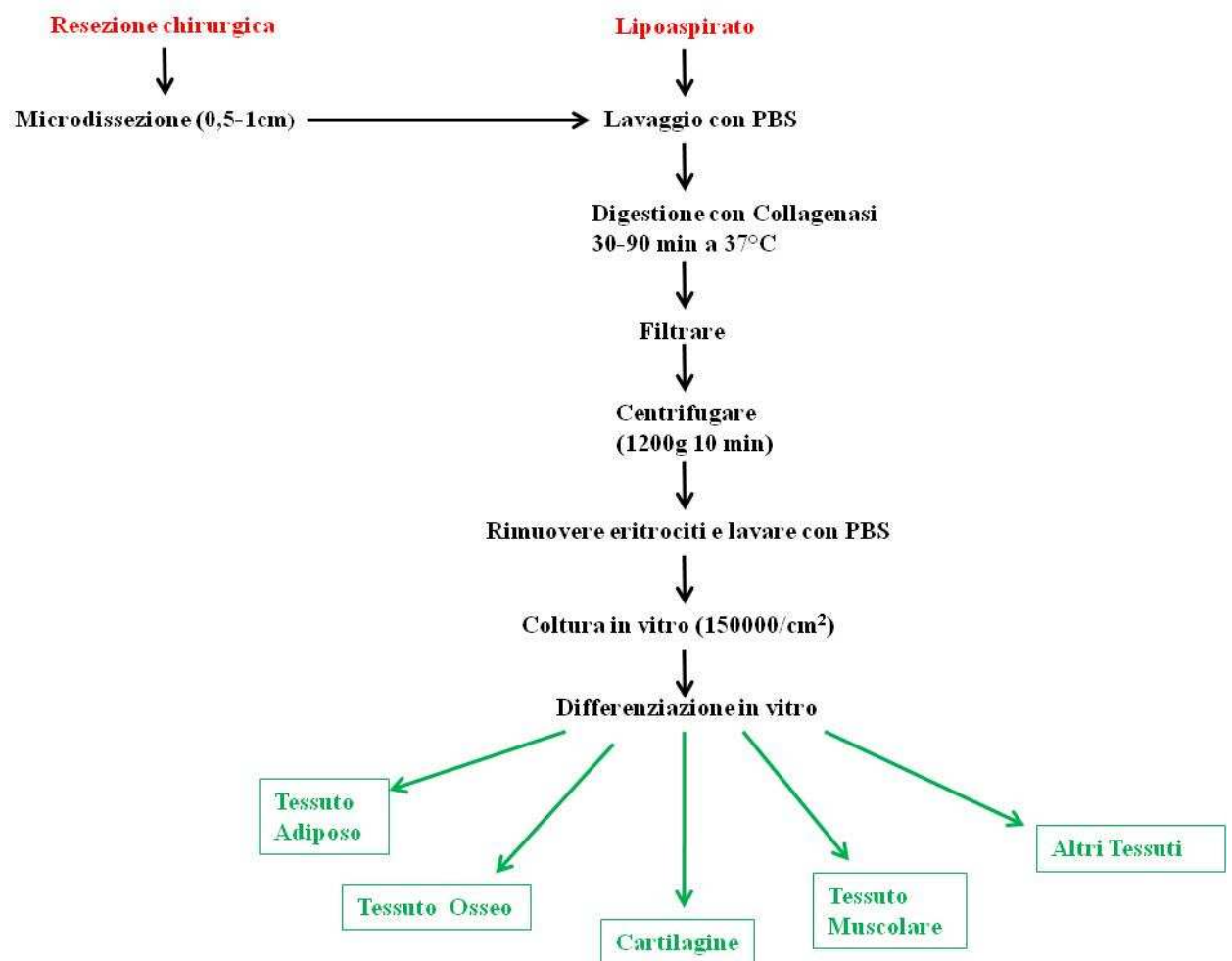
Il tessuto adiposo è un tessuto altamente complesso, consistente in una mescolanza di adipociti maturi, preadipociti, fibroblasti, cellule del muscolo vascolare, endoteliali, immunitarie e staminali (Weisberg et al 2003; Xu et al 2005; Caspar-Bauguil et al 2005). La frazione cellulare vascolare-stromale (Stromal Vascular cell Fraction: SVF) è oggi al centro di numerose ricerche data la ricchezza in cellule staminali mesenchimali (Zuck et al 2002; Casteilla et al 2005; Katz et al 2005; Prunet-Marcassus et al 2006). Le MSCs da tessuto adiposo rappresentano una valida alternativa di cellule autologhe o eterologhe potendo essere ottenute rapidamente e in numero elevato mediante digestione enzimatica con collagenasi (Zuck et al 2001; Zuck et al 2003; Dicker et al 2005) e andando incontro a differenziazione osteogenica, condrogenica e adipogenica (Lee et al 2004). Fattori come l'età del donatore, il tipo di tessuto, la localizzazione (tessuto adiposo sottocutaneo o viscerale), il tipo di procedura chirurgica utilizzato, le condizioni di coltura, l'esposizione alla plastica, la densità di coltura e la formulazione dei media possono influenzare sia il tasso di proliferazione che la capacità differenziativa di tali cellule

Per quanto riguarda la procedura chirurgica impiegata e la localizzazione anatomica, queste non influenzano il numero totale di cellule ottenibili dalla SVF (Oedayrajsingh-Varma et al 2006; Smith et al 2006); mentre nell'uomo i dati sono ancora piuttosto scarsi, nel topo è evidente come sia la composizione cellulare che la capacità differenziativa della SVF sia eterogenea (Prunet-Marcassus et al 2006). In ogni caso, dato che diverse localizzazioni anatomiche di tessuto adiposo hanno proprie caratteristiche metaboliche, attività lipolitica, composizione in acidi grassi e espressione genica, queste possono influenzare le caratteristiche a lungo termine del campione trapiantato. Per esempio nel coniglio è stato evidenziato come il potenziale osteogenico di MSCs isolate da grasso viscerale sia maggiore rispetto a quello di MSCs isolate da grasso sottocutaneo (Peptan et

al 2006). Probabilmente le cellule, anche una volta trasferite mantengono certe proprietà del sito di origine; ulteriori studi saranno necessari per dimostrare se differenti fonti anatomiche di MSCs (sottocute periferico, sottocute addominale, omento) mostrano differenze metaboliche e comportamentali dopo terapia cellulare. D'altro canto invece, la frequenza della proliferazione e il tempo di duplicazione cellulare sono influenzati dalla tecnica chirurgica utilizzata per il prelievo. Oedayrajsingh-Varma et al (2006) hanno infatti dimostrato come migliori siano i risultati quando il prelievo viene effettuato con resezione piuttosto che con aspirazione ecoguidata.

Per quanto riguarda l'età, è stato dimostrato che la capacità di adesione alle piastre e di proliferazione sono maggiori in campioni prelevati da donatori giovani, ma la capacità di differenziazione si mantiene anche con l'aumentare dell'età (Shi et al 2005).

Il materiale ottenuto mediante aspirazione contiene cellule vitali e può essere utilizzato direttamente per l'applicazione terapeutica o per l'isolamento cellulare (Pu et al 2005; Tapp et al 2009), mentre il tessuto prelevato mediante dissezione chirurgica deve essere sottoposto a microdissezione in pezzi della grandezza di 0,5-1 cm<sup>3</sup> (Fig.15).



**Fig.15:** Procedura di isolamento e coltura di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo (Schäffler e Büchler 2007)

In ogni caso occorre considerare come la procedura di isolamento possa influenzare la vitalità e la capacità differenziativa delle cellule: lotti differenti di collagenasi e la velocità di centrifugazione possono anche influenzare la qualità delle cellule isolate (Schäffler e Büchler 2007). Ancora importante è la densità con cui le cellule vengono messe in coltura e il medium utilizzato: Lee et al nel 2004 e successivamente Smith et al nel 2006 dimostrarono come una bassa densità di coltura accompagnata dall'utilizzo di Dulbecco's Modified Medium (DMEM) quale terreno di coltura faciliti la proliferazione e la differenziazione delle MSCs.

Anche se l'espressione dei markers molecolari di superficie e l'espressione genica delle MSCs da tessuto adiposo sembrano essere simili a quelle del midollo osseo

(Gronthos et al 2001; Musina et al 2005) esistono alcune differenze molecolari. Wagner et al (2005) analizzarono l'espressione genica di cellule derivate da tessuto adiposo, midollo osseo, cordone ombelicale e normali fibroblasti. Gli Autori trovarono 25 geni sovrapposti e maggiormente espressi nelle MSCs rispetto ai fibroblasti, ma non trovarono differenze fenotipiche tra le tre linee di MSCs utilizzando un pannello di 22 antigeni di superficie. Al contrario, invece, trovarono diverse sequenze differenti tra MSCs da tessuto adiposo, BMMSCs e cellule del cordone ombelicale. Lee et al (2004), identificarono invece 24 geni sovra-espressi nelle prime rispetto alle BMMSCs e descrissero differenti espressioni per otto markers di superficie in queste cellule. In accordo con i dati raccolti, gli Autori ipotizzarono che meno dell'1% dei geni venisse espresso diversamente tra MSCs da tessuto adiposo e BMMSCs.

Inoltre mentre le BMMSCs sono fenotipicamente ormai ben definite, alcune lacune restano per le cellule isolate da tessuto adiposo. Queste cellule esprimono i markers di superficie stabiliti dalla International Society for Cytotherapy, ma è stato dimostrato come alcune di queste molecole siano maggiormente espresse con l'aumentare dei passaggi di coltura *in vitro*: infatti l'espressione di CD44, CD29, CD73, CD90 e CD105 raggiunge il 90% al passaggio 4 di coltura (Gronthos et al 2001; Katz et al 2005). Altri markers, come quelli ematopoietici quali CD11, CD14, CD35 e CD44 si riducono o vengono persi con l'aumentare dei passaggi culturali, portando così alla selezione di una popolazione cellulare omogenea. Come le BMMSCs, le cellule di origine adiposa non esprimono antigene HLA e hanno proprietà immunosoppressive che le rendono disponibili per trapianti allogenici e fonte alternativa alle cellule di origine midollare (Puissant et al 2005). Per questo alcuni Autori ipotizzano un loro possibile impiego nel trattamento della GVHD (Fang et al 2006; Yanez et al 2006).

Per quanto riguarda la capacità differenziativa sembra esistano alcune differenze rispetto alle cellule da midollo osseo. Infatti, se non vi sono differenze per quel che riguarda la differenziazione osteogenica, queste invece esistono per quella condrogenica che sembrerebbe essere inferiore per le cellule di derivazione adiposa (Huang et al 2005; Solchaga et al 2005). D'altro lato però, le cellule derivanti dal tessuto adiposo vanno incontro a differenziazione anche in cellule non di origine mesodermica. Alcuni Autori hanno dimostrato come queste cellule abbiano un elevato potenziale angiogenico e siano in grado di ripristinare il flusso ematico dopo ischemia al pari delle cellule midollari (Planate et al 2004; Moon et al 2006). Incubando le MSCs di origine adiposa in presenza di sostanze neurogeniche, sono poi in grado di dare origine a fenotipi neuronali positivi alla colorazione per le proteine acide gliali fibrillari (GFAP) e altre sostanze neuronali (Safford et al 2002). Timper et al (2006) invece riuscirono a differenziare le cellule staminali mesenchimali di origine adiposa in fenotipi pancreatici endocrini in grado di sintetizzare ormoni come insulina, glucagone e somatostatina, fornendo così uno spiraglio per la cura del diabete mellito di tipo I. Ancora le MSCs quando coltivate in opportune condizioni di coltura, sono andate incontro a differenziazione in cellule epatocito-simili esprimenti albumina e fetoproteina e in grado di produrre urea (Seo et al 2005). In fine, anche se le cellule isolate da tessuto adiposo non sono in grado di andare incontro a differenziazione ematopoietica, sembrerebbero però fornire un importante supporto nella differenziazione di progenitori ematopoietici in cellule mieloidi e linfociti B (Corre et al 2006). Mentre la base molecolare della differenziazione in linee cellulari di origine mesodermica è ormai nota, gli eventi molecolari chiave e i fattori di trascrizione che danno inizio alle differenziazioni di queste cellule in altre linee cellulari non sono ancora stati identificati. Per questo i ricercatori stanno concentrando gli sforzi nel decodificare questi meccanismi e rendere così davvero fattibile una terapia cellulare di patologie epatiche pancreatiche e nervose.

Anche in medicina veterinaria il tessuto adiposo sta assumendo sempre maggiore importanza quale fonte di cellule staminali mesenchimali utilizzabili nella medicina rigenerativa. Nella specie equina per esempio, uno dei vantaggi dati dall'impiego di tessuto adiposo quale fonte di MSCs è dovuta alla maggior facilità di prelievo e ai minori rischi per la salute dell'animale rispetto al prelievo di midollo osseo che comporta a volte l'insorgenza di pneumotorace o pneumoderma (Ackerman e Alden 1958; Durando et al 2006) quando effettuato dallo sterno e una posizione rischiosa per l'operatore sia per il prelievo dallo sterno che dalla cresta iliaca. A differenza delle BMMSCs, le cellule staminali isolate da tessuto adiposo in questa specie non presentano una fase di riposo e sono caratterizzate da una maggior capacità proliferativa (Vidal et al 2007; Colleoni et al 2009). Vidal et al (2007) isolarono da 140,000 a 538,000 cellule/ml di tessuto adiposo, variabilità che riflette differenze donatore dipendente. Gli stessi Autori riportano anche l'esistenza di differenze intraspecifiche, dato che il tempo di duplicazione delle MSCs isolate da tessuto adiposo di cavallo è di due giorni, mentre nell'uomo è di 4 giorni (Mitchell et al 2006). Dal punto di vista differenziativo esistono alcune differenze tra le cellule isolate da midollo e quelle isolate da tessuto adiposo nella specie equina; Vidal et al (2007) dimostrarono come per l'induzione osteogenica delle MSCs da tessuto adiposo siano necessari un numero maggiore di giorni di coltura, anche se successivamente i noduli ossei si formano più rapidamente rispetto alle BMMSCs. Successivamente gli stessi Autori (Vidal et al 2008) avvalorarono l'ipotesi avanzata da Kisiday et al (2008), secondo cui, anche nel cavallo come già dimostrato nell'uomo (Huang et al 2005; Solchaga et al 2005), le cellule staminali mesenchimali derivanti da midollo osseo hanno una maggior potenzialità di andare incontro a differenziazione condrogenica. Come per le BMMSCs, anche per le cellule mesenchimali da tessuto adiposo sono alquanto esigui i dati relativi alla caratterizzazione molecolare. Recentemente de Mattos Carvalho et al (2009), hanno

dimostrato la positività di tali cellule a CD90 dal passaggio 1 al 4 di coltura utilizzando markers specifici per ratto. Le stesse cellule sono risultate positive a CD44, positività che aumenta con l'aumentare dei passaggi; nessuna reazione invece è stata rilevata per il CD13. Nel cane i primi ad isolate cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo furono Kang et al nel 2008: gli Autori dimostrarono come tali cellule, morfologicamente e fenotipicamente simili a quelle umane, fossero in grado di andare incontro a differenziazione osteogenica, adipogenica e neuronale. Recentemente Vierira et al (2010) ottennero una percentuale di isolamento di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo di cane del 100% e queste al passaggio 4 di coltura si dimostrarono positive per CD29, CD44, CD90, mentre erano negative per CD45 e il 10% positive per CD34, probabilmente a seguito di una contaminazione da cellule endoteliali. Gli stessi Autori (Vierira et al 2010), oltre ad evidenziare le potenzialità differenziative delle cellule isolate, dimostrarono come le cellule andate incontro a differenziazione adipogenica contenessero un minor numero di vacuoli lipidici rispetto a quelli presenti nelle cellule umane.

### 2.2.3 Sangue Periferico

Cellule mesenchimali multipotenti possono essere isolate da sangue periferico di donatori adulti (PBMSCs) come cellule fibroblasto-simili caratterizzate da unità formanti colonie simili a quelle midollari. In realtà la scoperta di tali cellule nel sangue è precedente all'isolamento di MSCs dal midollo osseo; le prime osservazioni infatti risalgono all'inizio del ventesimo secolo quando Maximov et al (1902; 1928) isolarono leucociti in grado di diventare cellule fibroblasto-simili e dare poi origine a tessuto connettivo. L'esistenza nel sangue periferico di unità formanti colonie con proprietà clonogenica e capacità di sopravvivere *in vitro* per molti passaggi colturali venne poi confermata da studi successivi (Paul 1958); venne però ipotizzato che queste cellule fibroblasto simili potessero essere il



risultato di una contaminazione del sangue da parte di frammenti di tessuto connettivo durante il prelievo ematico (Kalus et al 1968). Tali sospetti risultarono però infondati grazie ad esperimenti condotti in maschi adulti di coniglio (Allgöwer et al 1968) e porcellino d'India (Luria et al 1971) in cui venne confrontato il numero di colonie fibroblasto-simili presenti nel sangue dopo prelievi ripetuti e dopo un singolo prelievo. Gli Autori infatti non trovarono una correlazione tra il numero di colonie e il numero di punture cardiache. Ad oggi cellule staminali mesenchimali sono state isolate dal sangue periferico di soggetti adulti di maiale (Maximow 1928; Luria et al 1971; Kuznetsov et al 2001), coniglio (Allgöwer et al 1968/47), cane (Klein et al 1983; Huss et al 2000), topo (Kuznetsov et al 2001), ratto (Wu et al 2003), cavallo (Koerner et al 2006), uomo (Paul 1958; Fernandez et al 1997; Kuznetsov et al 2001) e pollo, anche se in quest'ultimo caso è stata confermata la contaminazione da parte di tessuto connettivo (Rangan 1967).

Una volta esclusa la contaminazione con tessuto connettivo, rimane ancora un mistero come queste cellule possano entrare nel sangue periferico. Una semplice spiegazione potrebbe essere la loro migrazione dal midollo osseo o da altri tessuti. Diversi studi dimostrano come le cellule midollari espanse *ex-vivo* raggiungano vari tessuti sani o danneggiati così come il midollo osseo stesso dopo infusione sistemica (Pereira et al 1995; Gao et al 2001; Devine et al 2002; Wu et al 2005; Francois et al 2006). In ogni caso la migrazione delle cellule verso tessuti extravascolari o midollo osseo non supporta direttamente l'ipotesi di una migrazione spontanea delle cellule dal midollo, anche se altri studi effettuati su topo e ratto suggeriscono uno scambio di MSCs tra sangue periferico ed organi (Piersma et al 1985; Wu et al 2003).

Le unità formanti colonie hanno una frequenza estremamente bassa nel sangue periferico; la loro frequenza viene indicata come efficienza (CFE) definita come la percentuale di colonie formate rapportata al numero di cellule messe in coltura

(Friedenstein et al 1970). Molti Autori hanno calcolato la CFE in colture primarie ed hanno evidenziato come questa vari da specie a specie ma anche tra i soggetti di una stessa specie; inoltre l'efficienza delle cellule isolate da sangue periferico è risultata essere molto più bassa di quella di cellule isolate da midollo osseo (Friedenstein 1980; Kuznetsov e Gehron Robey 1996). Per esempio, nell'uomo solitamente si formano colonie in numero variabile da  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$ , mentre la presenza nel sangue periferico è molto più bassa, anzi spesso le colonie sono inesistenti (Wixler et al 2003) e inoltre sembra essere più difficoltosa la loro coltura *in vitro* (Reading et al 2000), probabilmente perché spesso originate da una singola cellula (Gronthos et al 1998). Questa infatti richiederebbe fattori di crescita differenti o in concentrazioni maggiori rispetto a quelli necessari alle BMMSCs (Kuznetov et al 1997).

Dal punto di vista fenotipico, le PBMSCs presentano scarsi livelli di CD34, tipico di cellule emopoietiche, CD14, proprio dei macrofagi e CD45, marker leucocitario (Kuznetsov et al 2001, Fernandez et al 1997; Tondreau et al 2005). Tali cellule inoltre presenterebbero scarsi livelli di CD117 (c-Kit) (Conrad et al 2002) e non esprimerebbero antigene leucocitario (HLA)-DR (Conrad et al 2002; Tondreau et al 2005), CD31 e neurofilamenti (Kuznetsov et al 2001), mentre esibirebbero differenti markers tipici di cellule staminali mesenchimali (Kuznetsov et al 2001, Fernandez et al 1997; Tondreau et al 2005).

Per quanto riguarda la capacità differenziativa di queste cellule esistono studi sia *in vitro* che *in vivo* che dimostrano come esse possano andare incontro a differenziazione in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico (Huss et al 2000; Kuznetsov et al 2001; Wu et al 2003; Tondreau et al 2005). Altri studi hanno invece dimostrato come le PBMSCs possano essere precursori anche di altre linee cellulari, come linee neuronali (Conrad et al 2002, Tondreau et al 2005), ematopoietiche (Lange et al 1999) e possano migliorare

significativamente il flusso ematico periferico e l'angiogenesi (Huss et al 2004). La maggior facilità con cui può essere prelevato il sangue rispetto al midollo osseo e la potenzialità differenziativa rende queste cellule possibili candidati per la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale.

In medicina veterinaria, così come in medicina umana, le cellule mesenchimali del sangue periferico hanno attirato l'attenzione dei ricercatori soprattutto per la maggior facilità di prelievo del sangue rispetto al midollo osseo o al tessuto adiposo, ed al minor dolore sofferto dal donatore dopo il prelievo. Nonostante questi aspetti gli studi negli animali domestici sono in numero ancora esiguo. Nella specie equina Koerner et al (2006) per primi isolarono cellule mesenchimali da sangue periferico di soggetti adulti; gli Autori riportarono una ridotta percentuale di isolamento, pari solo al 36,4%, rispetto a quella ottenuta nel midollo osseo, pari al 100%. Inoltre, nonostante morfologicamente le cellule apparissero normali, a partire dal passaggio 5 di coltura andarono incontro a senescenza, a causa della necessità di un substrato colturale specifico, secondo quanto ipotizzato dagli stessi Autori (Koerner et al 2006). Le cellule isolate si sono dimostrate in grado di andare incontro a differenziazione osteogenica e adipogenica, allo stesso modo di quelle isolate da midollo osseo, ma, come già descritto in medicina umana da Kuwana et al (2003), non a differenziazione condrogenica in pellet e scarsa in monostrato sia in presenza che in assenza di TGFβ1 (Koerner et al 2006). Recentemente Giovannini et al (2008), hanno invece dimostrato come, in condizioni adeguate anche le MSCs isolate da sangue periferico di cavallo possano andare incontro a differenziazione condrogenica, anche se più lentamente rispetto a quelle isolate da midollo osseo: tali differenze farebbero presumere che le cellule isolate dal sangue periferico non siano le stesse presenti nel midollo osseo, così come già ipotizzato nel topo da Da Silva Meirelles et al (2006) e da Kern et al (2006) nell'uomo. In ogni caso, i dati raccolti da Giovannini et al (2008) aprono la strada

all'impiego del sangue periferico quale fonte di cellule staminali mesenchimali da utilizzare nell'ambito della medicina rigenerativa equina.

## **2.3 Cellule staminali mesenchimali da tessuti extra-embrionali**

### **2.3.1 Sangue cordonale**

Il sangue prelevato dal cordone ombelicale è oggi considerato una delle maggiori fonti di cellule ematopoietiche per trapianto allogenico (Grewal et al 2003). Diversi studi hanno infatti dimostrato come il sangue cordonale sia più ricco di cellule CD34 positive rispetto al midollo osseo (Browmeyer et al 1989). Lo stesso è stato ipotizzato anche per le cellule staminali mesenchimali; i primi tentativi di isolamento di tali cellule dal sangue cordonale sono però stati del tutto negativi (Mareschi et al 2001; Gutierrez-Rodriguez et al 2000) o con una percentuale di isolamento di appena il 25% (Erices 2000; Lee et al 2004). Più recentemente Kern et al (2006), confrontando le percentuali di resa in termini di cellule isolate da midollo osseo, tessuto adiposo e sangue cordonale hanno riportato una percentuale del 100% per i primi due e solo del 63% per il sangue cordonale. Gli Autori hanno imputato tale differenza al fatto che mentre in un individuo adulto le cellule staminali risiedono all'interno dei tessuti, nel feto invece sono ancora in circolo, così come precedentemente affermato da Erices et al (2000), mentre Biebak et al (2000) hanno sottolineato quali fattori cruciali nell'isolamento di MSCs da sangue cordonale, non solo le condizioni di coltura *in vitro*, in particolare presenza di siero e pH del medium, ma anche il tempo che intercorre tra il prelievo del campione e la sua processazione in laboratorio che non dovrebbe eccedere le 15 ore. La ridotta percentuale di isolamento di MSCs da sangue cordonale, viene comunque accompagnata da una maggiore espansione cellulare rispetto alle altre linee: Chang et al (2006) osservarono una velocità di proliferazione maggiore per

le cellule cordonali rispetto a quelle midollari, a conferma di quanto già affermato circa le differenze tra cellule fetali ed adulte. La lunghezza media dei telomeri nelle cellule cordonali è infatti di 12,0 kb, rispetto ai 10,0 kb delle cellule midollari (Chang et al 2006). Per quanto riguarda invece la caratterizzazione molecolare, le cellule staminali di sangue cordonale esprimono i markers tipici delle MSCs e sono negative per i markers caratterizzanti le cellule ematopoietiche (Biebak 2004). Le MSCs si sono anche dimostrate positive per l'Oct4, fattore di trascrizione presente in cellule indifferenziate con un elevato potere proliferativo e tipico delle cellule staminali embrionali (Tondreau et al 2005). Dal punto di vista differenziativo le cellule staminali mesenchimali da sangue cordonale presentano alcune differenze rispetto alle BMMSCs. Mentre Tondreau et al (2005) ne dimostrarono, dopo 2-3 settimane di coltura, la differenziazione osteogenica, adipogenica e condrogenica caratterizzata da vacuoli lipidici, depositi di calcio e di matrice condrogenica, Kern et al (2006) e Chang et al (2006) riportarono una maggiore potenzialità osteogenica accompagnata da una mancata o ridotta differenziazione adipogenica dei campioni trattati. Secondo quanto riportato da Kern et al (2006), la mancata differenziazione adipogenica potrebbe essere imputabile al fatto che gli adipociti si trovano solo in midollo osseo e tessuto adiposo di organismi adulti, mentre sono assenti nel midollo osseo fetale e l'adipogenesi aumenta con l'aumentare dell'età delle cellule del donatore (Gimbel et al 1996). Migliorando le tecniche colturali e di isolamento, il sangue di cordone ombelicale può essere considerato quale valida fonte alternativa di MSCs.

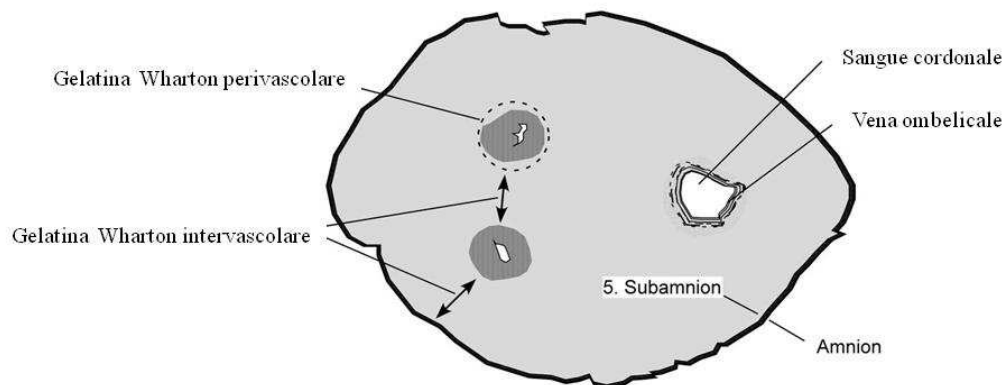
In medicina veterinaria gli studi circa il possibile isolamento di cellule staminali mesenchimali da sangue cordonale sono ancora piuttosto esigui. Nel 2005, Fuchs et al isolarono da sangue cordonale di ovino cellule mesenchimali e ne dimostrarono la validità per la ricostruzione cartilaginea mediante terapia cellulare. Nel 2006, invece, Carline et al e l'anno successivo Kumar et al (2007) isolarono cellule staminali mesenchimali da sangue

cordone di maiale. Gli Autori dimostrarono come tali cellule esprimessero markers embrionali quali Oct-4, Sox2, Nanog (Carlin et al 2006) e mesenchimali come CD29, CD49b e CD105, mentre fossero negative per markers emopoietici quali CD45 e CD133 (Kumar et al 2007); le cellule isolate andarono inoltre incontro a differenziazione osteogenica, adipogenica e condrogenica. Nella specie equina, nello stesso anno Kock et al (2007) per primi isolarono dal sangue cordonale cellule aderenti fibroblasto-simile, con una percentuale di successo del 57%. Gli Autori osservarono la comparsa di colonie a partire dal giorno 3 di coltura; le cellule vennero mantenute in coltura per 10 passaggi successivi e il tempo di duplicazione cellulare risultò variabile da 0.49 a 1.22 giorni di coltura. Gli stessi Autori riportano poi l'avvenuta differenziazione osteogenica, condrogenica ed adipogenica delle cellule isolate. Al contrario di quanto riportato da Koch et al (2007; 2009), secondo Reed et al (2008) le cellule mesenchimali da sangue cordonale andrebbero incontro a scarsa differenziazione adipogenica, come già dimostrato anche per le MSCs isolate da sangue cordonale umano (Chang et al 2006; Kern et al 2006). Recentemente, Koch et al (2009), hanno evidenziato come la potenzialità condrogenica delle MSCs cordonali sia maggiore rispetto a quella delle BMMSCs. Infatti in queste cellule l'espressione genica di markers condrogenici è nettamente superiore, così come la concentrazione nel medium di coltura della proteina CD-RAP e la deposizione di matrice cartilaginea extracellulare (Kock et al 2009). Tale differenza potrebbe essere legata sia alla diversa età dei donatori, ma anche ad una effettiva differenza tra le due popolazioni cellulari. Data la mancanza di markers di staminalità specifici per la specie equina, resta un punto interrogativo sulla caratterizzazione molecolare di queste cellule. Con l'ausilio dell'immunoistochimica, Reed et al (2008) dimostrarono che le MSCs di sangue cordonale di cavallo sono positive a markers di staminalità embrionale come Oct4, SSEA-1, Tra 1-60 e Tra1-81, così come dimostrato precedentemente nell'uomo (Tondreau et al 2005). Anche

nel cane sono ancora scarsi gli studi sulle MSCs da sangue cordonale. Nel 2009, Seo et al isolarono MSCs cordonali che rimasero in coltura fino al passaggio 11. Gli Autori riportano la positività di tali cellule per markers quali CD29, CD44 e CD105 e la negatività per markers emopoietici quali CD14m CD34 e CD45 (Seo et al 2009). Le cellule isolate sono state sottoposte a differenziazione *in vitro* in senso osteogenico, condrogenico e neuronale, mentre anche in questa specie come nell'uomo e nel cavallo la differenziazione adipogenica è risultata pressoché negativa (Seo et al 2009).

### 2.3.2 Gelatina di Wharton

Il cordone ombelicale rappresenta il collegamento tra madre e figlio ed è composto da uno speciale connettivo mucoso di origine embrionale chiamato Wharton's Jelly (Gelatina di Wharton) che si estende a coprire l'epitelio amniotico e i vasi ombelicali (Fig.16).



**Fig. 16:** Struttura del cordone ombelicale (Can et al 2007).

Il ruolo principale di questo tessuto sembra essere quello di evitare la compressione, torsione e sanguinamento dei vasi cordonali che provvedono alla circolazione ematica

bidirezionale tra madre e feto (Can e Karahuseyinoglu 2007). Negli anni '70 e '80, i ricercatori non prestarono molta attenzione al cordone ombelicale, probabilmente perché considerato materiale di scarto dopo il parto; a partire dagli anni '90 invece due fattori portarono l'attenzione su gelatina di Wharton e matrice extracellulare cordonale. Il primo fu la ricerca di una possibile ragione e conseguente alterazione strutturale nei casi di pre-eclampsia. Infatti una serie di componenti della matrice extracellulare risultarono alterati nei casi di pre-eclampsia (Bankowski et al 1996; Bankowski et al 2004). La seconda ragione fu data dall'isolamento di cellule stromali dal cordone ombelicale, simili a quelle cellule mesenchimali isolate nell'utero in fase di sviluppo (Takechi et al 1993; Nanaev et al 1997). Tali cellule avrebbero la funzione di regolare il flusso ematico all'interno del cordone ombelicale, ed in alcuni casi la scarsa crescita fetale potrebbe essere conseguenza di una diminuzione stromale che porta a ipoplasia dei vasi ombelicali (Weissman et al 1994; Bruch et al 1997). Takechi et al (1993) e Eyden et al (1994) riportarono la presenza all'interno di tali cellule di moderate quantità intracitoplasmatiche di glicogeno, gocce lipidiche, granuli di procollagene, un ben sviluppato reticolo endoplasmatico con cisterne dilatate e un ben sviluppato apparato di Golgi con numerosi mitocondri, tutti segni di una sintesi e secrezione proteica attive. Queste caratteristiche, insieme alla presenza di prolyl-4-idrossilasi, enzima coinvolto nella sintesi di collagene, fanno sì che queste cellule siano le principali responsabili della sintesi di collagene ed altri componenti della matrice extracellulare.

Dopo il parto, viene reciso un pezzo di cordone ombelicale lungo 15-20 cm immediatamente immerso in una soluzione salina sterile addizionata di antibiotici e così trasportato in laboratorio. Una volta in laboratorio, vengono asportati i vasi mediante strappamento e la matrice cordonale viene sottoposta a digestione enzimatica, dopo essere stata sminuzzata per rompere le fibre intercellulari ed aumentare l'interfaccia tra enzima



digestivo e matrice (Can et al 2007). L'enzima digestivo maggiormente utilizzato è la collagenasi. La collagenasi di tipo I è stata largamente impiegata per la digestione tissutale e l'isolamento anche di altre cellule stromali (Sarugaser et al 2005; Fu et al 2006; Weiss et al 2006; Bailey et al 2007; Jomura et al 2007). Secondo alcuni Autori, una combinazione di questo tipo di collagenasi e ialuronidasi faciliterebbe la degradazione della matrice extracellulare e accorcerebbe i tempi richiesti per l'isolamento cellulare (Weiss et al 2006; Bailey et al 2007; Jomura et al 2007). Un punto estremamente critico resta comunque il tempo di esposizione alla collagenasi, che può durare da 30 minuti (Jomura et al 2007) a 16 ore (Wang et al 2004), e soprattutto ad una soluzione collagenasi/ialuronidasi dato che un tempo prolungato di esposizione porta ad una degradazione della lamina cellulare esterna che porta a severi danni cellulari e mancata adesione al substrato colturale (Can et al 2007). La collagenasi di tipo II o B si è dimostrata essere più efficace nella solubilizzazione delle microfibrille del cordone ombelicale rispetto ad altri tipi enzimatici (Lu et al 2006; Karahuseyinoglu et al 2007). Dopo digestione il materiale ottenuto viene filtrato con filtri di 70-100 $\mu$ m, in modo da facilitare la rimozione dei detriti tissutali (Lund et al 2007), quindi le cellule vengono sottoposte a coltura *in vitro*. La percentuale di isolamento riportata in letteratura per il sangue cordonale è abbastanza scarsa, pari solo al 60% dei campioni trattati (Erices et al 2000; Lee et al 2004), mentre dalla gelatina di Wharton le cellule sono state isolate dal 100% dei campioni (Troyer e Weiss 2008). Nel midollo osseo il numero di unità formanti colonie isolate è 1-10 per 10<sup>6</sup> cellule mononucleate (Lazarus et al 1995), mentre il numero medio isolato da cordone ombelicale è risultato relativamente alto, pari a 4/10<sup>5</sup> per campione e 10/10<sup>3</sup> per centimetro di cordone (Weiss et al 2006; Lu et al 2006; Karahuseyinoglu et al 2007). Il tempo di duplicazione cellulare è poi risultato essere inferiore per le MSCs da gelatina di Wharton rispetto alle cellule midollari essendo pari 60-85 ore (Sarugaser et al 2005;

Karahuseyinoglu et al 2007). Tale differenza sarebbe dovuta, secondo quanto dimostrato da Weiss et al (2006) alla maggior espressione della telomerasi rispetto alle BMMSCs di adulto; Karahuseyinoglu et al (2007) dimostrarono un livello di telomerasi più alto in queste cellule nei primi passaggi e poi una drastica riduzione accompagnata da un incremento del tempo di duplicazione cellulare nei passaggi più tardivi. Dato il mancato sviluppo di tumori nei casi di trapianto di MSCs isolate da Wharton's Jelly (Conconi et al 2006), è possibile presumere che esista un limite di espressione della telomerasi in queste cellule, che fa sì, a differenza delle ESCs, che queste vadano incontro fino a 30-60 divisioni ma non raggiungano mai il livello dello stato neoplastico (Karahuseyinoglu et al 2007). Le cellule isolate da matrice cordonale si sono inoltre dimostrate essere positive per i markers mesenchimali di staminalità quali CD105, CD73, CD90, CD44 mentre sono negative per i markers di staminalità emopoietica CD34, CD45, CD14, CD33 e HLA (Dominici et al 2006). Riguardo quest'ultimo antigene esistono delle discordanze tra quanto dimostrato dai diversi Autori: Sarugaser et al (2005), dimostrarono che l'espressione di HLA-1 è stabile solo in cellule fino al passaggio 5 e si perde con il congelamento, mentre Weiss et al (2006) non trovarono alcuna modificazione probabilmente a causa dei diversi fattori epigenetici determinati dalle differenti condizioni di coltura. In ogni caso, in contrasto con quanto pubblicato per altre linee cellulari fetali, è stato dimostrato che le cellule isolate da matrice cordonale hanno proprietà immunosoppressive e inibiscono la proliferazione di linfociti T: infatti i trapianti allogenici di tali cellule sono ben tollerati e la risposta immunitaria viene stimolata solo dopo trapianti multipli o in soggetti sottoposti a terapia con interferone (Cho et al 2007). Le cellule stromali inoltre si sono dimostrate scarsamente positive per alcuni fattori di trascrizione espressi dalle cellule staminali embrionali come Oct4 e Nanog (Weiss et al 2006; Carlin et al 2006). Dal punto di vista differenziativo, queste cellule presentano

alcune differenze rispetto a quelle di midollo osseo. Karahuseyinoglu et al (2007) evidenziarono come, una volta sottoposte a differenziazione adipogenica, le cellule formassero adipociti più piccoli e con gocce lipidiche multiloculari rispetto a quelli formati dalle BMMSCs. Al contrario, Baksh et al trovarono un più alto contenuto lipidico nelle cellule cordonali rispetto a quelle midollari dopo 21 giorni di coltura *in vitro* in medium da differenziazione.; ancora Lu et al (2006) invece non trovarono alcuna differenza nella differenziazione adipogenica delle due linee cellulari. Le cellule cordonali possono inoltre andare incontro a differenziazione condrogenica e, come dimostrato da Karahuseyinoglu et al (2007) la quantità di collagene di tipo II depositato nel medium condrogenico da queste cellule è notevolmente superiore rispetto a quello depositato da BMMSCs. La potenzialità osteogenica delle cellule stromali cordonali fu dimostrata per la prima volta da Wang et al (2004) che evidenziarono la formazione di aggregati positivi alla fosfatasi alcalina e noduli colorati con colorazione di Von Kossa associati all'espressione di matrice cellulare osteospecifica. Più tardi Karahuseyinoglu et al (2007) dimostrarono che la deposizione di Sali di calcio e la formazione di osteociti gradualmente aumenta nelle 4 settimane di coltura. Venne anche evidenziata la differenziazione di queste cellule in cardiomiociti (Breyman et al 2006), miociti del muscolo scheletrico (Conconi et al 2006) e neuroni (Ma et al 2005). Infine nel 2007, Wu et al differenziarono con successo tali cellule in cellule endoteliali dopo l'aggiunta al medium di coltura di fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e fattori di crescita fondamentali per fibroblasti.

In medicina veterinaria sono ancora pochi gli studi sull'isolamento di MSCs da matrice cordonale. I primi studi risalgono al 2003 quando Mitchell et al isolarono cellule stromali dalla matrice cordonale di suino in grado di differenziarsi in cellule simil-neuronali esprimenti proteine gliali di superficie. Indubbiamente, nella specie equina tali studi risultano di particolare importanza sia come possibile modello per l'uomo sia per

l'interesse nel trovare una fonte di MSCs alternativa al midollo osseo. Nel 2007, Hoynowski et al isolarono per primi MSCs da Wharton's Jelly nel cavallo. Le cellule isolate si dimostrarono sotto molti aspetti simili a quelle già isolate nell'uomo. Il tempo di duplicazione cellulare anche delle cellule equine era di circa tre giorni e come le cellule umane anche quelle equine risultarono positive a markers quali Oct4, SSEA4 (Hoynowski et al 2007; Cremonesi et al 2008), TRA-1-60, CD54, CD90, CD105 e negative per CD34, CD45 e CD133 (Hoynowski et al 2007). Gli stessi Autori, così come successivamente Passeri et al (2009), dimostrarono che anche le cellule isolate da Wharton's jelly di equino erano in grado di andare incontro a differenziazione condrogenica, osteogenica e adipogenica. Quanto riportato avvalorava l'ipotesi che anche per il cavallo, la gelatina di Wharton possa costituire una valida fonte alternativa di cellule staminali mesenchimali utilizzabili in medicina rigenerativa.

### 2.3.3 Liquido amniotico e Invogli Fetali

La gastrulazione è uno dei passaggi più importanti dello sviluppo fetale preimpianto (Snow e Bennet 1978) e prende inizio nella parte posteriore dell'embrione dopo circa 7 giorni dalla fertilizzazione. Cellule pluripotenti originate dall'epiblasto si trovano in tutti e tre i foglietti di origine embrionale (ectoderma, mesoderma ed endoderma). Dalle cellule germinali, prendono invece origine i tessuti extraembrionali quali sacco vitellino, amnion e allantoide (Downs e Harmann 1997; Downs et al 2004). Quest'ultimo va a formare il cordone ombelicale così come la parte mesenchimale della placenta corion-allantoidea (Downs e Harmann 1997; Downs et al 2004). La posizione finale degli invogli fetali è determinata da un processo di rotazione dell'embrione che si verifica intorno al giorno 8,5 di gestazione e ad uno stiramento di amnion e sacco vitellino attorno all'embrione (Kinder et al 1999). Il sacco amniotico è costituito da due membrane trasparenti, resistenti ma

sottili, che contengono l'embrione prima e successivamente il feto fino al momento immediatamente precedente il parto. La membrana interna, l'amnion, contiene il liquido amniotico e il feto, mentre la membrana esterna, il corion, contiene l'amnion e costituisce parte della placenta (Kinder et al 1999; Kaviani et al 2001). Le funzioni del liquido amniotico sono principalmente le seguenti: consentire una crescita fetale omogenea e simmetrica; proteggere embrione e feto; mantenere temperatura e pressione costanti; permettere movimenti liberi del feto, importanti per lo sviluppo muscolo scheletrico e per il flusso ematico (Baschat e Hecher 2004). Nella prima metà della gravidanza il liquido amniotico è per lo più il risultato di un trasporto attivo di sodio e cloro attraverso la membrana amniotica e la pelle fetale accompagnato dal concomitante passaggio passivo di acqua (Brace e Resnik 1999). Nella seconda metà della gravidanza, invece, la maggior parte del liquido amniotico è costituito dall'urina fetale, ed in parte dalle secrezioni dell'apparato respiratorio (Olver e Strang 1974; Mescher et al 1975). Anche l'ingestione e successiva escrezione attraverso il tratto gastrointestinale, anche se non particolarmente voluminosa, giocano un ruolo importante nella formazione del fluido amniotico (Muller et al 1994). La sua composizione quindi cambia durante la gravidanza: inizialmente risulta essere isotonico con il plasma fetale, mentre a partire dalla 24esima settimana di gravidanza nell'uomo, fino al parto risulta essere ipotonico con il plasma materno e fetale (Albuquerque et al 1999). Probabilmente tutte queste variabili giocano un ruolo fondamentale anche nella variazione della sua composizione cellulare. Già a partire dal 1979, Milunky classificò le cellule presenti all'interno del liquido amniotico in epitelioidi, cellule specifiche del liquido amniotico e fibroblastoidi: queste ultime apparirebbero più tardivamente rispetto alle altre. Più tardi, nel 1993, venne ipotizzata la presenza di cellule progenitrici, quando cellule piccole, nucleate e rotonde identificate come progenitrici ematopoietiche probabilmente derivanti dal sacco vitellino, vennero isolate prima della

dodicesima settimana di gestazione (Torricelli et al 1996). Nel 1996, venne invece ipotizzata la presenza di cellule multipotenti non ematopoietiche in grado di differenziarsi in miociti; tale studio però non diede spiegazioni circa l'origine di tali cellule (Streubel et al 1996). Per decenni poi si ipotizzò la presenza di cellule staminali mesenchimali all'interno del liquido amniotico (AFSCs), ma solo nel 2001, Kaviani et al ne dimostrarono la presenza in liquido amniotico di pecora. Gli studi successivi si concentrarono prevalentemente sul liquido amniotico di uomo, in particolare su quello ottenuto al momento della amniocentesi, esame cui ricorre un numero sempre maggiore di donne per la diagnosi prenatale di malattie genetiche del feto. Le cellule possono essere isolate dal liquido amniotico mediante centrifugazione e sospensione del pellet ottenuto in medium di coltura; le cellule mesenchimali presenti aderiscono alla plastica e dopo la prima settimana di coltura cambiano la loro morfologia allungandosi e divenendo fibroblasto simili. Tsai et al (2004), dimostrarono come queste cellule, dopo la prima settimana di coltura vadano incontro ad una rapida duplicazione, raggiungendo una confluenza dell'80% in sole 48-72 ore: il tempo di duplicazione cellulare venne infatti calcolato di 20-24 ore, di gran lunga inferiore a quello delle cellule isolate da midollo osseo e sangue cordonale. Le cellule isolate da liquido amniotico sembrano inoltre mantenere il loro cariotipo fino a 350 duplicazioni cellulari (Perin et al 2007): così come le ESCs, le cellule mantengono infatti la lunghezza dei telomeri nelle successive duplicazioni cellulari e non sembrano andare incontro a senescenza cellulare anche se mantenute in coltura per oltre due anni (Dai e Klöner 2007). La staminalità di queste cellule oltre che dalla morfologia e dal tempo di duplicazione cellulare è stata dimostrata anche dalla presenza di recettori di superficie tipici di diverse linee di cellule staminali. Nel 2003, Prusa et al ne dimostrarono la positività all'Oct4, mentre negli anni immediatamente successivi ne venne dimostrata la positività ad altri due markers embrionali, SSEA-4 (Bossolasco et al 2006). In t'Anker et al

(2003), invece evidenziarono la positività delle cellule isolate da liquido amniotico per markers tipicamente mesenchimali quali CD90, CD105, CD73 e la negatività invece per markers ematopoietici quali CD45, CD34 e CD14. Nel 2007, DeCoppi et al dimostrarono invece la positività di queste cellule per il recettore di membrana c-kit. Questo è una protein-tirosin chinasi, fattore specifico delle cellule staminali, che sembra essere coinvolto nell'embriogenesi, ma anche nell'ematopoiesi. Altri Autori ne suggerirono la presenza anche in cellule cardiache (Beltrami et al 2003) e della retina (Koso et al 2007), indicando che il recettore c-kit può identificare una popolazione di cellule staminali all'interno di organi differenti. Le cellule positive per il c-kit all'interno del liquido amniotico possono essere selezionate sia utilizzando un sorter magnetico (Magnetic Activated Cell Sorter: MACS) o a fluorescenza (FACS); secondo quanto riportato da DeCoppi et al (2007), la percentuale di cellule positive nel liquido amniotico varia da 0,8 a 1,4% dell'intera popolazione cellulare. La staminalità delle AFSCs venne poi dimostrata grazie alle loro potenzialità differenziative, potenzialità che vengono mantenute anche nei passaggi più tardivi: queste cellule sono state infatti differenziate con successo in adipociti, osteociti, miociti, cellule endoteliali, neurogeniche, epatiche condrogeniche e renali (De Coppi et al 2007; Perin et al 2007), dimostrando quindi una potenzialità notevolmente maggiore rispetto alle cellule staminali adulte, più simile a quella delle ESCs. Le AFSCs presentano quindi diverse caratteristiche in comune con le ESCs: hanno tempo di duplicazione cellulare molto rapido che si mantiene nel tempo grazie al mantenimento dei telomeri; esprimono markers di superficie embrionali; quando coltivate *in vitro* possono dare origine a corpi embrioidi, positivi ai markers di tutti e tre i foglietti embrionali; hanno elevata capacità differenziativa; sono positive per HLA-I (Delo et al 2006). Per quest'ultimo motivo, anche le AFSCs sembrano essere responsabili di una reazione immunitaria da parte dell'ospite anche maggiore di quella data dalle ESCs (Chiavegato et al 2007),

probabilmente risolvibili con immunosoppressione dei linfociti T mediante somministrazione combinata di ciclosporina A, mofetil micofenolato, leflunomide (Wennberg et al 2001). Gli stessi Chiavegato et al (2007), hanno dimostrato come, anche se, come affermato successivamente anche da You et al (2008), le AFSCs non portano alla formazione di teratomi, a differenza delle cellule embrionali, possano però andare incontro a differenziazione indesiderata una volta trapiantate *in vivo*; gli Autori dimostrarono infatti come cellule amniotiche di uomo trapiantate nel cuore di topo andassero incontro ad una differenziazione condrogenica indesiderata.

In medicina veterinaria, gli studi riguardanti il possibile isolamento di cellule staminali da liquido amniotico sono davvero esigui. Nel 2001, Kaviani et al isolarono dal liquido amniotico di pecora cellule fibroblasto simili, con rapido tempo di duplicazione cellulare. Pochi anni dopo, nel 2005, Sartore et al isolarono cellule mesenchimali da liquido amniotico di suino e, dopo espansione *in vitro*, le trapiantarono in un'area cardiaca ischemizzata artificialmente. In questo caso però le cellule utilizzate, differenziarono in linee cellulari vascolari, ma non diedero origine ad altre strutture, quali sangue, vasi linfatici e cardiomiociti, probabilmente a causa della mancata stimolazione *in vitro*. Recentemente, Choi et al (2010), hanno isolato cellule staminali mesenchimali da liquido amniotico di cane: le cellule sono risultate positive a Oct4, SOX2, Nanog, SSEA-1, SSEA-4, CD44, CD29 e CD90, negative per CD34 e si sono dimostrate in grado di andare incontro a differenziazione osteogenica, condrogenica ed adipogenica. Non esistono invece ad oggi studi circa isolamento, caratterizzazione e differenziazione di cellule staminali mesenchimali da liquido amniotico nelle altre specie animali.

In ogni caso, essendo queste cellule di recente scoperta, occorrono ancora diversi studi prima di una loro applicazione clinica su larga scala anche se rappresentano una

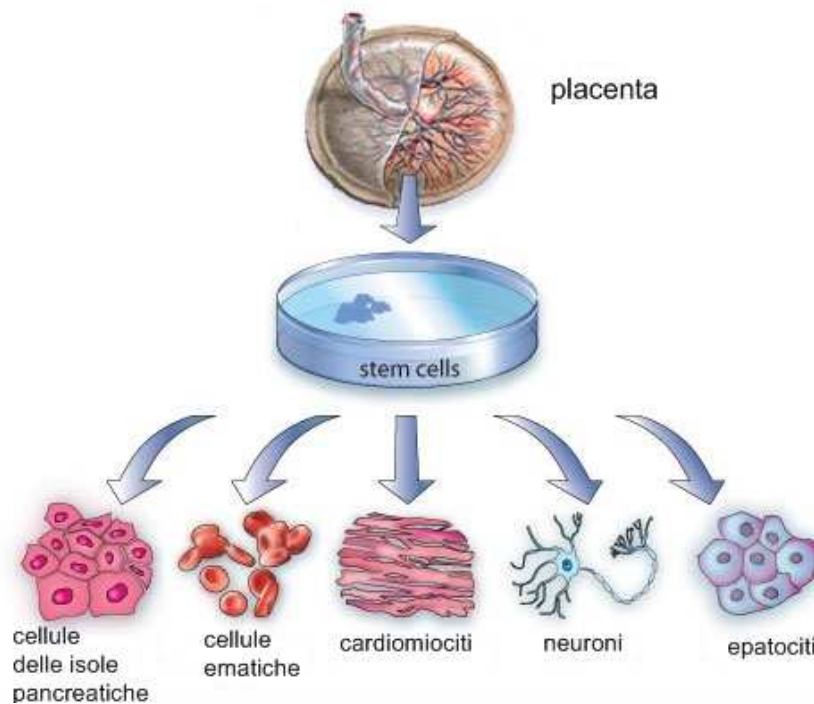


possibile fonte alternativa di cellule staminali multipotenti sia in medicina rigenerativa umana che veterinaria.

L'amnion è una sottile membrana priva di vasi composta da uno strato epiteliale e uno più esterno connettivale che si estendono sopra cordone ombelicale e pelle fetale. L'epitelio amniotico è uno strato singolo, ininterrotto di cellule cuboidali in diretto contatto con il liquido amniotico, separato dallo strato mesodermico da una lamina basale. Nello strato mesodermico, nella parte più vicina allo strato epiteliale è presente uno strato acellulare composto da fibre di collagene I e III e da fibronectina. Più in profondità, invece sono state osservate cellule mesenchimali fibroblasto simili e rari macrofagi (Parolini et al 2008). Solo recentemente è stato dimostrato che lo strato mesenchimale dell'amnion contiene due subpopolazioni, una con fenotipo cellulare mesenchimale e una invece di cellule monocita-simili (Magatti et al 2008). Uno strato spongioso di fibre collagene separa il mesoderma amniotico da quello corionico, di composizione simile al precedente (Parolini et al 2008). Come detto precedentemente, l'amnion presenta uno strato epiteliale, le cui cellule (Amniotic Epithelial Cells: AECs) sembrerebbero esprimere markers di staminalità ed avere potenzialità differenziativa in linee cellulari di tutti e tre i foglietti germinativi. Per l'isolamento delle cellule epiteliali, la membrana amniotica deve essere isolata dal corion e digerita 20-40 minuti con tripsina. Le cellule così isolate aderiscono velocemente alla plastica, proliferano per 2-6 passaggi mantenendo forma cuboidale poi la proliferazione cessa (Terada et al 2000; Miki et al 2005). Diversi Autori hanno dimostrato come la membrana amniotica contenga cellule epiteliali con differenti markers, ipotizzando una certa eterogeneità di fenotipi. Immediatamente dopo l'isolamento le AECs presentano una positività per antigene leucocitario veramente bassa (Terada et al 2000), ma, a partire dal secondo passaggio questa aumenta notevolmente. Ancora queste cellule sono positive per SSEA-3 e 4, TRA-1-60 e 1-81 (Miki et al 2005; Miki e Strom 2006),

CD34, CD133, mentre altri markers come c-kit sono negativi o espressi solo da alcune cellule ma a livelli molto bassi (Miki et al 2005; Miki e Strom 2006). D'altro lato invece, mentre l'espressione iniziale di CD90 è molto bassa, questa aumenta rapidamente durante la coltura *in vitro* (Miki et al 2005; Miki e Strom 2006). Queste cellule esprimono anche markers embrionali quali Oct 4 e Nanog (Miki et al 2005). Sakuragawa et al (1996), evidenziarono la presenza anche di markers neuronali e gliali; gli stessi Autori riportarono successivamente (2000) la differenziazione di queste cellule in epatociti. Wei et al (2003), ne dimostrarono invece la possibile differenziazione, quando coltivate per 2-4 settimane in presenza di nicotinamide, in un altro tessuto endodermico, quello pancreatico. Di maggiore interesse risultano però le cellule dello strato mesodermico di amnion e corion, anche se la letteratura riguardante queste ultime è alquanto scarsa. Entrambi i tipi cellulari possono essere isolati durante tutte le fasi della gravidanza. Solitamente le cellule di origine amniotica (AMSCs) vengono isolate dalla placenta a termine attraverso due step: 1) digestione con tripsina per isolare le AECs; 2) digestione con collagenasi (Moore et al 2003). Dall'amnion a termine gravidanza, nell'uomo, è possibile isolare circa  $1 \times 10^6$  AMSCs e  $10 \times 10^6$  AECs per grammo di tessuto (Casey et al 1996). Le cellule mesenchimali, vengono invece isolate dal corion (CMSCs) dopo rimozione meccanica ed enzimatica dello strato trofoblastico con dispasi; successivamente il tessuto corionico mesodermico viene poi digerito con collagenasi (Portman-Lanz et al 2006). Sia le AMSCs che le CMSCs aderiscono alla plastica e possono essere mantenute in coltura per 5-10 passaggi successivi. Portman-Lanz et al (2006) evidenziarono come queste cellule proliferino lentamente dopo il secondo passaggio, anche se, nell'uomo, le cellule isolate da campioni del primo trimestre di gravidanza proliferano meglio di quelle isolate da campioni raccolti a termine gravidanza. Teoricamente dall'amnion a termine potrebbero essere isolate oltre  $5 \times 10^8$  AMSCs (Alviano et al 2007), mentre in pratica, solitamente

vengono isolati circa  $4 \times 10^6$  cellule per  $100 \text{ cm}^2$  di materiale di partenza, che quadruplicano dopo un mese (secondo passaggio) (Parolini et al 2008). Al microscopio elettronico i due tipi cellulari presentano delle differenze strutturali: innanzitutto le AMSCs presentano un fenotipo intermedio tra cellule mesenchimali ed epiteliali, probabilmente segno di multi potenzialità e non evidenziato nelle CMSCs, più primitive e metabolicamente quiescenti. Queste ultime presenterebbero inoltre una maggior semplicità citoplasmatica, simile a quelle di cellule ematopoietiche (Pasquinelli et al 2007). Entrambi i tipi cellulari presentano markers di superficie simili a quelli delle BMMSCs, e sono negative per markers emopoietici (Portman-Lanz et al 2006); inoltre alcuni Autori ne riportano la positività a markers quali Oct4, SSEA-3 e 4 (Zhao et al 2005; Alviano et al 2007), e la negatività all'antigene leucocitario, indice di uno stato immunitario privilegiato (Portman-Lanz et al 2006). Sono poi state sottoposte a differenziazione attraverso le classiche linee mesodermiche (Portman-Lanz et al 2006; Alviano et al 2005), e le AMSCs sono state differenziate anche in linee ectodermiche, quali cellule neurali, endodermiche, quali cellule pancreatiche, ed altre linee mesodermiche, quali miociti scheletrici, cardiomiociti ed endotelio.



**Fig.17:** Potenzialità differenziate delle cellule staminali isolate dalla placenta. (Modificato da International Stem Cell Institute)

In medicina veterinaria, esiste solo uno studio preliminare di Lange Consiglio et al (2010), circa l'isolamento di cellule staminali da membrana amniotica prelevata da tre cavalle immediatamente dopo il parto. La membrana è stata digerita con tripsina per rimuovere le cellule epiteliali, poi digerita con collagenasi. Le cellule epiteliali presentavano forma cuboidale, mentre le AMSCs forma fibroblasto-simile e in entrambi i casi la proliferazione andava incontro a decremento a partire dal 5-6 passaggio. Entrambe le linee sono risultate positive per CD29, CD105 e CD44, e CD34. In questo studio preliminare è poi stata condotta con fine positivo la sola differenziazione osteogenica di entrambi in tipi cellulari.

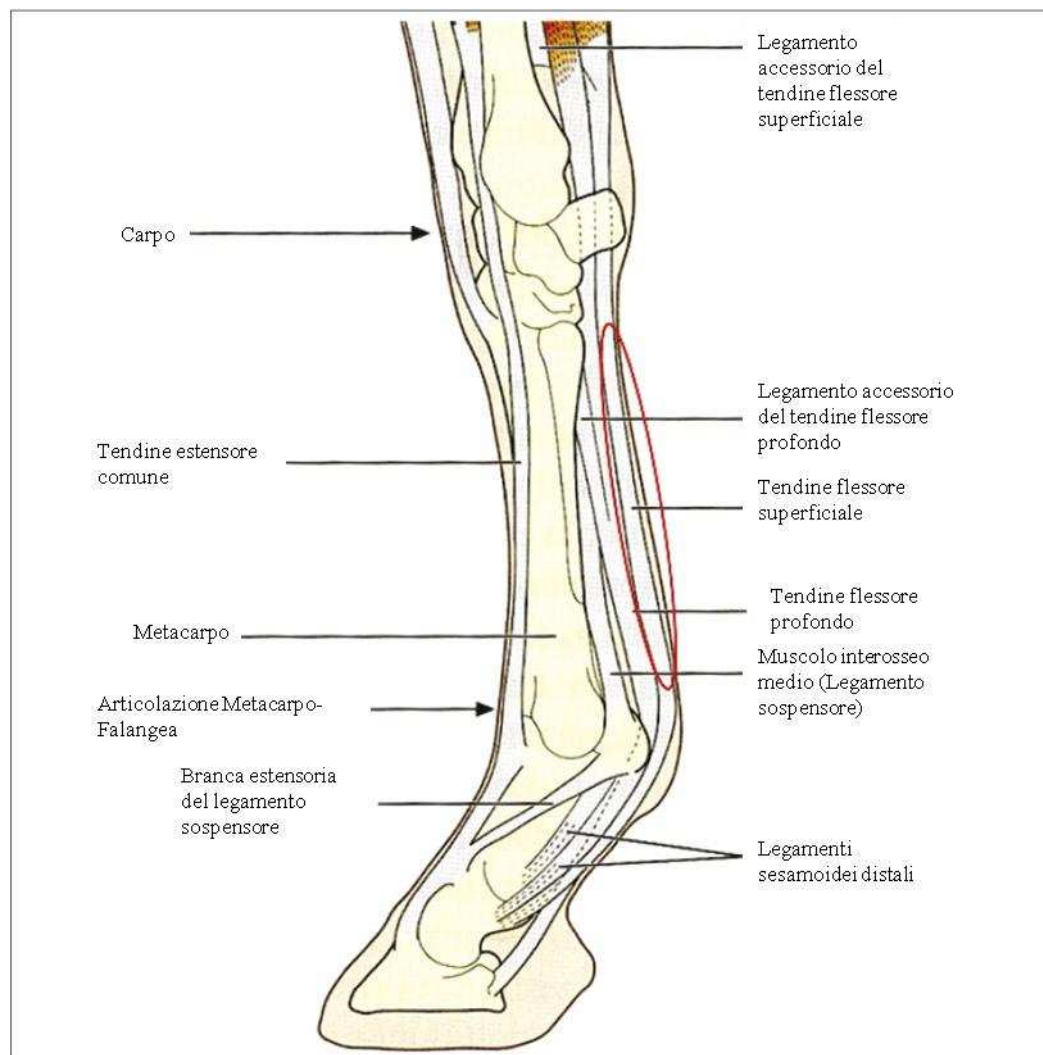
Sia in medicina umana che veterinaria sono necessari ulteriori studi sull'isolamento e la caratterizzazione delle cellule isolabili dagli involucri fetali, ma senza alcun dubbio le proprietà evidenziate in queste cellule fino ad ora, la facilità di isolamento, e la

disponibilità della placenta quale materiale di scarto, rendono l'amnion un'importante fonte di cellule per il trapianto e la terapia rigenerativa.

### **3. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE IN MEDICINA VETERINARIA**

In medicina veterinaria, così come in medicina umana, negli ultimi decenni ha assunto sempre maggiore importanza la terapia rigenerativa mediante impiego di cellule staminali. Una delle specie animali su cui si sono concentrati particolarmente gli sforzi dei ricercatori è senza dubbio la specie equina. In particolare in questa specie il maggior numero di studi riguarda l'impiego delle cellule staminali mesenchimali in lesioni tendinee e legamentose.

I tendini uniscono muscolo e segmento osseo permettendo così alle forze generate dalla muscolatura di agire sullo scheletro e dare inizio al movimento. Nei grandi quadrupedi, come i cavalli, la maggior parte della muscolatura è collocata prossimalmente per ridurre il peso il peso sulla parte distale degli arti e rendere la locomozione più efficiente. Questo rende i tendini quali flessore superficiale, flessore profondo e legamento sospensore molto lunghi. Inoltre il cavallo ha una articolazione metacarpo-falangea iperestesa, che fa sì che questi tendini collocati sulla faccia palmare dell'arto, incontrino un elevato carico di peso. In aggiunta questi stessi tendini devono assorbire e rilasciare energia elastica durante le varie fasi del passo e attutire il salto, fattori che li rendono particolarmente predisposti ad andare incontro a shock (Wilson et al 2001).



**Fig.18:** Anatomia dell' arto anteriore di cavallo (Smith e Goodship 2004)

Le tendiniti e le desmiti sono infatti le patologie più comuni riscontrate in cavalli sportivi (Gaughan 1994; Goodship et al 1994; Dyson 1997). Questo tipo di lesioni porta ogni anno a gravi perdite economiche per l'industria equina dovute ad una calo delle performance sportive, riabilitazioni prolungate e recidive; lesioni gravi o ricorrenti possono perfino portare al prematuro ritiro dalle gare e occasionalmente ad eutanasia (Rossdale et al 1985). Nei cavalli trottatori le lesioni a carico del tendine flessore superficiale sono stimate 8-30% di tutte le lesioni dei cavalli sportivi (Rossdale et al 1985; Genovese 1993), e la recidiva dopo il rientro in gara è molto alta, pari al 43-93% dei casi (Dyson 1997; Genovese et al 1996). Mentre l'alta frequenza di queste patologie è dovuta come detto precedentemente all'anatomia dell'arto, il lungo tempo necessario alla

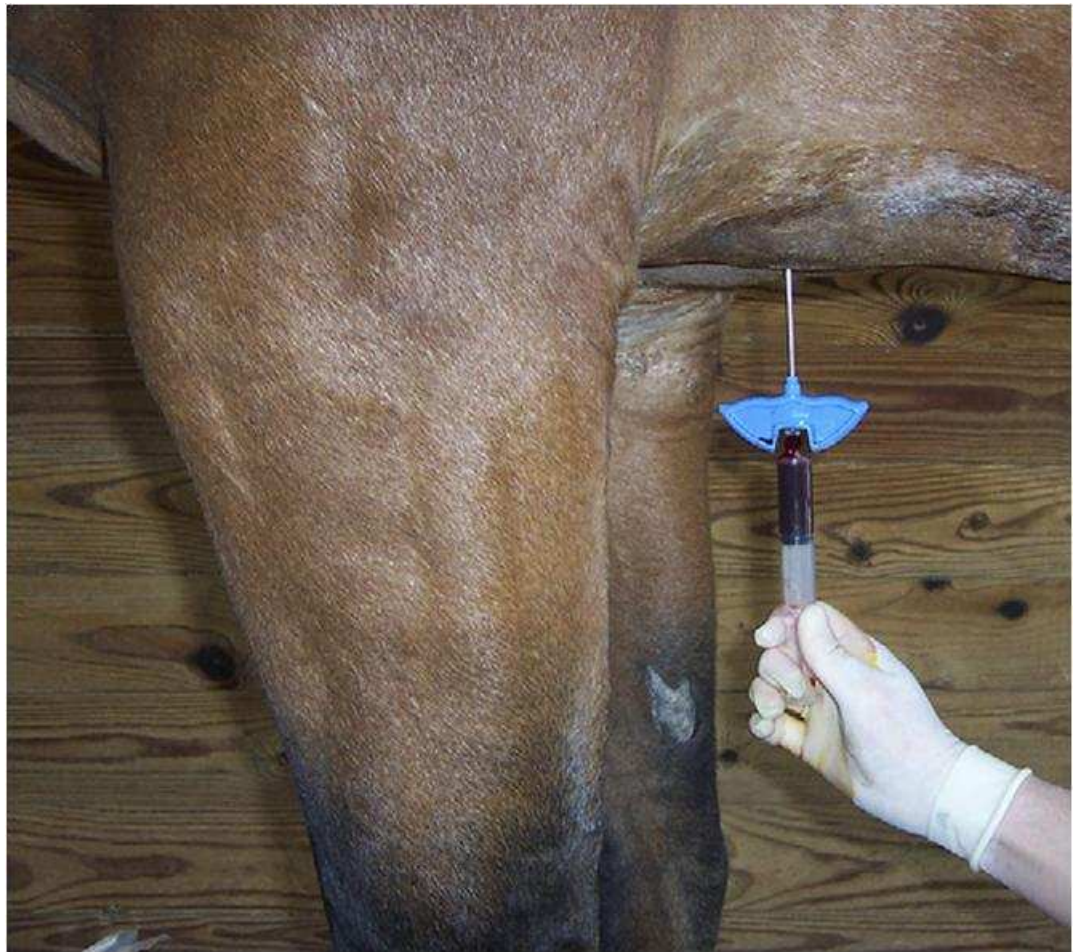
guarigione e le frequenti recidive sono dovuti principalmente alla composizione del tendine caratterizzata da una grande quantità di matrice extracellulare sorretta da un relativamente basso numero di fibroblasti altamente differenziati. Dal momento che una noxa flogogena agisce sul tendine, si attivano una serie di eventi, molto simili a quelli che si rilevano a livello di tessuti molli, come la cute, e che esitano nella formazione di tessuto fibroso. A seguito di una lesione tendinea acuta si ha la comparsa di un'emorragia intratendinea che è subito seguita da edema ed infiltrazione di macrofagi che hanno il compito di rimuovere il tessuto necrotico. La reazione infiammatoria acuta ha vita breve, solitamente si parla di qualche giorno, dopo di che i macrofagi e le piastrine infiltrate nel tessuto liberano fattori di crescita e citochine in grado di esercitare un'azione chemiotattica e proliferativa sui fibroblasti incoraggiandone la sintesi di collagene di tipo I, III e IV che andrà a formare il tessuto cicatriziale. In breve tempo, quindi, la deposizione di fibroblasti sostituisce la flogosi acuta, raggiungendo il massimo di attività dopo circa 3-6 mesi dall'infortunio. La fibroplasia è sempre associata a una neovascolarizzazione intensa, cui segue una infiltrazione cellulare massiva (Kristoffersen et al 2005). L'infiltrazione cellulare che si osserva, sembra essere inizialmente data da cellule infiammatorie della linea bianca coinvolte nella fagocitosi dei detriti generati dal tendine danneggiato; in un secondo tempo si ha l'intervento di cellule provenienti dai tessuti circostanti e in particolare dal peritoneo, la struttura costituita da connettivo lasso che forma un rivestimento protettivo intorno ai vasi ed ai nervi del tendine (Kajikawa et al 2007). Questo processo esita nella formazione di tessuto cicatriziale che riesce a fornire solamente una *restitutio* anatomica al tendine. La *restitutio* funzionale purtroppo non può essere garantita, in quanto la cicatrice ha una composizione ed una organizzazione tissutale profondamente alterata rispetto al tendine originale. Il collagene che si forma nella cicatrice, infatti, è organizzato in maniera differente dall'originale

causando una deficienza strutturale persistente della matrice e di conseguenza un calo qualitativo delle caratteristiche meccaniche del tendine (Dahlgren 2005; Wang 2006). Il tessuto cicatriziale col tempo può arrivare ad avere una resistenza alla trazione molto simile al tendine sano, ma non raggiungerà mai lo stesso grado di elasticità. Questo deficit è la causa delle ridotte performance dei cavalli rimessi al lavoro dopo il trauma, ed anche dell'elevata percentuale di recidive. Negli anni, le proposte terapeutiche per arrivare alla guarigione delle tendinopatie, sono state numerose e varie, ma nessuna di queste è risultata preferibile, con sufficiente attendibilità scientifica, al tradizionale riposo in box (Smith 2008). Ad esempio la somministrazione di inibitori della lisil-ossidasi e di beta-aminopropionitrile fumarato era stata accolta con favore, in quanto queste sostanze sono in grado di aumentare la funzionalità del tessuto cicatriziale, ritardando la formazione dei legami crociati a livello delle fibre collagene (Smith et al 2003). Ulteriori studi, però hanno messo in evidenza la manifestazione di alcuni effetti collaterali, in più bisogna considerare che il tessuto cicatriziale, anche se migliorato nelle sue caratteristiche strutturali, non sarà mai efficiente come il tessuto tendineo sano. Per questi motivi è necessario sostituire il tessuto danneggiato con una matrice il più possibile simile al tendine normale e il meno possibile simile a tessuto cicatriziale. L'obiettivo della medicina rigenerativa è proprio quello di ricostruire la normale architettura tendinea e la normale funzione biomeccanica del tendine leso. Nel cavallo oggi l'interesse clinico è prevalentemente rivolto all'applicazione di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo o midollo osseo. Ad oggi esistono tre metodiche per il trattamento di lesioni tendinee e legamentose con BMMSCs:

1. Iniezione diretta di midollo osseo in toto immediatamente dopo l'aspirazione dallo sterno: l'aspirazione viene praticata per via ecoguidata circa al centro dello sterno per evitare lo spazio tra due sternebre, che porterebbe ad aspirazione negativa, o l'introduzione

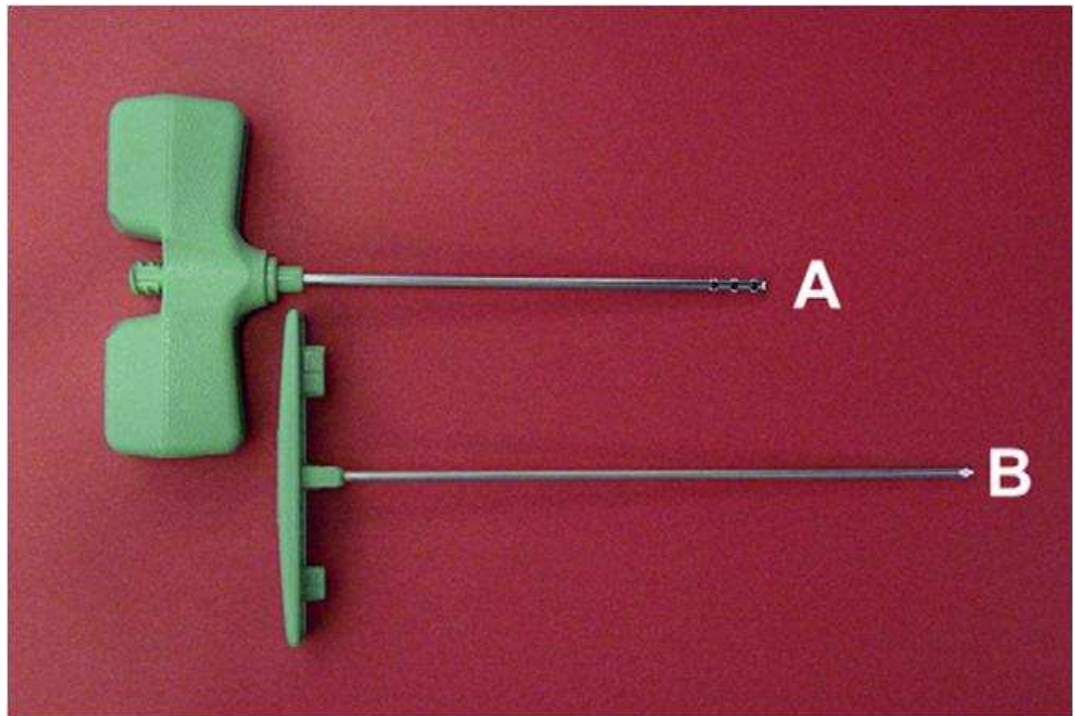


dell'ago causalmente allo sterno con conseguente perforazione cardiaca. (Fortier e Smith 2008) (Fig.19).



**Fig.19:** Prelievo di midollo osseo dallo sterno. (Fortier e Smith 2008)

Per l'aspirazione viene utilizzato un ago da biopsia midollare (Jamshidi) dotato di doppio stiletto e impugnatura a T, di dimensioni 11 G (Fig.20). Idealmente il punto tendineo di iniezione dovrebbe essere preparato in modo asettico prima di effettuare l'aspirazione midollare in modo da effettuare il trasferimento immediatamente dopo e non utilizzare anticoagulanti.



**Fig.20:** Ago Jasmidi (Fortier e Smith 2008).

Il primo ad effettuare questo tipo di terapia in caso di tendinite nella specie equina fu Herthel nel 2001: l'Autore riporta come i cavalli con desmite del legamento sospensore andassero incontro a miglioramento dopo l'inoculo di midollo osseo in toto nella sede della lesione. I vantaggi legati a questo approccio terapeutico possono essere diversi: la semplicità di esecuzione; la possibilità di effettuare la terapia immediatamente al momento della diagnosi; i costi relativamente bassi; le MSCs inoculate dovrebbero andare incontro a differenziazione in fibroblasti tendinei o legamentosi maturi sotto l'influenza di specifici segnali tissutali e produrre matrice appropriate per la riparazione (Pelled et al 2004); inoltre, essendo il midollo ricco di fattori di crescita, questi dovrebbero stimolare la guarigione tendinea e legamentosa. Esistono però anche diversi svantaggi (Smith et al 2003): innanzitutto l'esiguo numero di MSCs presenti, inadeguato per ottenere un successo terapeutico; nell'aspirato midollare possono essere presenti spicole ossee residue che potrebbero danneggiare la porzione sana del tendine; la presenza di adipociti potrebbe determinare un rallentamento nel processo di guarigione; infine il volume elevato (20-30

ml) dell'aspirato midollare potrebbe determinare un danno meccanico della matrice tendinea, provocando un incremento della pressione interna e successiva formazione di una maggiore quantità di tessuto cicatriziale (Dahlgren 2005).

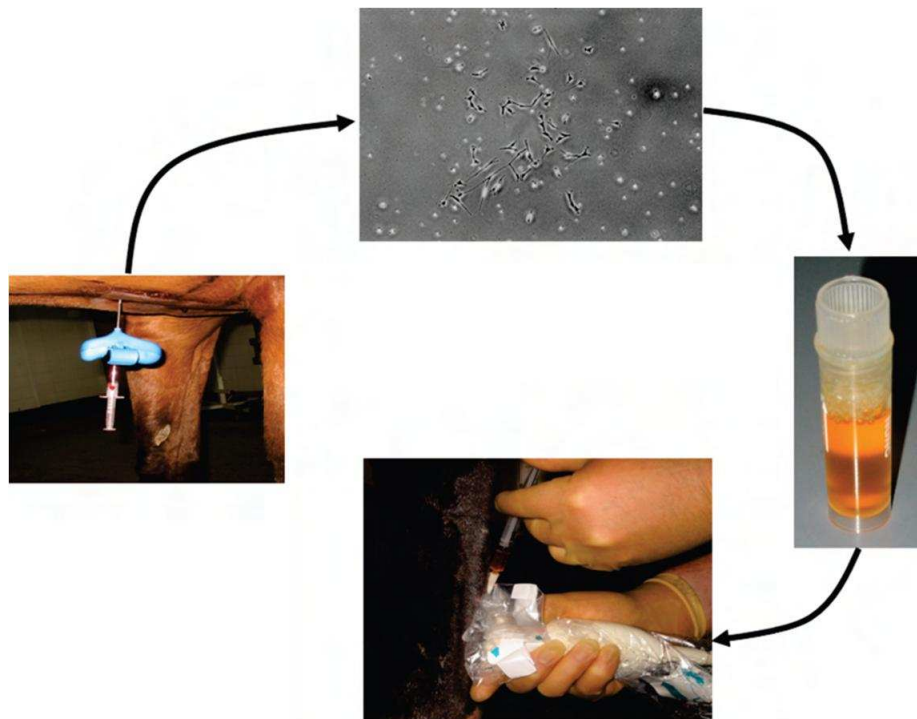
2. Centrifugazione dell'aspirato midollare e successiva inoculazione: 60 ml di aspirato midollare diluito con anticoagulante vengono centrifugati con una centrifuga Harvest Tech II per 14 minuti in modo da concentrare le cellule mononucleate, comprese le MSCs (Radcliffe et al 2006). Sembra che questa procedura possa portare ad una concentrazione di 12 volte delle MSCs (Radcliffe et al 2006). Il concentrato di aspirato midollare ha anche altri vantaggi, tra cui l'applicabilità al momento della diagnosi della lesione, e la co-presenza di tre fattori fondamentali: scaffold, fattori di crescita e cellule staminali (Smith et al 2006; Schnabel et al 2007).

3. Espansione delle BMMSCs in laboratorio per 3-4 settimane, fino ad ottenere una concentrazione di almeno  $10 \times 10^6$ . Al momento del trapianto, le cellule così espanse possono essere ri-sospese in surnatante di midollo osseo ricco di fattori di crescita (Smith et al 2006; Schnabel et al 2007) (Fig.21). Gli svantaggi sono dati prevalentemente dai costi elevati e dal tempo che intercorre tra aspirazione midollare e trapianto cellulare (Fortier e Smith 2008). Mentre i vantaggi legati a questa tecnica sono dati dalla purezza delle cellule inoculate e dall'elevato numero di cellule disponibile; è infatti stato ipotizzato che l'inoculo di cellule mesenchimali in numero superiore rispetto a quello presente normalmente all'interno del tendine possa avere un effetto positivo. Tale ipotesi è supportata dall'apparente scarsa capacità differenziativa delle cellule di origine tendinea (Strassburg et al 2006) e dalla natura della lesione stessa che invariabilmente risulta in una cavità chiusa che può contenere le MSCs impiantate e funzionare come scaffold caratterizzato anche da una buona vascolarizzazione assicurata dal tessuto di granulazione e da un ambiente meccanicamente appropriato e ricco di fattori di crescita. Inoltre le MSCs

equine selezionate in laboratorio si sono dimostrate in grado di produrre una matrice extracellulare ben ordinata, e quando trapiantate in tendine sopravvivono, proliferano ed invadono il tessuto esprimendo geni tipici dei tenociti (Richardson et al 2007). Secondo quanto riportato da Dyson (2004), il numero di cavalli soggetti a recidive, anche a carico dell'arto contro laterale, dopo impiego di cellule staminali mesenchimali scende dal 56% al 13%. Ferris et al (2009), con uno studio effettuato su cavalli sportivi con lesioni tendinee, durato due anni, evidenziarono come l'85% dei cavalli trattati ritornava al lavoro e di questi il 51% riprendeva con risultati pari o migliori dei precedenti, il 34% invece presentava risultati inferiori e solo il 15% non era in grado di riprendere l'attività sportiva. Risultati simili sono stati pubblicati anche da Pacini et al nel 2007: in particolare gli Autori evidenziarono come 9 di 11 cavalli con lesione del tendine flessore superficiale, trattati con BMMSCs presentassero una immagine ecografica tendinea eccellente 3-6 mesi dopo il trattamento e riprendessero l'attività sportiva con buoni o ottimi risultati e senza recidive 9-12 mesi dopo. Al contrario invece tutti i cavalli impiegati come controllo e trattati con protocolli classici, andarono incontro a recidiva dopo 12 mesi dal trattamento.

Fortier e Smith (2007), visualizzarono ecograficamente come maggiore sia la distanza tra diagnosi e inoculo, maggiore sia la quantità di tessuto fibroso che si forma all'interno del tendine, fattore questo che può compromettere l'esito della terapia. Secondo quanto riportato dagli stessi Autori il momento migliore per l'inoculo di cellule staminali mesenchimali sarebbe immediatamente dopo il primo periodo caratterizzato da infiammazione, prima che si formi tessuto cicatriziale. Per ovviare all'inconveniente tempo legato all'impiego di BMSCs, possono esserci due alternative: la prima può essere l'istituzione di una banca di cellule per la conservazione di BMMSCs di cavalli sportivi, la seconda invece può essere l'impiego di MSCs di altri cavalli ed in particolare di MSCs isolate da tessuto adiposo. Queste cellule infatti si sono dimostrate in grado di riparare

lesioni tendinee così come quelle isolate da midollo osseo, anche se ad oggi ancora non esistono studi effettuati su follow up di 2 anni come per il midollo osseo (Dahlgren e Nixon 2006; Fortier e Smith 2008). In ogni caso l'inoculo di cellule allogeniche non ha prodotto reazioni immunitarie cellulo-mediate nell'ospite; Gueste et al (2008), segnarono come dopo trapianto di cellule staminali mesenchimali non fossero evidenti né sintomi infiammatori, dolore o calore della parte, né, all'esame istologico, vi fosse una differenza nel numero di leucociti presenti tra lesioni trattate con cellule autologhe e lesioni trattate con cellule eterologhe. Un altro aspetto positivo dell'impiego di cellule eterologhe sia di grasso che, e soprattutto di midollo osseo, è dato dal possibile superamento dei limiti cellulari legati all'età dell'animale (Major et al 1997; Baxter et al 2004).



**Fig.21:** Approccio terapeutico mediante inoculo di cellule staminali nel tendine flessore superficiale di cavallo; da sinistra in senso orario: aspirazione di midollo osseo dallo sterno; isolamento e coltura di MSCs; risospensione di  $10 \times 10^6$  cellule in supernatante di midollo osseo; inoculo (Fortier e Smith 2007)

Nel 2007 Wilke et al utilizzarono BMMSCs nella terapia di lesioni cartilaginee a carico dell'articolazione femoro-patellare. Gli autori riportarono risultati piuttosto ambigui: da quanto evidenziato infatti le BMMSCs migliorerebbero la riparazione della

lesione solo nei primi trenta giorni post-impianto, mentre i controlli eseguiti dopo 8 mesi non hanno evidenziato differenze sostanziali neppure a livello istologico tra cavalli trattati e cavalli non trattati utilizzati come controllo. Nel 2008, Amaddeo e Canonici, riportarono il trattamento di una cisti ossea subcondrale nel femore di un cavallo di 5 anni sottoposto senza successo a ripetute artroscopie. Le cellule vennero messe, mediante l'ausilio dell'artroscopia, all'interno della cavità cistica; dopo 40 giorni dal trattamento l'esame radiografico mise in evidenza una riduzione della cisti e 8 mesi dopo il cavallo non presentava alcun segno di zoppia.

Nonostante i risultati incoraggianti ottenuti, non esistono ancora prove certe ed inconfutabili dell'efficacia di questi trattamenti; per questo saranno necessari altri trials clinici accompagnati da ricerche di laboratorio prima di poter convalidare i risultati ottenuti con questa nuova terapia.

Oltre all'apparato muscolo scheletrico, oggi si sta studiando l'effetto delle cellule staminali anche nella terapia di altre patologie nella specie equina. Carstanjen e al, nel 2006 utilizzarono BMMSCs in un caso di palatoschisi: le cellule vennero inoculate dopo aggiustamento chirurgico del difetto al fine di valutare un miglioramento della riparazione e soprattutto una riduzione di recidive che sono molto frequenti e inficiano il risultato dell'intervento. I risultati ottenuti furono incoraggianti, con una correzione del difetto del 90%. All'istologia, le cellule iniettate marcate con 5-bromo-2-desoxymidine (BrdU) e con chloromethylbenzamido-DiI-derived (cm-DiI) sono state evidenziate da un'intensa colorazione per entrambe i reagenti dimostrando un'integrazione delle cellule nel tessuto cicatriziale.

Tra gli animali domestici un'altra specie in cui gli sforzi dei ricercatori si stanno concentrando sull'applicazione di cellule staminali è la specie canina, utilizzata quale

modello per diverse patologie umane quali lesioni spinali, diabete, infarto cardiaco, lesioni osteo articolari e dentali.

Anche se si ritiene che la maggior parte del dolore a carico della schiena si crede sia determinato da una degenerazione del disco intervertebrale, i dettagli della degenerazione discale non sono ancora del tutto chiariti. Istologicamente, un disco normale è costituito da un nucleo centrale polposo sorretto da un anello fibroso. Il nucleo polposo è formato principalmente da fibre collagene di tipo II caratterizzate da abbondante acqua e proteoglicani extracellulari. Al contrario, l'anello fibroso è composto da anelli concentrici di collagene di tipo I (Hayes et al 2001; Horner et al 2001). I trattamenti utilizzati per la terapia di patologie discali sono diversi e per lo più chirurgici; questi però sono spesso accompagnati da problemi postoperatori legati all'instabilità dei dischi intervertebrali adiacenti (Lee 1988; Hilibrand et al 1999). Per questo le nuove frontiere terapeutiche hanno come obiettivo il mantenimento del movimento attraverso il controllo della degradazione discale. Anche se non esistono markers specifici per il nucleo polposo e l'anello fibroso, questi hanno caratteristiche cellulari simil-cartilaginee (Sive et al 2002); per questo data la potenzialità differenziativa delle MSCs gli sforzi dei ricercatori si stanno concentrando sulla loro applicabilità in tali patologie. Lim et al nel 2007, utilizzarono cellule isolate da cordone ombelicale in animali con lesione spinale indotta. Gli Autori riportarono un miglioramento di funzionalità e sensibilità negli animali sottoposti a trapianto allogenico di MSCs da sangue cordonale, anche alla risonanza magnetica e all'istologia non venne evidenziata una rigenerazione tissutale, ma nemmeno un incremento del danno o presenza di reazione infiammatoria post-trapianto. Ancora venne evidenziata la formazione di nuove fibre neuronali e i risultati ottenuti portarono gli Autori ad affermare che l'impianto di MSCs porti comunque ad un recupero della funzione nervosa in animali con danno spinale.

Hiyama et al (2007), dopo trapianto di BMMSCs in cani con lesione discale, non riportarono una guarigione completa ma osservarono comunque un netto miglioramento rispetto agli animali sottoposti a trattamento tradizionale. A carico dell'apparato locomotore sono diversi gli studi effettuati su questa specie così come su quella equina. Oltre il 20% dei cani sono affetti da osteoartrite dell'articolazione coxofemorale che provoca intenso dolore. Tale patologia è caratterizzata dalla degenerazione della cartilagine articolare con perdita di matrice, fibrille e formazione di fessure fino alla perdita completa della superficie cartilaginea. Tutto questo è determinato da una sovrapproduzione da parte dei condrociti di enzimi digestivi e mediatori pro-infiammatori che porta a un bilancio a favore del catabolismo anziché dell'anabolismo. L'impiego di antiinfiammatori non steroidei, largamente impiegati per il trattamento di questa patologia, spesso non porta ad una completa risoluzione del dolore. Black et al nel 2007 e successivamente nel 2008 effettuarono impianti di cellule staminali isolate da tessuto adiposo in cani con questa patologia ottenendo importanti risultati in termini di riduzione del dolore e ripresa dell'attività motoria. Risultati soddisfacenti sono stati raggiunti anche da Jang et al mediante applicazione di MSCs isolate da sangue cordonale in cani con lesioni ossee indotte. Infatti gli Autori evidenziarono un miglioramento della radioopacità del segmento osseo leso dopo impianto e istologicamente venne evidenziata una maggior deposizione di matrice ossea nei cani trattati con MSCs.

Recentemente diversi studi sono stati effettuati circa l'impiego di cellule staminali mesenchimali in animali infartuati. Vela et al (2009), hanno effettuato uno studio istologico sul ruolo delle MSC nei processi di riparazione nella fase subacuta di infarto miocardico nel cane. Sette giorni dopo l'occlusione dell'arteria coronaria sinistra, i cani hanno ricevuto, per via transendocardica o intracoronarica, l'inoculo di  $100 \times 10^6$  BMMSCs allogeniche marcate con DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindole). All'autopsia



eseguita 21 giorni dopo, gli Autori hanno evidenziato negli animali trattati, rispetto al controllo, minori aree necrotiche e maggior deposizione di matrice extracellulare, a conferma del fatto che in fase infartuale subacuta le MSCs agiscono positivamente sulla riparazione tissutale, apparentemente attraverso differenziazione in cellule differenti dalle cellule cardiache mature (Vela et al 2009).

Altra patologia di grande interesse anche per la medicina umana è il diabete. Uno studio effettuato da Zhu et al nel 2009, ha evidenziato come l'inoculo intraepatico di BMMSCs autologhe in cani con diabete sperimentalmente indotto, porti ad un incremento del peso corporeo dell'11% circa e livelli medi di glucosio nel sangue di  $9,78 \pm 3,11$  mmol/L a 112 giorni dal trattamento rispetto alle  $22,5 \pm 3,22$  mmol/L degli animali non trattati, anche se in ogni caso manca una efficienza delle isole pancreatiche. Indubbiamente sono necessari ulteriori studi circa gli effetti della terapia cellulare in soggetti diabetici, ma, da come si evince da questo studio, può essere considerata una valida alternativa nello studio del diabete di tipo I.

Nonostante i risultati positivi fin qui ottenuti nell'applicazione clinica delle cellule staminali negli animali domestici sono necessari ulteriori studi circa i loro possibili impieghi non solo nella specie equina e canina ma anche su altre specie di interesse economico ed affettivo e potenziali modelli di patologie umane come la specie felina

## **PARTE SPECIALE**

### **1. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAZIONE, CARATTERIZZAZIONE E**

#### **APPLICAZIONI CLINICHE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI**

#### **ISOLATE DA TESSUTO ADIPOSO E MIDOLLO OSSEO NELLA SPECIE EQUINA**

##### **1.1 Materiali e Metodi**

###### **1.1.1 Prelievo dei campioni e isolamento delle cellule**

I campioni di tessuto adiposo e midollo osseo sono stati prelevati in parte da animali afferenti al Servizio di Ricovero e Accettazione Grossi Animali e di Chirurgia del Dipartimento Clinico Veterinario, Università di Bologna, a seguito di zoppia; la restante parte è stata invece prelevata da soggetti stabulati presso la scuderia d'origine. In quest'ultimo caso il prelievo e il successivo inoculo sono stati effettuati in loco dal medico veterinario di referenza. Tutte le procedure sugli animali sono state effettuate in accordo con il DL 116/92, e previa approvazione del Comitato Etico dell'Università di Bologna e del Ministero della Salute.

Tutti i reagenti utilizzati sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) se non diversamente specificato. Piastre, provette e flask utilizzate sono stati acquistati presso Sartstedt Inc. (Newton, NC, USA).

###### *1.1.1.1 Tessuto adiposo*

Per il prelievo di tessuto adiposo, data la quantità di materiale disponibile, l'assenza di grossi vasi e la facilità di accesso, è stata scelta l'area sottocutanea al disopra del

muscolo gluteo dorsale. Gli animali sono stati sottoposti a sedazione con acepromazina (30µg/Kg; Prequillan, Fatro, Bologna, Italia), detomidina (10µg/Kg; Domosedan, Orion Corporation, Finlandia) e butorfanolo (30µg/Kg; Dolorex, Intervet, Milano, Italia) e successivamente si è provveduto all'infiltrazione sottocutanea con lidocaina al 2% (Fort Dodge Animal Health, USA). Previa rasatura, pulizia e disinfezione dell'area, parallelamente alla spina dorsale e a 15 cm di distanza da questa è stata effettuata un'incisione di 10 cm in lunghezza, tale da evidenziare il tessuto adiposo presente. Il tessuto così prelevato è stato quindi posto in una provetta sterile da 50 ml e immerso in PBS addizionato con antibiotici (100 UI/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina) e mantenuto a +4°C per un tempo massimo di 12 ore. La cute è stata successivamente suturata con monofilamento in nylon e gli animali sottoposti a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni (ampicillina 5mg/Kg/die; Vetamplus, Ati, Bologna, Italia; flunixinina sale di meglumina 1,1 mg/Kg; Meflosyl, Fort Dodge Animal Health, USA).

Una volta in laboratorio i campioni sono stati lavati per tre volte con una soluzione di PBS e antibiotici, quindi pesati e tagliati con forbici sterili in pezzetti di circa 1 cm<sup>2</sup>. Il materiale ottenuto è stato quindi immerso in una soluzione allo 0,1% di collagenasi di tipo IV (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) in PBS (1ml di soluzione/1g di campione) e posto a bagno maria a 37°C per 1-2 ore. Dopo questo periodo di tempo, per neutralizzare l'enzima, il tessuto digerito è stato diluito 1:1 con terreno di coltura costituito da DMEM/TCM199 (1:1), 10% FBS (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA), 100 UI/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina. La soluzione ottenuta è stata quindi filtrata, per eliminare i pezzi di tessuto non digeriti, e sottoposta a centrifugazione a 1500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato lavato per tre volte in terreno di coltura mediante

centrifugazione a 1500 rpm per 10 min, quindi si è provveduto a contare le cellule mediante emocitometro.

#### *1.1.1.2 Midollo Osseo*

I campioni di midollo osseo sono stati ottenuti mediante aspirazione con ago da biopsia midollare Jamshidi di 11 G dall'ala dell'ileo. Gli animali sono stati sottoposti a sedazione con acepromazina (30µg/Kg; Prequillan, Fatro, Bologna, Italia), detomidina (10µg/Kg; Domosedan, Orion Corporation, Finlandia) e butorfanolo (30µg/Kg; Dolorex, Intervet, Milano, Italia) e successivamente si è provveduto all'infiltrazione sottocutanea con lidocaina al 2% (Fort Dodge Animal Health, USA). L'area è quindi stata rasata, pulita e disinfettata prima di procedere con l'aspirazione del materiale midollare in siringhe sterili da 60 ml (IMI, Padova, Italy) contenenti 2 ml di eparina (Eparina Vister 5000 UI/ml. Marvecspharma, Milano). Dopo il prelievo, gli animali sono stati sottoposti a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni (ampicillina 5mg/Kg/die; vetamplius, Ati, Bologna, Italia; flunixinina sale di meglumina 1,1 mg/Kg; Meflosyl, Fort Dodge Animal Health, USA).

Una volta in laboratorio i campioni sono stati diluiti 1:1 con PBS addizionato di antibiotici e sottoposti a centrifugazione a 1500 rpm per 15 minuti. Il surnatante è quindi stato rimosso e il pellet risospeso in 5ml di terreno di coltura. Per separare la componente cellulare nucleata e i globuli rossi, il campione è stato posto su 5 ml di una soluzione di Percoll (particelle di silice rivestite di polivinilpirolidone) al 70% in una provetta da 50 ml. La centrifugazione è stata effettuata a 3000 rpm per 30 minuti. Le cellule a livello di interfaccia tra le due soluzioni sono state aspirate e, per eliminare i cristalli di Percoll dannosi per le cellule, lavate per 3 volte con terreno di coltura mediante centrifugazione a

1500 rpm per 10 minuti. Dopo tale procedura si è provveduto a contare le cellule mediante emocitometro.

### 1.1.2 Espansione cellulare *in vitro*

Per tutte e due le linee cellulari, le cellule primarie sono state seminate in flask da 25 cm<sup>2</sup> ad una densità di 5 x 10<sup>4</sup> cellule per cm<sup>2</sup> e incubate in atmosfera umidificata a 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura è stato cambiato per la prima volta dopo 48 ore e successivamente due volte a settimana fino ad ottenere una confluenza pari all'80%. A questo punto le cellule sono state staccate dalla flask mediante digestione enzimatica con una soluzione allo 0.05 % di tripsina; dopo un tempo massimo di 10 minuti, la tripsina è stata inattivata mediante aggiunta di 5ml di medium di coltura addizionato 10% di FBS, quindi la soluzione cellulare ottenuta è stata posta in provette da 10 ml e centrifugata per 6 minuti a 700 rpm. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato diluito con 1 ml di terreno di coltura, le cellule contate con un emocitometro e riseminate come "Passaggio 1" (P1) ad una densità di 25 x 10<sup>3</sup> cellule/cm<sup>2</sup>. Per i passaggi successivi le cellule sono state poste in flask da 25 cm<sup>2</sup> a 25x 10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup> e lasciate moltiplicare per 6/7 giorni fino al raggiungimento di una confluenza del 90% prima della tripsinizzazione e successivo passaggio. Il tempo di duplicazione cellulare, il numero di duplicazioni cellulari e il tempo di coltura cellulare, sono stati calcolati per ogni passaggio utilizzando le due formule seguenti (Vidal et al., 2007):

$$CD = \ln (N_f / N_i) / \ln (2) \quad (1)$$

$$DT = CT / CD \quad (2)$$

CD numero di duplicazioni cellulari

N<sub>f</sub> numero finale di cellule

N<sub>i</sub> numero iniziale di cellule

DT tempo di duplicazione cellulare

CT tempo di coltura cellulare

I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard e sono stati analizzati mediante ANOVA (Statistica for Windows-Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0.05$ .

### 1.1.3 Differenziazione *in vitro*

#### 1.1.3.1 Differenziazione Condrogenica

Le cellule espanse al passaggio P3 dopo lavaggio con PBS, sono state sottoposte a tripsinizzazione e successiva centrifugazione a 700 rpm per 6 minuti. Dopo conta cellulare,  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> sono state risospese in 2 ml di medium di coltura e poste in piastre 6 well in incubatore a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub> per 24 ore al fine di ottenere l'adesione cellulare. Dopo questo periodo di tempo il medium è stato sostituito con medium da differenziazione condrogenica consistente in TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 6.25 µg/ml di insulina, 50 nM di acido ascorbico, 0.1 µM di desametasone, 10 ng/ml hTGF-β1 (PeproTech, UK) e 1% FBS (Mizuno e Hyakusoku, 2003). Le cellule sono quindi state coltivate in monostrato a 38,5°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 21 giorni e il medium da differenziazione è stato cambiato completamente due volte a settimana. Passate le tre settimane di coltura, le cellule sono state fissate in formalina al 10% per un'ora a temperatura ambiente; successivamente è stato effettuato un lavaggio con acqua demineralizzata e le cellule sono state colorate con una soluzione in acido acetico di Alcian Blu (1% in una soluzione al 3% di acido acetico; pH 2.5) per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo questo tempo la soluzione di Alcian Blu è stata rimossa e le cellule lavate per tre volte con una soluzione di acido acetico al

3% al fine di eliminare i residui di colorante. La colorazione impiegata colora in blu i depositi di glicosaminoglicani intra ed extra cellulari caratteristici della condrogenesi.

### *1.1.3.2 Differenziazione Osteogenica*

Le cellule espanse al passaggio P3 sono state lavate con PBS, sottoposte a tripsinizzazione e successiva centrifugazione. Una volta diluito il pellet ottenuto con 1 ml di medium da coltura e contate le cellule, queste sono state poste in piastre 6 well alla densità di  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in 2 ml di terreno di coltura per 24 ore al fine di ottenere l'adesione cellulare. Passato questo tempo, il terreno è stato sostituito con medium da differenziazione consistente in TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 10% di FBS, 10 mM di β-glicerofosfato, 0.1 µM di desametazone, 50 µM di acido ascorbico (Mizuno e Hyakusoku, 2003). Le cellule sono state coltivate, a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub>, in monostrato per tre settimane e il medium è stato completamente cambiato due volte a settimana.

L'avvenuta osteogenesi, caratterizzata dai depositi di calcio, è stata evidenziata dopo tre settimane di coltura utilizzando la colorazione di von Kossa e Alizarin Red. Per la colorazione di von Kossa, le cellule sono state fissate in una soluzione di formalina al 10% per un'ora a temperatura ambiente, quindi lavate con acqua bidistillata, ricoperte con una soluzione al 5% di nitrato di argento e successivamente esposte alla luce gialla per 15 minuti. I depositi di calcio fosfato si colorano di nero. Per effettuare la colorazione Alizarin Red, le cellule sono invece state fissate per un'ora a temperatura ambiente in una soluzione di etanolo al 70%; successivamente sono state lavate con acqua bidistillata quindi ricoperte con una soluzione al 2% di Alizarin Red per 30 minuti. Dopo 4 lavaggi con acqua bidistillata, i depositi di calcio si colorano di arancione-rosso.

### 1.1.3.3 Differenziazione Adipogenica

Al passaggio P3 di coltura, le cellule, dopo tripsinizzazione e successiva centrifugazione sono state poste in piastre 6 well ad una densità di  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in 2 ml di medium di coltura per 24 ore per farsi che le cellule aderissero alla piastra. Dopo 24 ore il medium è quindi stato sostituito con terreno da differenziazione adipogenica costituito da TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina, 15% di siero di coniglio, 1 µM di desametazone, 0.5 mM di isobutil-metilxantina, 10 mM di insulina, 0.2 mM di indometacina, (Mizuno e Hyakusoku 2003; Koch et al 2007). Le cellule sono state coltivate in monostrato a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 74 ore, il medium è stato sostituito da medium nuovo privo di isobutil-metilxantina, e successivamente le cellule sono state mantenute in coltura per 21 giorni e il terreno sostituito 2 volte a settimana (Schuh et al 2009). Dopo questo periodo di tempo le cellule sono state fissate con una soluzione al 10% di formalina per 1 ora a temperatura ambiente, quindi lavate con acqua bidistillata e successivamente con isopropanolo al 60% per 5 minuti e quindi colorate con una soluzione di Oil Red O (0.3% in isopropanolo 60%) per 5 minuti. Passato questo tempo la soluzione di colorante è stata rimossa e le cellule lavate con acqua bidistillata. I vacuoli lipidici vengono colorati in rosso.

Differenziazione	Medium	Siero %	Supplementi
Controllo	DMEM-TCM199	10% FBS	100 UI/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina
Adipogenica	DMEM-TCM199	15% Siero coniglio	100 UI/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina, 1 µM desametazone, 0.5 mM isobutil-metilxantina, 10 mM insulina, 0.2 mM indometacina
Osteogenica	DMEM-TCM199	10% FBS	100 UI/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina, 10 mM β-glicerofosfato, 0.1 µM desametazone, 50 µM acido ascorbico
Condrogenica	DMEM-TCM199	1% FBS	100 UI/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina, 6.25 µg/ml insulina, 50 mM acido ascorbico, 0.1 µM desametazone, 10 ng/ml hTGF-β1

**Tab.1:** Medium impiegati per la differenziazione adipogenica, osteogenica e condrogenica di tutte le linee cellulari isolate.



#### 1.1.4 Caratterizzazione molecolare

Una volta raggiunto il passaggio P3, le cellule sono state inoltre sottoposte a caratterizzazione molecolare. Per questo sono state lavate con PBS e staccate dalla superficie della piastra mediante a tripsinizzazione per massimo 10 minuti; successivamente la tripsina è stata inattivata con PBS+10%FBS, e le cellule sono state lavate mediante centrifugazione a 600 rpm per 5 minuti per due volte. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet è stato sospeso in 100 µl di Intraprep Kit Reagent 1 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) e incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 4 ml di PBS e la soluzione è stata centrifugata a 600 rpm per 5 min. Il pellet di cellule ottenuto, risospeso in 100 µl di PBS è stato incubato per 20 minuti a temperatura ambiente con anticorpi CD105, CD90, CD44, CD45, CD34, CD14 e CD73 direttamente coniugati con FITC o APC (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Sono stati utilizzati appropriati isotopi coniugati di controllo (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Dopo colorazione, le cellule sono state lavate per due volte con PBS e l'intensità della fluorescenza è stata valutata con citofluorimetro dotato di doppio laser FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) e i risultati successivamente analizzati con programma CXP.

## 1.2 Applicazioni Cliniche

Caso Clinico 1:

Segnalamento:

Cavallo di razza Sella Italiano, maschio intero, di 2 anni di età, peso 450 kg.

Anamnesi:

Il medico veterinario referente è stato chiamato dal proprietario dopo che, a seguito di un allenamento, l'animale ha presentato una zoppia a carico dell'arto anteriore sinistro.

All'esame ecografico, il veterinario ha riscontrato una lesione a carico del tendine flessore superficiale.

Terapia:

Il medico veterinario e il proprietario hanno optato per l'inoculo di cellule staminali mesenchimali autologhe. Il soggetto è quindi stato sottoposto in loco, al prelievo di 4,5 g di tessuto adiposo dall'area sottocutanea al di sopra del muscolo gluteo dorsale. Dopo il prelievo il cavallo è stato sottoposto a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni.

In laboratorio le cellule sono state isolate come descritto precedentemente. Dopo una settimana di coltura in vitro, sono state spedite al medico veterinario  $10 \times 10^6$  cellule in 1 ml di medium di coltura. Una volta ricevute le cellule, il medico veterinario ha provveduto all'inoculo per via ecoguidata all'interno della lesione. Il cavallo è stato quindi sottoposto a esercizio come riportato in Tabella 1.1.

LESIONE	PERIODO DELLE PASSEGGIATE A MANO SU TERRENO DURO	
	7 – 20 GIORNI	20-60 GIORNI
LIEVE	passeggiare a mano 15 minuti per due volte al giorno	aumentare il tempo di esercizio di 5 minuti per settimana
MODERATA	passeggiare a mano 10 minuti per due volte al giorno	aumentare il tempo di esercizio di 5 minuti per settimana
GRAVE	passeggiare a mano 5 minuti per due volte al giorno	aumentare il tempo di esercizio di 5 minuti per settimana

PROGRESSIONE DELLA LESIONE	<b>PERIODO DELLE PASSEGGIATE MONTATO SU TERRENO DURO</b>	
	<b>60 – 90 GIORNI</b>	<b>90-120 GIORNI</b>
BUONA	pasceggiare il cavallo montato per 25 minuti aumentando di 5 minuti alla settimana il tempo di esercizio	aumentare il tempo di esercizio di 5 minuti per settimana
MEDIA	pasceggiare il cavallo montato per 25 minuti aumentando di 5 minuti alla settimana il tempo di esercizio	aumentare il tempo di esercizio di 5 minuti per settimana
SCARSA	pasceggiare a mano 60 minuti al giorno	pasceggiare il cavallo montato per 20-30 minuti

PROGRESSIONE DELLA LESIONE	<b>PERIODO DELLE PASSEGGIATE MONTATO E DI INIZIO LAVORO LEGGERO SU TERRENO DURO</b>	
	<b>120 – 150 GIORNI</b>	<b>150-180 GIORNI</b>
BUONA	pasceggiare il cavallo montato per un ora addizionando 5 minuti di trotto ogni due settimane	aumentare il tempo di esercizio di 5 minuti ogni due settimane
MEDIA	pasceggiare il cavallo montato per un ora	aumentare il tempo di esercizio di 5 minuti per settimana
SCARSA	rivalutare la terapia	rivalutare la terapia

PROGRESSIONE DELLA LESIONE	PERIODO DELLA PROGRESSIONE DEL LAVORO	
	180- 210 GIORNI	210- 240 GIORNI
BUONA	addizionare il lavoro con 5 minuti di canter ogni due settimane	aumentare di 5 minuti il tempo di galoppo ogni 2 settimane, iniziando il lavoro sulle barriere a terra
MEDIA	passaggiare il cavallo montato per un ora addizionando 5 minuti di trotto ogni due settimane	aumentare di 5 minuti il tempo di galoppo ogni 2 settimane
SCARSA	rivalutare la terapia	rivalutare la terapia

**Tab.1.1:** Schema di riabilitazione post-inoculo di cellule staminali mesenchimali in lesione tendinea o legamentosa.

Caso Clinico 2:

Segnalamento:

Cavallo di razza Sella Italiano, femmina intera, di 3 anni di età, peso 430 kg.

Anamnesi:

Il medico veterinario referente è stato chiamato dal proprietario dopo che, a seguito di un infortunio in gara, l'animale ha presentato una zoppia a carico dell'arto anteriore destro. All'esame ecografico, il veterinario ha riscontrato una lesione a carico del tendine flessore superficiale.

Terapia:

Il medico veterinario e il proprietario hanno optato per l'inoculo di cellule staminali mesenchimali autologhe. Il soggetto è quindi stato sottoposto in loco, al prelievo di 5,5 g di tessuto adiposo dall'area sottocutanea al di sopra del muscolo gluteo dorsale. Dopo il prelievo il cavallo è stato sottoposto a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni.

In laboratorio le cellule sono state isolate come descritto precedentemente. Dopo una settimana di coltura in vitro, sono state spedite al medico veterinario  $7,5 \times 10^6$  cellule in 1 ml di medium di coltura. Una volta ricevute le cellule, il medico veterinario ha provveduto all'inoculo per via ecoguidata all'interno della lesione. Il cavallo è stato quindi sottoposto a esercizio come riportato in Tabella 1.1.

#### Caso Clinico 3:

##### Segnalamento:

Cavallo di razza Trottatore, femmina intera, di 7 anni di età, peso 450 kg.

##### Anamnesi:

Il medico veterinario referente è stato chiamato dal proprietario dopo, che a seguito di un infortunio in gara, l'animale ha presentato una zoppia a carico dell'arto anteriore sinistro. All'esame ecografico, il veterinario ha riscontrato una lesione a carico del tendine flessore superficiale.

##### Terapia:

Il medico veterinario e il proprietario hanno optato per l'inoculo di cellule staminali mesenchimali autologhe. Il soggetto è quindi stato sottoposto in loco, al prelievo di 6,67 g di tessuto adiposo dall'area sottocutanea al di sopra del muscolo gluteo dorsale. Dopo il prelievo il cavallo è stato sottoposto a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni.

In laboratorio le cellule sono state isolate come descritto precedentemente. Dopo una settimana di coltura in vitro, sono state spedite al medico veterinario  $22 \times 10^6$  cellule in 1 ml di medium di coltura. Una volta ricevute le cellule, il medico veterinario ha provveduto all'inoculo per via ecoguidata all'interno della lesione. Il cavallo è stato quindi sottoposto a esercizio come riportato in Tabella 1.1.

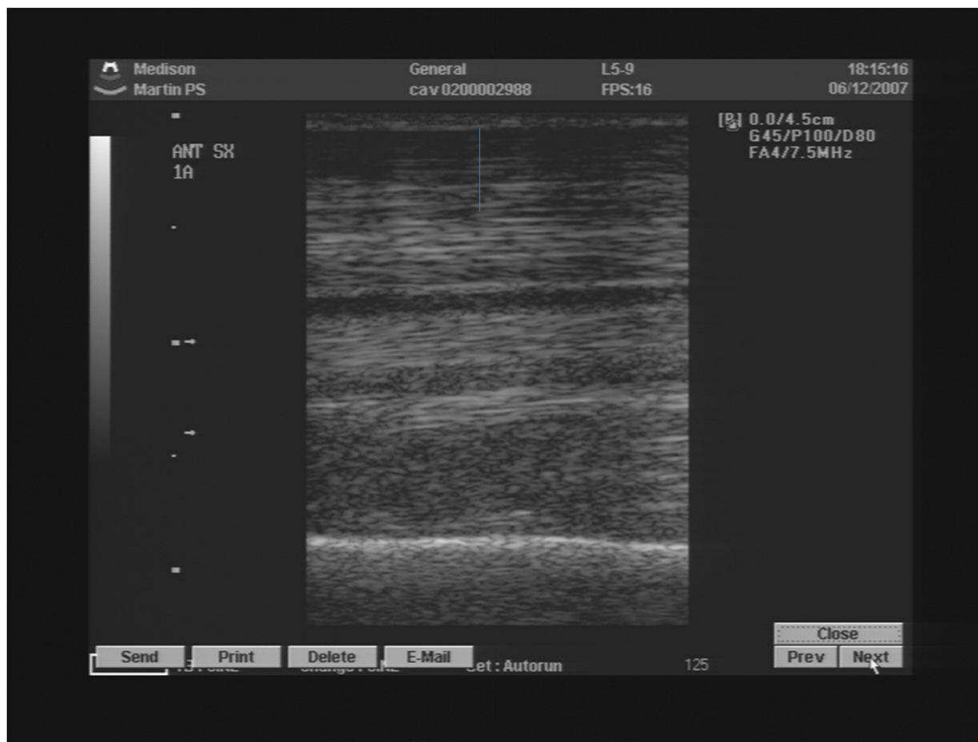
#### Caso Clinico 4:

##### Segnalamento:

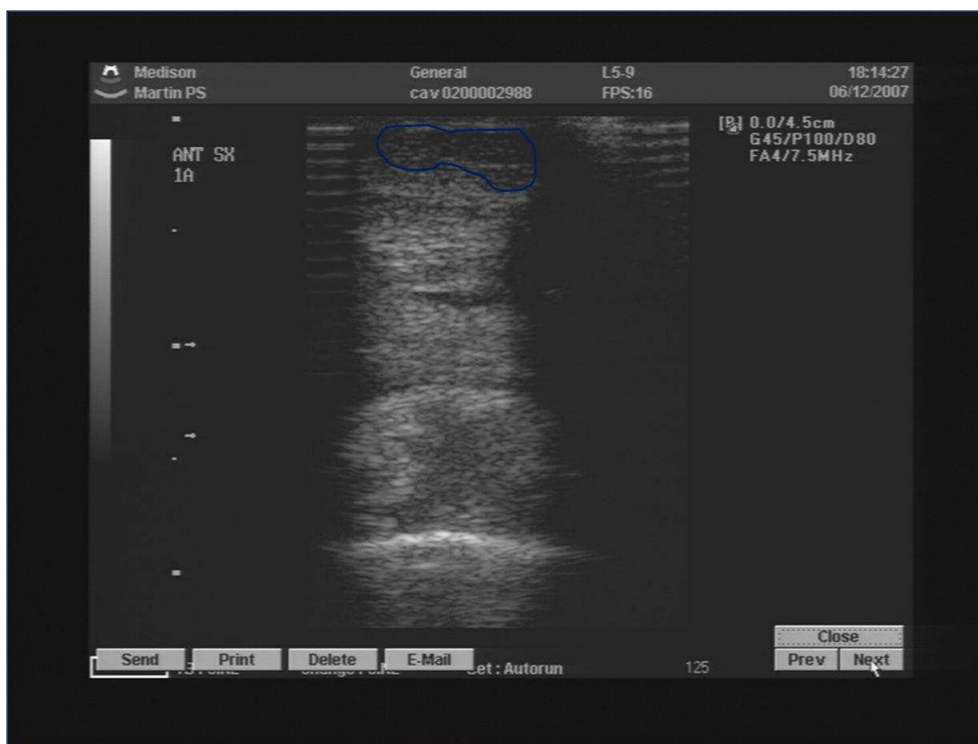
Cavallo di razza Purosangue Inglese, castrone, di 9 anni di età, peso 450 kg.

##### Anamnesi:

A seguito di un infortunio in gara, il proprietario ha riscontrato una zoppia a carico dell'arto anteriore sinistro. Il cavallo è stato quindi condotto presso il Servizio di Chirurgia, Dipartimento Clinico Veterinario, Università di Bologna. L'esame ecografico ha messo in evidenza una lesione a carico del tendine flessore superficiale dell'arto anteriore sinistro (Fig.1.3; Fig.1.4).



**Fig.1.3:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. La lesione al tendine flessore superficiale è visibile come area anecogena.



**Fig.1.4:** Ecografia longitudinale regione palmare metacarpo sinistro. La lesione al tendine flessore superficiale è visibile come area anecogena.

#### Terapia:

Data la tipologia della lesione, e la volontà da parte del proprietari di far tornare il cavallo al più presto in gara si è deciso di procedere con l'inoculo di cellule staminali mesenchimali autologhe. Il soggetto è quindi stato sottoposto al prelievo di 100 ml di midollo osseo dall'ala dell'ileo. Dopo il prelievo il cavallo è stato sottoposto a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni.

In laboratorio le cellule sono state isolate come descritto precedentemente. Dopo tre settimane di coltura in vitro, sono state inoculate  $20 \times 10^6$  cellule in 4 ml di gel piastrinico. Presso la scuderia di origine è stata effettuata la riabilitazione come riportato in Tabella 1.1.

### Caso Clinico 5:

#### Segnalamento:

Cavallo di razza Quarte horse, maschio intero, di 5 anni di età, peso 480 kg.

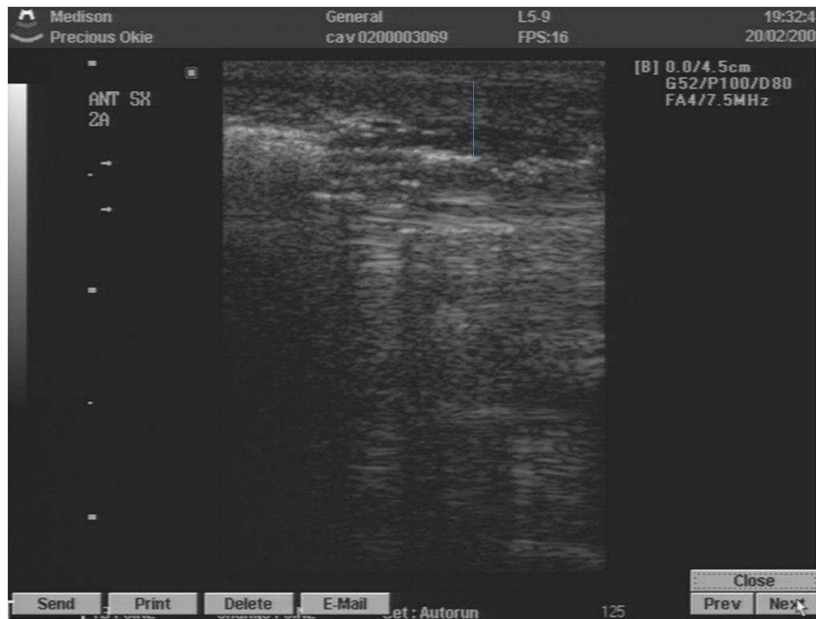
#### Anamnesi:

A seguito di un infortunio in gara, il proprietario ha riscontrato una zoppia a carico dell'arto anteriore sinistro. Il cavallo è stato quindi condotto presso il Servizio di Chirurgia, Dipartimento Clinico Veterinario, Università di Bologna. L'esame ecografico della regione palmare del metacarpo sinistro ha evidenziato in sezione trasversale un'area ipoecogena (score 2/3) a carico del flessore superficiale del dito; l'area della lesione era di  $50 \text{ mm}^2$  rispetto alla complessiva area del tendine di  $120 \text{ mm}^2$  (Fig.1.3; Fig.1.4).



**Fig.1.3:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. Le linee indicano la lesione e il tendine flessore superficiale del dito





**Fig.1.4:** Ecografia longitudinale regione palmare metacarpo sinistro. L'area della lesione risulta anecogena.

Terapia:

Data l'entità della lesione si è optato per l'inoculo di cellule staminali mesenchimali autologhe. Il soggetto è quindi stato sottoposto al prelievo di midollo osseo dall'ala dell'ileo (75ml). Dopo il prelievo il cavallo è stato sottoposto a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni.

In laboratorio le cellule sono state isolate come descritto precedentemente. Dopo due settimane di coltura in vitro  $10,5 \times 10^6$  cellule sono state inoculate con 4 ml di plasma arricchito di piastrine. Il cavallo, tornato alla scuderia di origine è stato quindi sottoposto a esercizio come riportato in Tabella 1.1.

Caso Clinico 6:

Segnalamento:

Cavallo di razza sella italiano, castrone, di 10 anni di età, peso 480 kg.

Anamnesi:

A seguito di un infortunio in gara l'animale ha presentato una zoppia a carico dell'arto anteriore sinistro. Il cavallo è stato quindi condotto presso il Servizio di Chirurgia, Dipartimento Clinico Veterinario, Università di Bologna. L'esame ecografico messo in evidenza in sezione trasversale un'area ipoecogena di 7 mm<sup>2</sup> al margine laterale del tendine flessore superficiale del dito dello spessore di 3 mm; in sezione trasversale, l'allineamento delle fibre era quasi nella norma (score 0-1/3) nella porzione laterale del tendine. All'esame ecografico si è evidenziata una tenite cronica del tendine flessore superficiale del dito.



**Fig.1.5:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. La lesione a carico del tendine flessore superficiale è indicata dall'area anecogena.

Terapia:

Data la cronicità della lesione, che, come riportato dal veterinario referente, non era andata incontro a miglioramento a seguito dei tradizionali trattamenti, è stato effettuato il trapianto autologo di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo. Il soggetto è quindi stato sottoposto al prelievo di 50 ml di midollo osseo dall'ala dell'ileo. Dopo il

prelievo il cavallo è stato sottoposto a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni.

In laboratorio le cellule sono state isolate come descritto precedentemente. Dopo tre settimane di coltura in vitro, sono state inoculate nella lesione  $2 \times 10^6$  cellule in 1 ml di gel piastrinico. Il cavallo, tornato alle scuderie di origine, è stato quindi sottoposto a esercizio come riportato in Tabella 1.1.

#### Caso Clinico 7:

##### Segnalamento:

Cavallo purosangue arabo, maschio intero, di 3 anni di età, peso 400 kg.

##### Anamnesi:

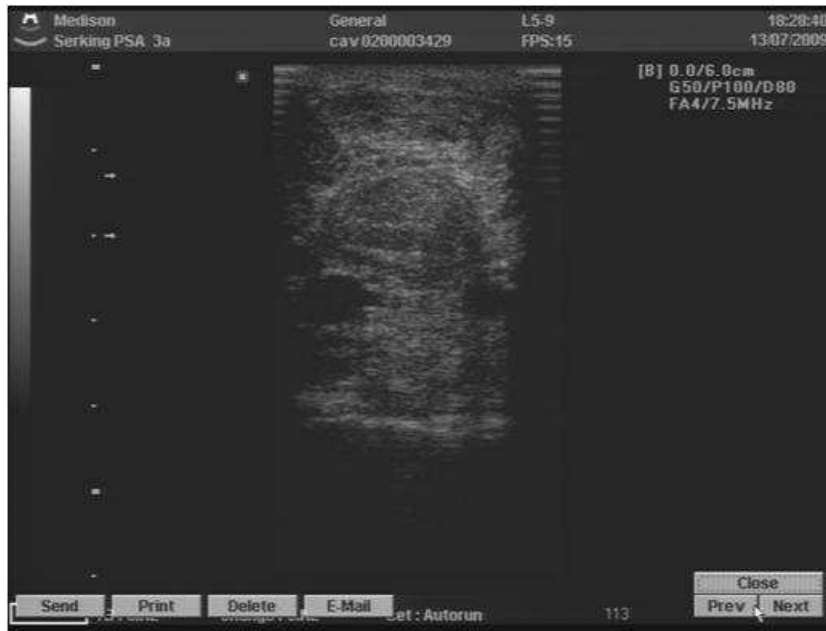
Il soggetto è stato rinvenuto dal proprietario con una lacerazione a carico dell'arto anteriore destro a seguito di imbrigliamento nel filo di recinzione del paddock in cui l'animale era stabulato. La ferita è stata subito medicata dal veterinario di referenza e il cavallo portato presso il Servizio di Chirurgia, Dipartimento Clinico Veterinario. Una volta ricoverato, il chirurgo ha provveduto all'esame della ferita rilevando un interessamento della faccia palmare del terzo medio dello stinco, comprendente anche il tendine flessore superficiale. Si è quindi proceduto ad intervento chirurgico, con animale in anestesia generale, sul decubito sinistro; i margini cutanei della ferita a "v" rovesciata sono stati rimossi e l'apertura è stata ampliata prossimalmente e latero-distalmente per esporre il tendine. Dopo curretage dei margini si è proceduto con la sutura di Bunnell dei due monconi con filo riassorbibile Dexon 2; quindi la fascia è stata chiusa con punti staccati con filo Dexon 2 e la cute con monofilamento in nylon. Subito dopo l'intervento è stato applicato un gesso lasciato in loco per sei settimane. Dopo l'intervento il cavallo è stato sottoposto a terapia antiinfiammatoria e antibiotica.

Durante l'intervento è stato effettuato il prelievo di 75 ml di midollo osseo dall'ala dell'ileo e le cellule staminali mesenchimali sono state isolate come descritto precedentemente.

Dopo sei settimane il gesso è stato asportato e l'esame ecografico ha messo in evidenza la presenza di una lesione ancora ingente a carico del tendine flessore superficiale (Fig.1.6; Fig.1.7); per questo motivo si è quindi deciso di effettuare un inoculo di  $11,1 \times 10^6$  cellule in 4 ml di gel piastrinico.



**Fig.1.6:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo destro. La lesione al tendine flessore superficiale è visibile come area anecogena.



**Fig.1.7:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo destro. La lesione al tendine flessore superficiale è visibile come area anecogena.

Una volta tornato alla scuderia di origine, è stata effettuata terapia riabilitativa (Tab.1.1).

Caso Clinico 8:

Segnalamento:

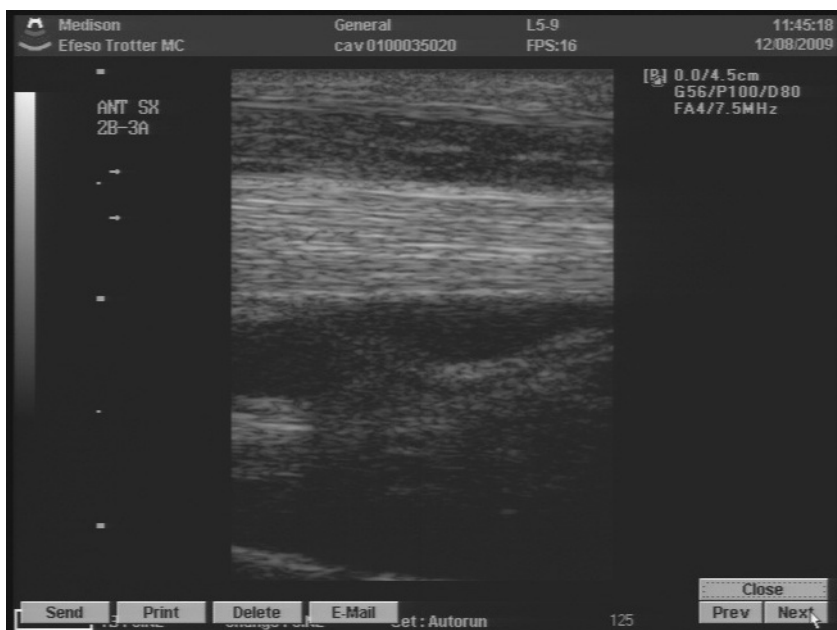
Cavallo di razza trottatore, castrone, di 6 anni di età, peso 450 kg.

Anamnesi:

A seguito di un infortunio in gara l'animale ha presentato una zoppia a carico dell'arto anteriore sinistro. Il cavallo è stato quindi condotto presso il Servizio di Chirurgia, Dipartimento Clinico Veterinario, Università di Bologna. All'esame ecografico, è stata evidenziata una lesione a carico del tendine flessore superficiale (Fig.1.8; Fig.1.9).



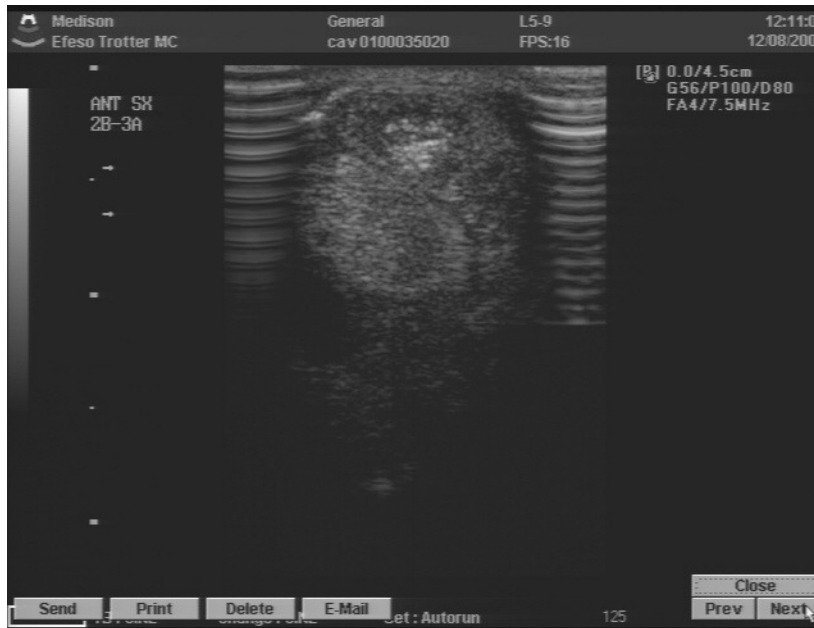
**Fig.1.8:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. Le linee indicano la lesione e il tendine flessore superficiale del dito



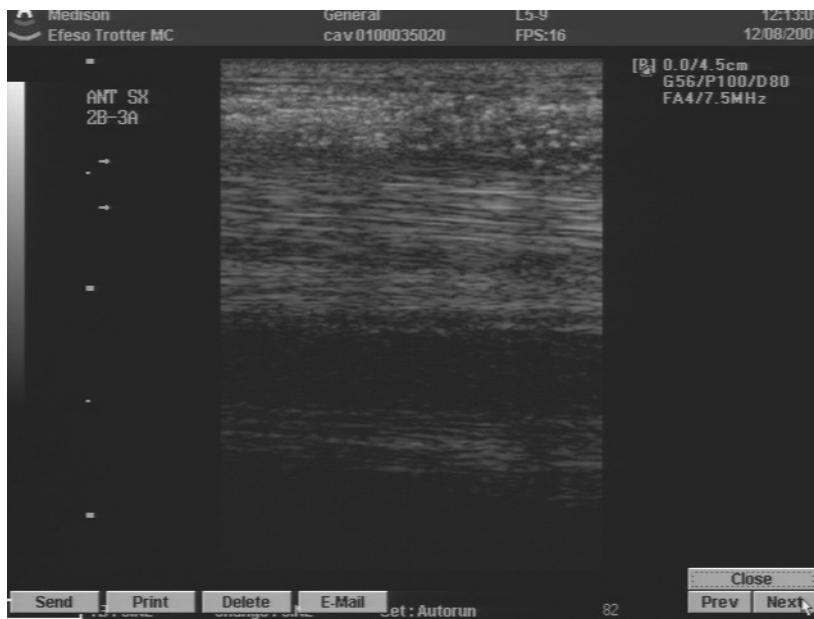
**Fig.1.9:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. La lesione è visibile come area anecogena.

Terapia:

Trattandosi di recidiva di una lesione trattata un anno prima con protocolli tradizionali, e la zoppia ingente, si è optato per l'inoculo di cellule staminali mesenchimali eterologhe, isolate da tessuto adiposo. Sono state inoculate nella lesione  $16 \times 10^6$  cellule in gel piastrinico (Fig1.10; Fig.1.11).



**Fig.1.10:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. Riempimento della lesione con gel piastrinico e cellule staminali.



**Fig.1.11:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. Riempimento della lesione con gel piastrinico e cellule staminali.

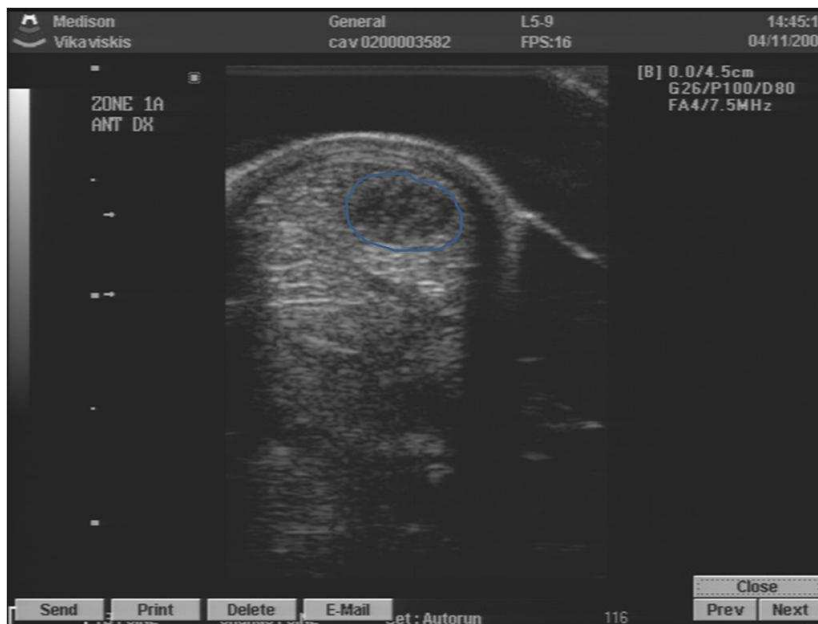
### Caso Clinico 9:

#### Segnalamento:

Cavallo di razza puro sangue inglese, castrone, di 6 anni di età, peso 450 kg.

#### Anamnesi:

A seguito di un infortunio in gara l'animale ha presentato una zoppia a carico dell'arto anteriore destro. Il cavallo è stato quindi condotto presso il Servizio di Chirurgia, Dipartimento Clinico Veterinario, Università di Bologna. All'esame ecografico, è stata evidenziata una lesione a carico del tendine flessore superficiale (Fig.1.9).



**Fig.1.9:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo destro. La lesione è visibile come area anecogena.

#### Terapia:

Il soggetto è stato sottoposto al prelievo di 40 ml di midollo osseo dall'ala dell'ileo. Dopo il prelievo il cavallo è stato sottoposto a terapia antibiotica e antiinfiammatoria per tre giorni.



In laboratorio le cellule sono state isolate come descritto precedentemente. Dopo tre settimane di coltura in vitro, sono state inoculate  $40 \times 10^6$  cellule in 2 ml di gel piastrinico. Il cavallo è stato quindi sottoposto a esercizio come riportato in Tabella 1.1.



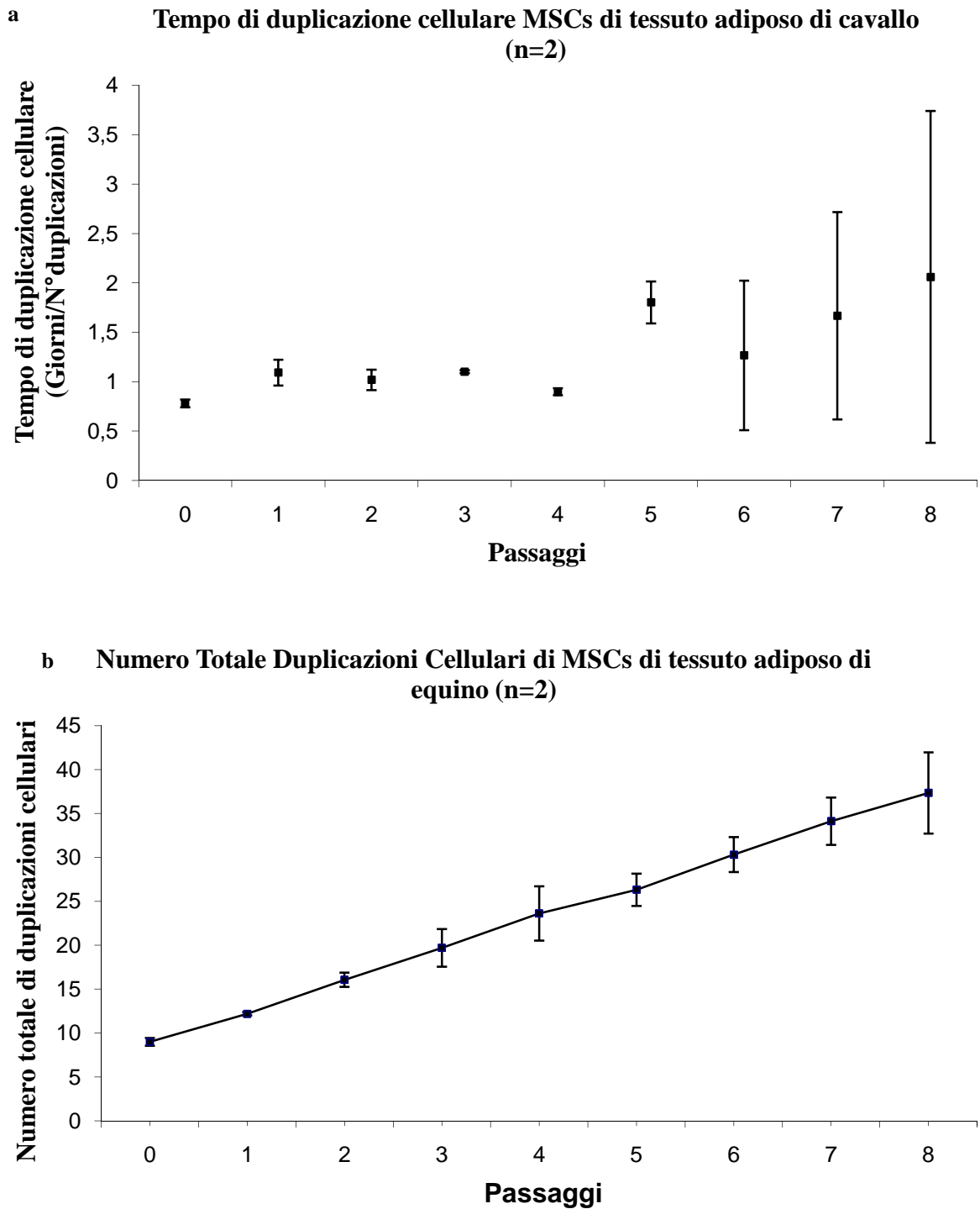
**Fig.1.12:** Inoculo eco guidato di cellule staminali mesenchimali in una lesione tendinea.

### **1.3 Risultati**

#### **1.3.1 Isolamento, differenziazione e caratterizzazione**

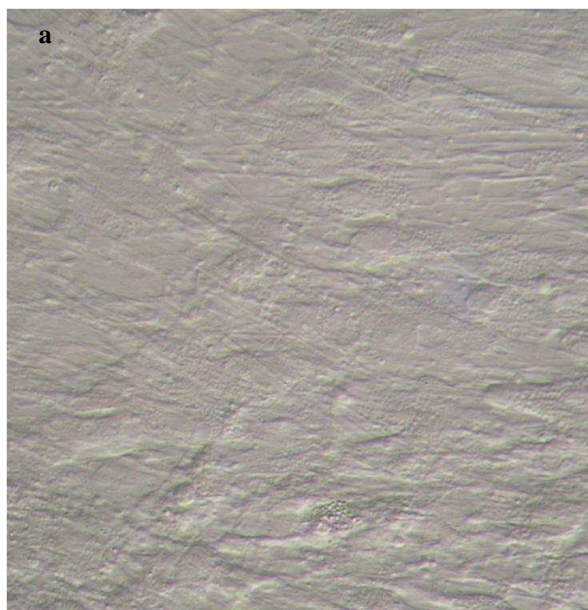
Per quanto riguarda l'isolamento di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo i campioni impiegati sono stati in media di  $5,6 \pm 1,1$  g; in 3/3 (100,0%) campioni si sono sviluppate colonie con la classica morfologia fibroblasto-simile delle cellule staminali mesenchimali (Fig.1.14a) e in nessun campione si sono sviluppate contaminazioni di muffe o batteri. Il tempo di duplicazione delle popolazioni è stato compreso tra 0,8 e 3,2 giorni ed è risultato in media pari a  $1,3 \pm 0,7$  giorni per i passaggi

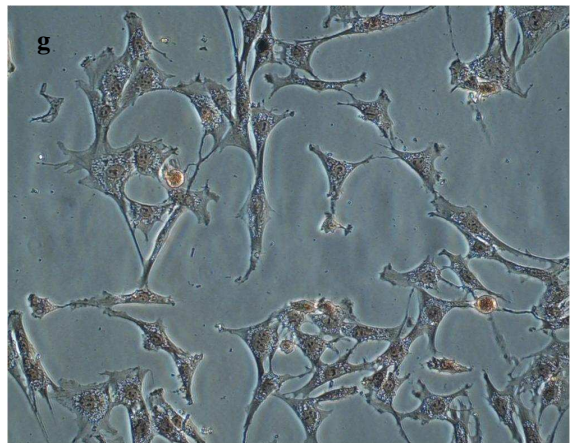
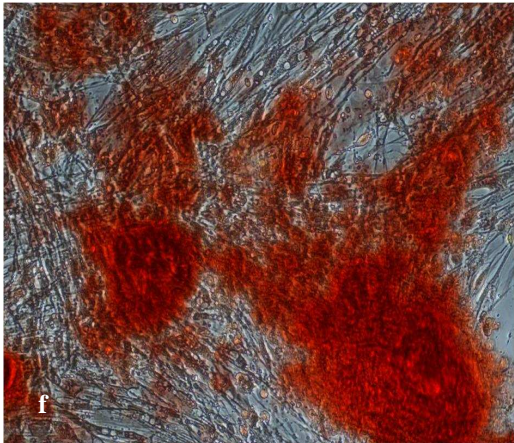
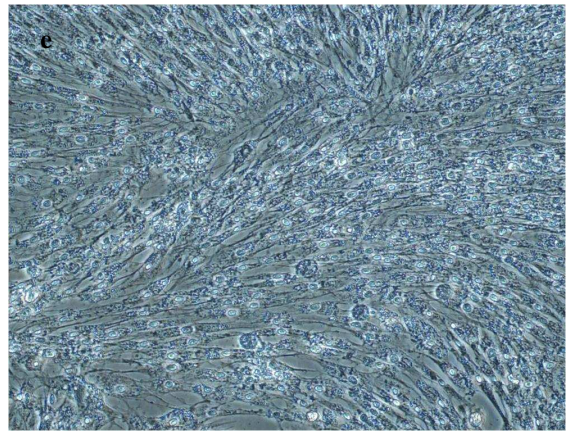
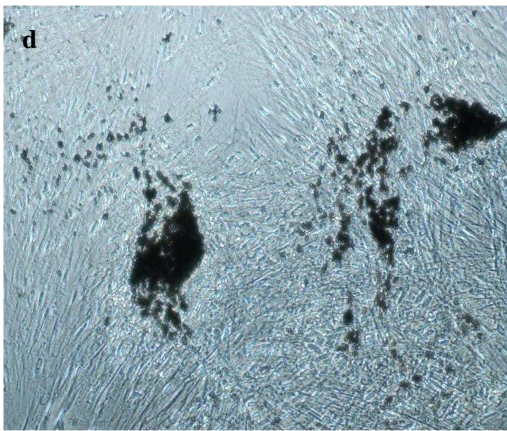
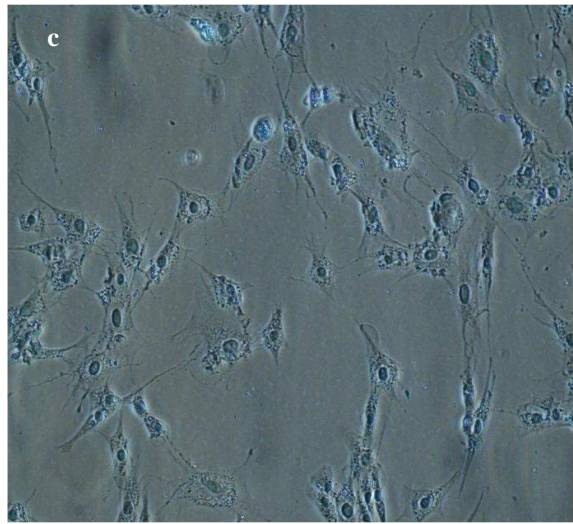
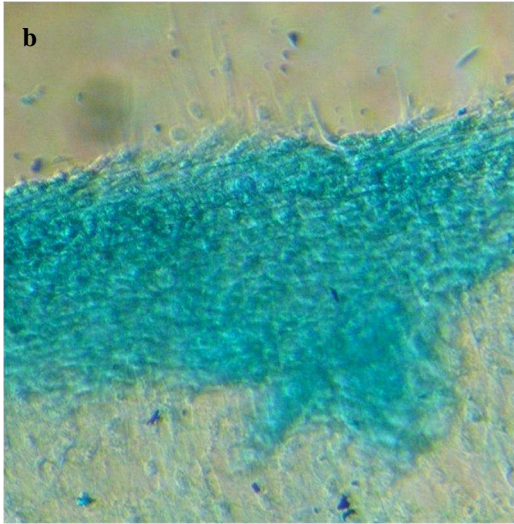
P0-P8. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative ( $P>0,05$ ) per quanto riguarda il tempo di duplicazione nei diversi passaggi (Fig.1.13a). Al passaggio 8 il numero di duplicazioni cellulari è stato di  $37,3\pm 4,6$  (Fig.1.13b).

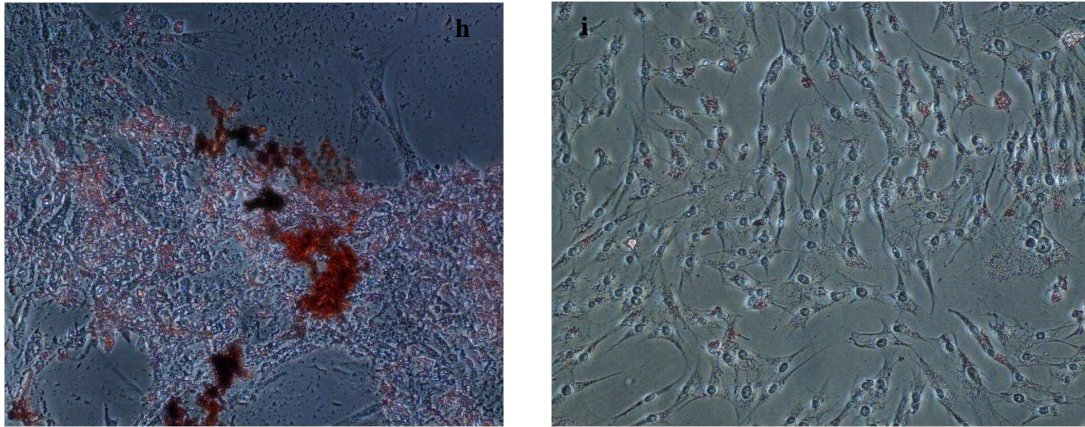


**Fig. 1.13:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dal liquido amniotico di cavallo.

Dopo tre settimane di coltura in medium da differenziazione condrogenica, la coltura cellulare, colorata con Alcian blu presentava accumuli di glicosaminoglicani sia intracellulari che nella matrice extracellulare, accumuli tipici dell'avvenuta differenziazione condrogenica (Fig.1.14b); al contrario le cellule coltivate in medium di coltura normale presentavano scarse quantità di glicosaminoglicani all'interno del citoplasma, mentre erano assenti accumuli extracellulari (Fig.1.14c). Dopo induzione della differenziazione osteogenica, con coltura per 21 giorni in medium opportunamente addizionato, sono stati evidenziati accumuli di sali di calcio sia mediante colorazione di von Kossa, che colora in nero i depositi extracellulari (Fig.1.14d), sia mediante colorazione Alizarin Red, che invece colora in arancione-rosso i depositi (Fig.1.14f). Le cellule coltivate in medium di coltura standard sono invece risultate negative per entrambe le colorazioni, presentando solo una minima quantità di depositi di sali di calcio ritenuti fisiologici (Fig.1.14e,g). Per quanto riguarda la differenziazione adipogenica, invece, la colorazione Oil Red O, effettuata dopo tre settimane di coltura in medium specifico, ha messo in evidenza la differenziazione di queste cellule in adipociti, come testimoniato da un elevato accumulo intracellulare di vacuoli lipidici superiore al controllo (Fig.1.14h,i).

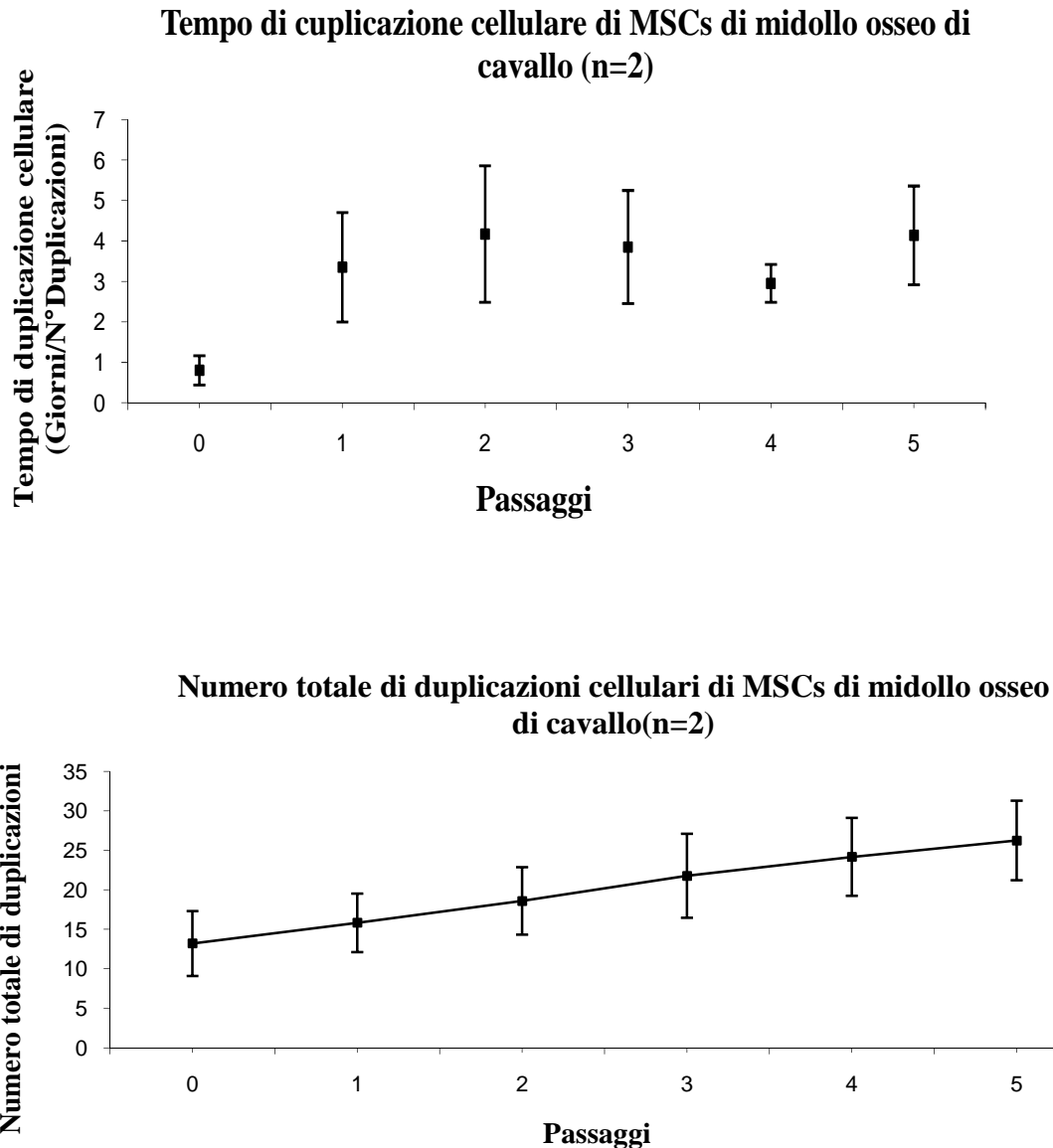






**Fig.1.14:** Differenziazione *in vitro* di MSCs isolate da tessuto adiposo di cavallo. (a) controllo dopo tre settimane in un medium di coltura standard: morfologia cellulare fibroblasto-simile (Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U; x20); (b) induzione condrogenica: dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, cellule positive alla colorazione con Alcian Blu (x20); (c) controllo: dopo tre settimane in un medium di coltura standard, le cellule hanno mantenuto una morfologia classica e risultano negative alla colorazione con Alcian Blu (x20); (d) induzione osteogenica: cellule positive alla colorazione di von Kossa (x20); (e) induzione osteogenica: controllo: dopo 21 giorni di coltura in medium standard le cellule sono negative alla colorazione di von Kossa (x20); (f) induzione osteogenica: dopo tre settimane in medium di differenziazione: cellule positive a colorazione Alizarin Red (x20); (g) controllo: dopo 21 giorni in medium di coltura standard: cellule negative alla colorazione Alizarin Red (x20); (h) induzione adipogenica: dopo 21 giorni di coltura in medium da differenziazione le cellule mostrano evidenti vacuoli positivi alla colorazione Oil Red O (x20); (i) induzione adipogenica: controllo: cellule negative alla colorazione Oil Red O (x20).

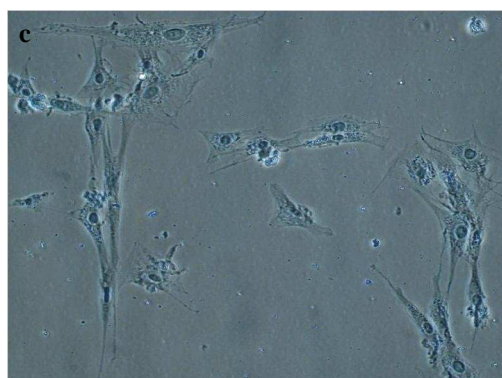
Per quanto riguarda il midollo osseo, in media sono stati prelevati  $68 \pm 23,6$  ml (range 100-40 ml). In tutti i campioni (100%) sono state isolate colonie di cellule con la classica morfologia fibroblasto simile (Fig.1.16a), e nessun campione è stato contaminato da muffe e/o batteri. Il tempo di duplicazione delle popolazioni è stato compreso tra 0,5 e 5 giorni e è risultato in media pari a  $3,2 \pm 1,5$  giorni per i passaggi P0-P5. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative ( $P > 0,05$ ) per quanto riguarda il tempo di duplicazione nei diversi passaggi (Fig.1.15a). Al passaggio 5 il numero di duplicazioni cellulari è stato di  $26,2 \pm 5,03$  (Fig.1.15b).

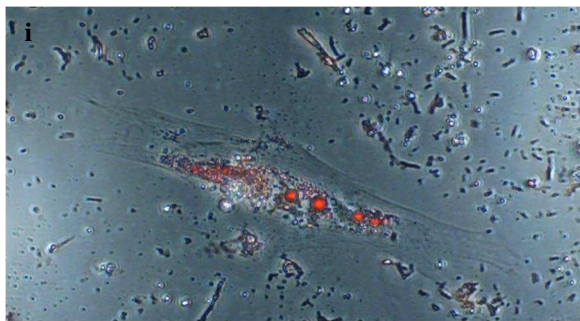
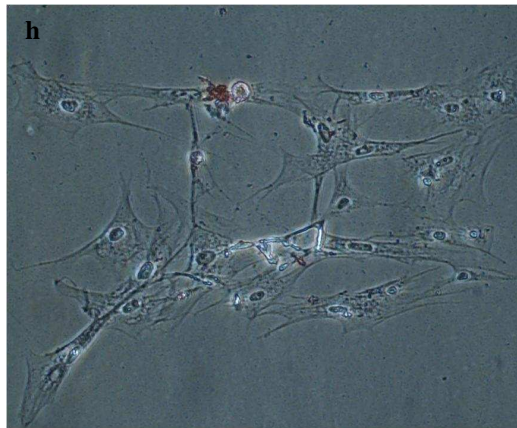
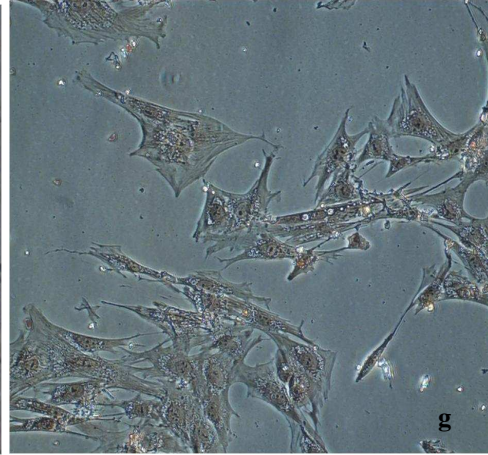
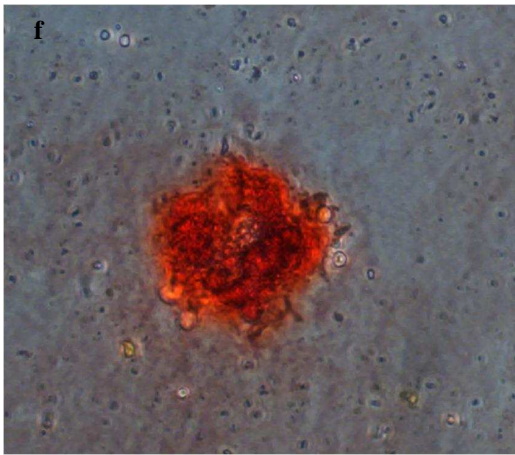
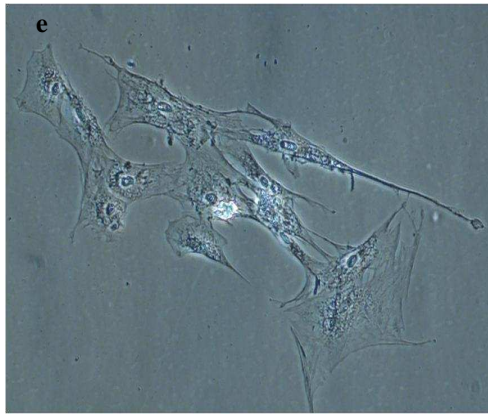
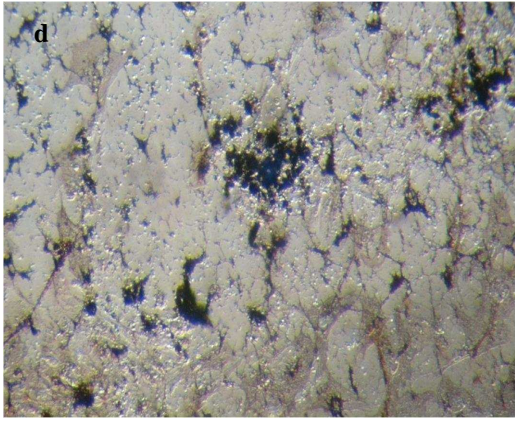


**Fig. 1.15:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dal liquido amniotico di cavallo.

Al termine delle tre settimane di coltura in medium specifico per l'induzione della differenziazione condrogenica, la coltura cellulare, colorata con Alcian blu presentava accumuli di glicosaminoglicani sia intracellulari che nella matrice extracellulare, tipici dell'avvenuta differenziazione condrogenica (Fig.1.16b). La presenza di glicosaminoglicani è risultata essere di poco superiore rispetto a quelli presenti nella coltura cellulare mantenuta in medium standard (Fig.1.16c); gli accumuli positivi all'Alcian Blu sono inoltre risultati quantitativamente inferiori rispetto a quelli presenti

nelle cellule isolate da tessuto adiposo coltivate nelle medesime condizioni (Fig.1.14b). A seguito della coltura per 21 giorni in medium opportunamente addizionato per l'induzione osteogenica, sono stati evidenziati accumuli extracellulari di sali di calcio colorati in nero con la colorazione di von Kossa (Fig.1.16d) e in arancione-rosso con colorazione Alizarin Red (Fig.1.16f). Le cellule coltivate in medium di coltura standard sono invece risultate negative per entrambe le colorazioni, presentando solo una minima quantità di depositi di sali di calcio ritenuti fisiologici (Fig.1.16e,g). le cellule coltivate in medium da differenziazione adipogenica per tre settimane, hanno presentato, dopo colorazione con Oil Red O, una quantità di vacuoli lipidici intracellulari di poco superiore alle cellule mantenute in medium di coltura standard (Fig.1.16h,i) e inferiore rispetto a quelle isolate da tessuto adiposo e coltivate nelle medesime condizioni (Fig.1.14h).



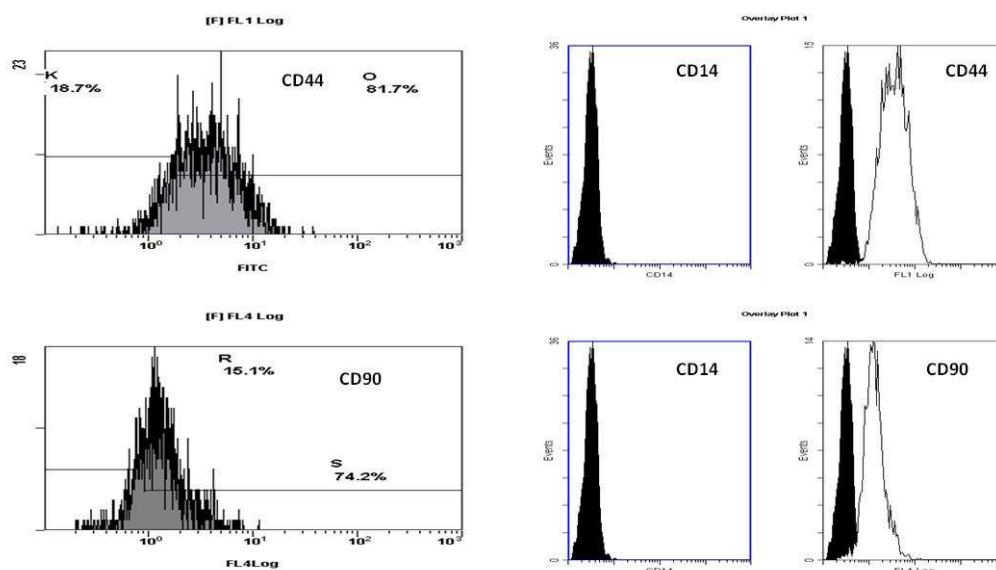


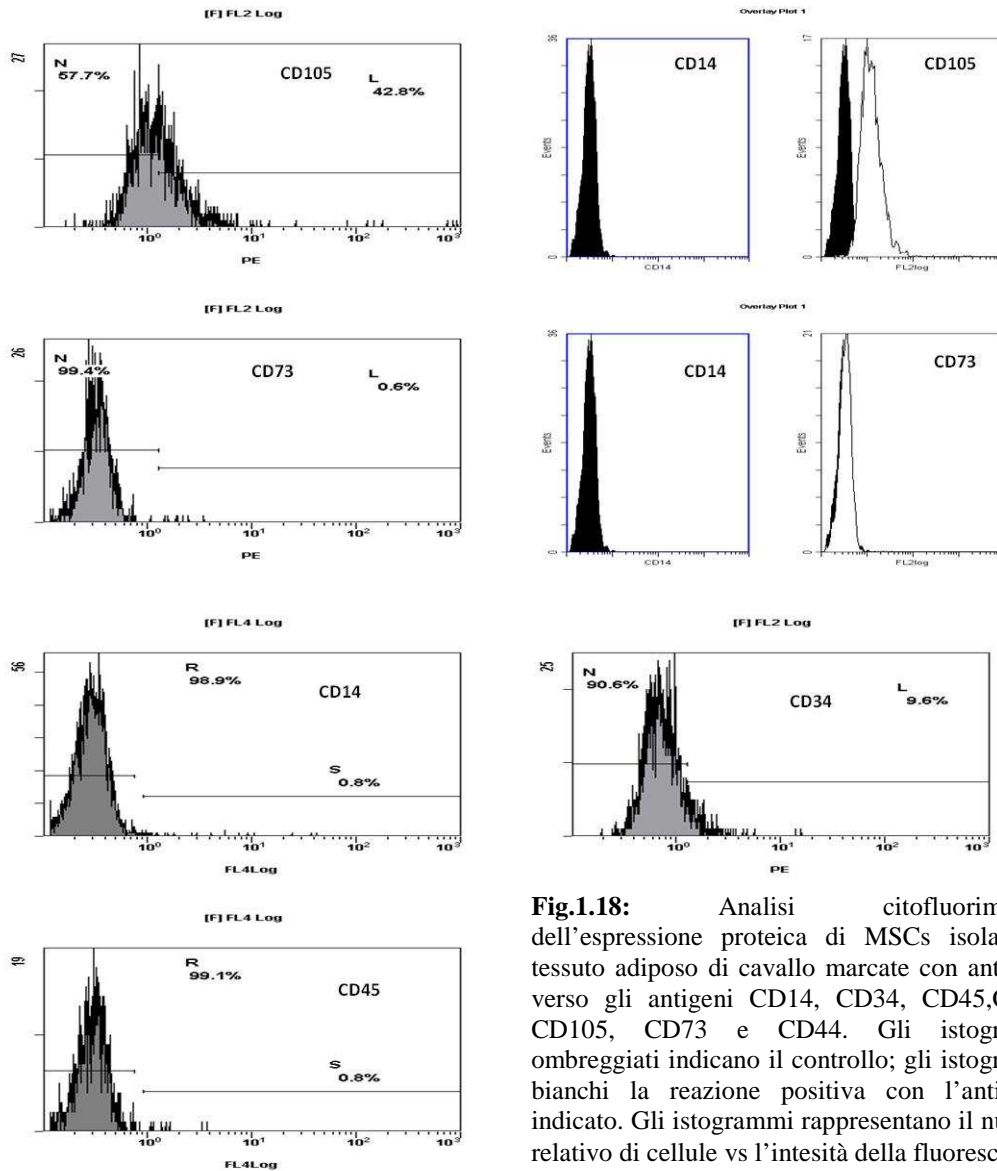


**Fig.1.16:** Differenziazione *in vitro* di MSCs isolate da tessuto adiposo di cavallo. (a) controllo dopo tre settimane in un medium di coltura standard: morfologia cellulare fibroblasto-simile (Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U; x20); (b) induzione condrogenica: dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, cellule positive alla colorazione con Alcian Blu (x20); (c) controllo: dopo tre settimane in un medium di coltura standard, le cellule hanno mantenuto una morfologia classica e risultano negative alla colorazione con Alcian Blu (x20); (d) induzione osteogenica: cellule positive alla colorazione di von Kossa (x20); (e) induzione osteogenica: controllo: dopo 21 giorni di coltura in medium standard le cellule sono negative alla colorazione di von Kossa (x20); (f) induzione osteogenica: dopo tre settimane in medium di differenziazione: cellule positive a colorazione Alizarin Red (x20); (g) controllo: dopo 21 giorni in medium di coltura standard: cellule negative alla colorazione Alizarin Red (x20); (h) induzione adipogenica: dopo 21 giorni di coltura in medium da differenziazione le cellule mostrano evidenti vacuoli positivi alla colorazione Oil Red O (x40); (i) induzione adipogenica: controllo: cellule negative alla colorazione Oil Red O (x20).

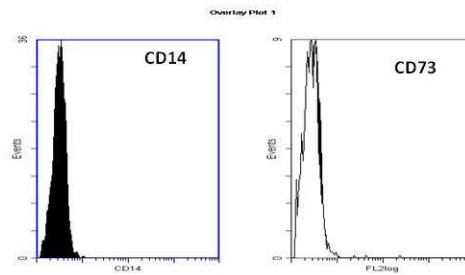
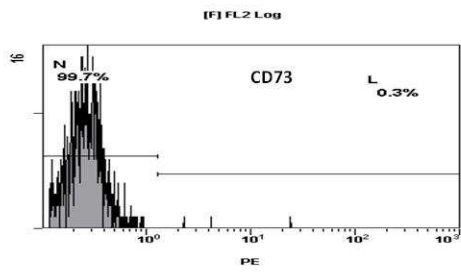
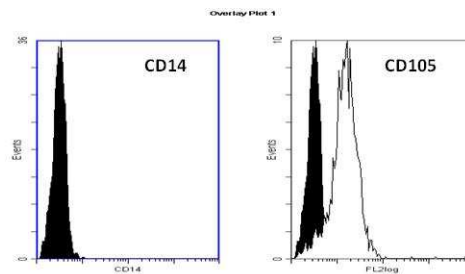
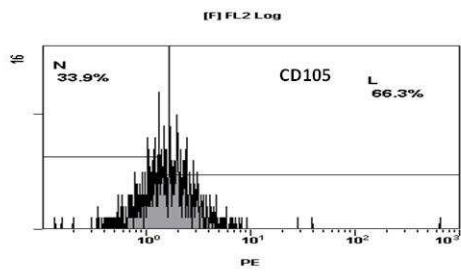
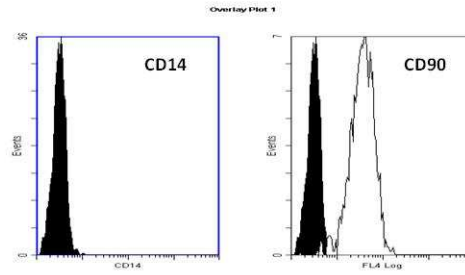
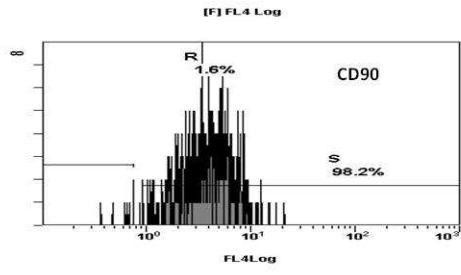
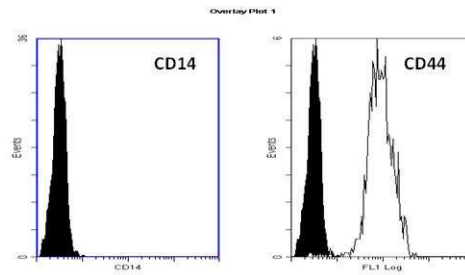
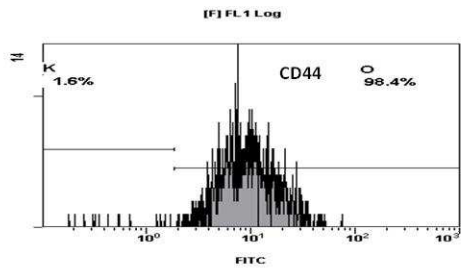
In nessuna delle linee cellulari isolate è stata evidenziata una fase di latenza al momento di inizio della coltura cellulare; in entrambe le linee in fatti non si sono evidenziate differenze statisticamente significative nel tempo di duplicazione cellulare tra i diversi passaggi ( $P>0,05$ ). Confrontando tempi di duplicazione di tutte le linee cellulari isolate, le MSCs da tessuto adiposo hanno presentato un tempo di duplicazione inferiore rispetto alle cellule isolate da midollo osseo ( $P<0,05$ ), mentre i numeri totali di duplicazioni cellulari al passaggio 5 non sono risultati statisticamente significativi.

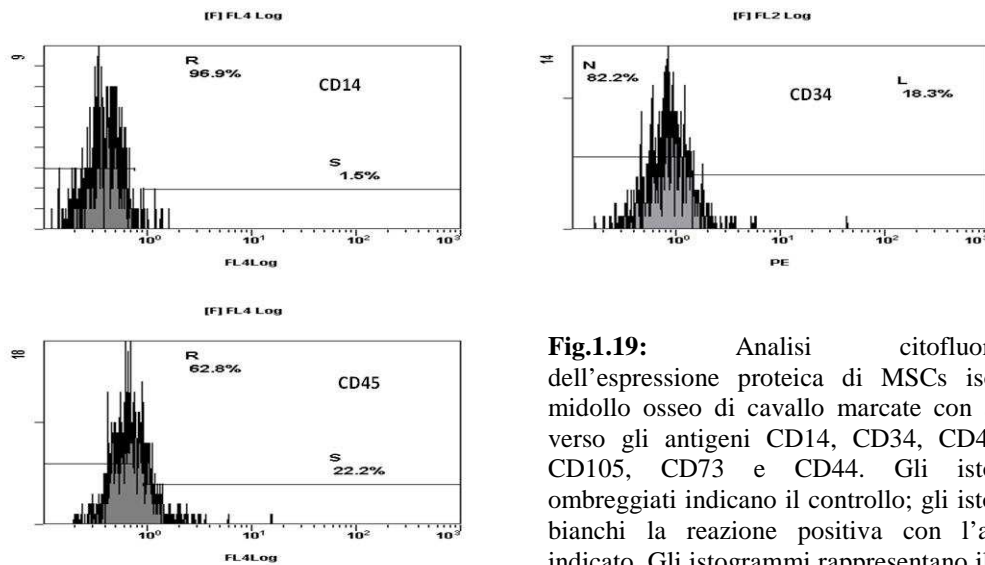
L'espressione di un numero di markers associati con cellule staminali mesenchimali è stata valutata mediante impiego di citofluorimetria sulle cellule isolate da tessuto adiposo e midollo osseo. Entambe le linee cellulari hanno mostrato espressione di markers di staminalità mesenchimale quali CD90, CD44 e CD105, mentre sono risultate negative per markers di staminalità tipicamente emopoietici quali CD34, CD14 e CD45. È risultata negativa anche l'espressione di CD73 (Fig. 1.18; Fig.1.19).





**Fig.1.18:** Analisi citofluorimetrica dell'espressione proteica di MSCs isolate da tessuto adiposo di cavallo marcate con anticorpi verso gli antigeni CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 e CD44. Gli istogrammi ombreggiati indicano il controllo; gli istogrammi bianchi la reazione positiva con l'anticorpo indicato. Gli istogrammi rappresentano il numero relativo di cellule vs l'intensità della fluorescenza.





**Fig.1.19:** Analisi citofluorimetrica dell'espressione proteica di MSCs isolate da midollo osseo di cavallo marcate con anticorpi verso gli antigeni CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 e CD44. Gli istogrammi ombreggiati indicano il controllo; gli istogrammi bianchi la reazione positiva con l'anticorpo indicato. Gli istogrammi rappresentano il numero relativo di cellule vs l'intensità della fluorescenza.

### 1.3.2 Applicazioni Cliniche

In tutti i soggetti sottoposti a prelievo di midollo osseo e tessuto adiposo non si sono verificate reazioni secondarie né a carico della parte sede del prelievo, né sistemiche. Nessuna reazione di ordine infiammatorio è stata riscontrata nella sede di inoculo delle cellule staminali mesenchimali né a seguito di trapianto autologo che eterologo.

#### Caso Clinico 1:

In seguito all'attività riabilitativa, il soggetto inizialmente, secondo quanto riportato dal proprietario e dal veterinario di referenza, ha presentato un netto miglioramento nella funzionalità dell'arto lesa. Successivamente con il progredire dell'attività riabilitativa e la ripresa del lavoro montato su terreno duro, il cavallo ha presentato una riacutizzazione della sintomatologia ed è stato messo a riposo definitivo.

#### Caso Clinico 2:

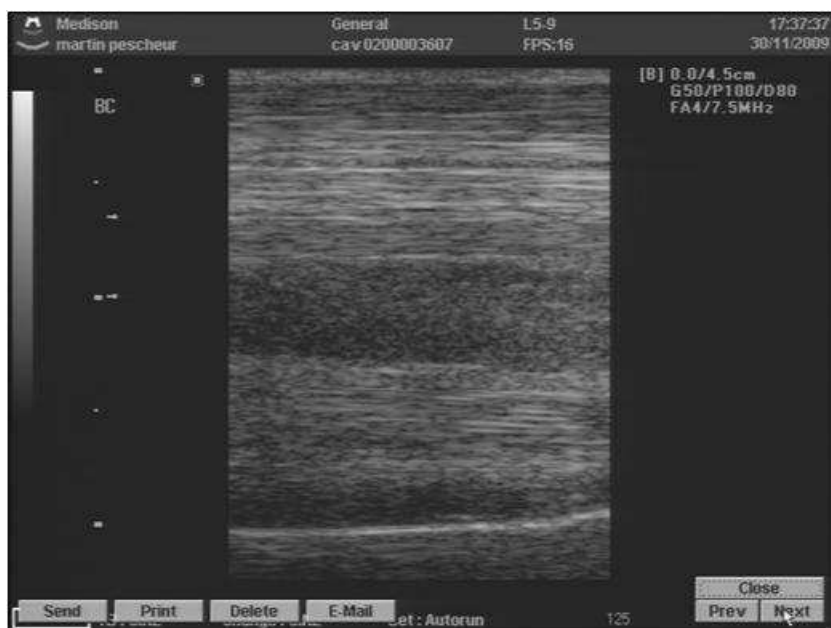
Secondo quanto riportato dal veterinario di referenza e dal proprietario, la riabilitazione è stata caratterizzata da una buona progressione della riduzione della lesione e della ripresa dell'attività lavorativa. Dopo i buoni risultati ottenuti in allenamento, il cavallo è tornato all'attività agonistica riportando risultati simili a quelli ottenuti fino al momento dell'infortunio.

### Caso Clinico 3:

Il soggetto, dopo inoculo di cellule staminali mesenchimali isolate da tessuto adiposo, ha seguito l'attività riabilitativa suggerita, riportando un netto miglioramento nella funzionalità dell'arto lesa e riprendendo pienamente l'attività agonistica. Dopo circa un anno dal rientro nelle corse, il soggetto è andato però incontro a stiramento del legamento sospensore del nodello dell'arto controlaterale e si è optato per la messa a riposo definitiva e l'inizio della carriera riproduttiva.

### Caso Clinico 4:

Una volta tornato alle scuderie di origine, il cavallo è stato sottoposto con successo alla riabilitazione ed è tornato all'attività agonistica. Dopo circa un anno dal rientro in gara, il soggetto è stato nuovamente condotto presso il Servizio di Chirurgia a seguito della comparsa di zoppia a carico dell'arto anteriore controlaterale. L'esame ecografico della regione flessoria dell'arto anteriore destro ha evidenziato un aumento di volume e alterazione strutturale della briglia carpica dal suo punto di origine al punto in cui si rende al tendine del flessore. Modica disomogeneità strutturale anche a carico del legamento sospensore del nodello in zona 1A-1B per la presenza di area ipoecogena centrale. Nella norma le altre strutture (Fig.1.20). L'arto anteriore sinistro, precedentemente trattato con inoculo di cellule staminali mesenchimali isolate dal midollo osseo dello stesso soggetto è invece risultato nella norma (Fig.1.21). I proprietari hanno deciso per la messa a riposo definitiva dell'animale.



**Fig.1.20:** Ecografia longitudinale regione palmare metacarpo destro. Non è più evidente l'area anecogena della lesione.



**Fig.1.21:** Ecografia trasversale regione palmare metacarpo sinistro. Non è più evidente l'area anecogena della lesione.

#### Caso Clinico 5:

Dopo inoculo di cellule staminali mesenchimali, il cavallo è tornato alla scuderia di origine dove è stato sottoposto all'attività riabilitativa come suggerito. Durante la riabilitazione e la successiva ripresa dell'attività sportiva non sono stati segnalati problemi

né a carico dell'arto trattato né a carico dell'arto controlaterale. Il soggetto sta riprendendo ora la piena attività agonistica riportando i primi successi.

#### Caso Clinico 6:

Dopo essere stato sottoposto all'attività riabilitativa, il soggetto ha ripreso l'attività sportiva e sta riprendendo ora quella prettamente agonistica senza aver fino ad ora riportato recidive né a carico dell'arto trattato con MSCs, che riportava al momento dell'inoculo una lesione ormai cronicizzata, né dell'arto controlaterale.

#### Caso Clinico 7:

Dopo intervento chirurgico, a causa della recisione del tendine flessore superficiale del dito, per imbrigliamento nel filo di recinzione, il soggetto ha seguito una tabella riabilitativa più lenta rispetto a quella consigliata negli altri casi, rimanendo fermo in box, poi messo in piccolo paddok per circa tre mesi.

Quindici giorni dopo l'incolo delle cellule staminali mesenchimali, macroscopicamente l'arto appariva notevolmente aumentato di volume rispetto al controlaterale, con evidente cicatrice chirurgica (Fig.1.22). All'esame ecografico, eseguito il medesimo giorno, è stata rilevata un'iniziale riorganizzazione delle strutture tendinee lese (Fig.1.23; Fig.1.24).

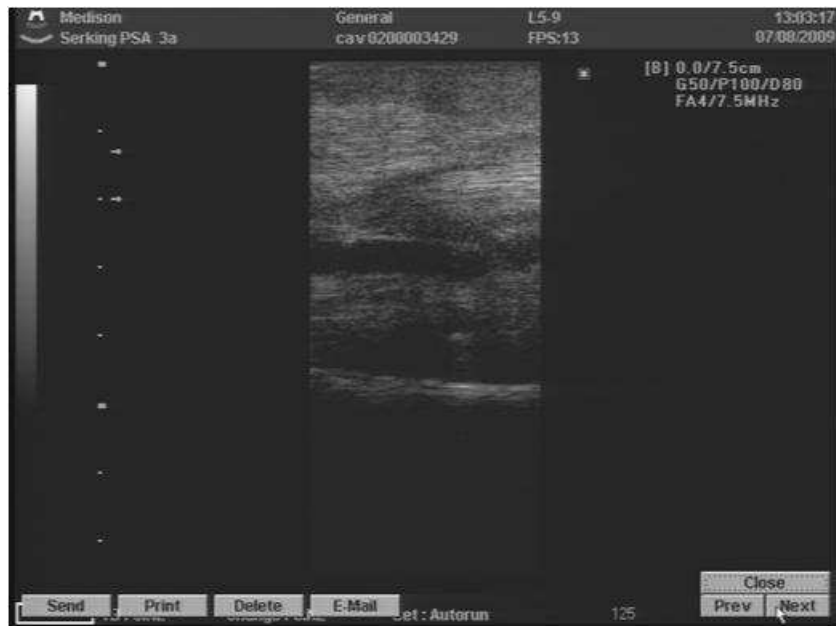


**Fig.1.22:** Visione arto anteriore destro (leso) e sinistro quindici giorni dopo inoculo cellule staminali mesenchimali nella lesione 3 mesi post intervento.



**Fig1.23:** Ecografia trasversale tendine flessore superficiale destro effettuata un mese dopo l'inoculo di cellule staminali. L'ecogenicità del tendine è pressoché normale





**Fig1.24:** Ecografia longitudinale tendine flessore superficiale arto anteriore destro. Ecogenicità tendinea nella norma.

Quattro mesi dopo l'inoculo di cellule staminali, il soggetto è stato nuovamente ricoverato presso il Servizio di Accettazione e Ricovero Grossi Animali, per un intervento di castrazione. In quell'occasione si è provveduto all'esame visivo ed ecografico del tendine lesionato. Macroscopicamente l'arto è apparso di volume ancora leggermente aumentato rispetto al controlaterale con cicatrice lineare, non esuberante, poco evidente (Fig.1.25).

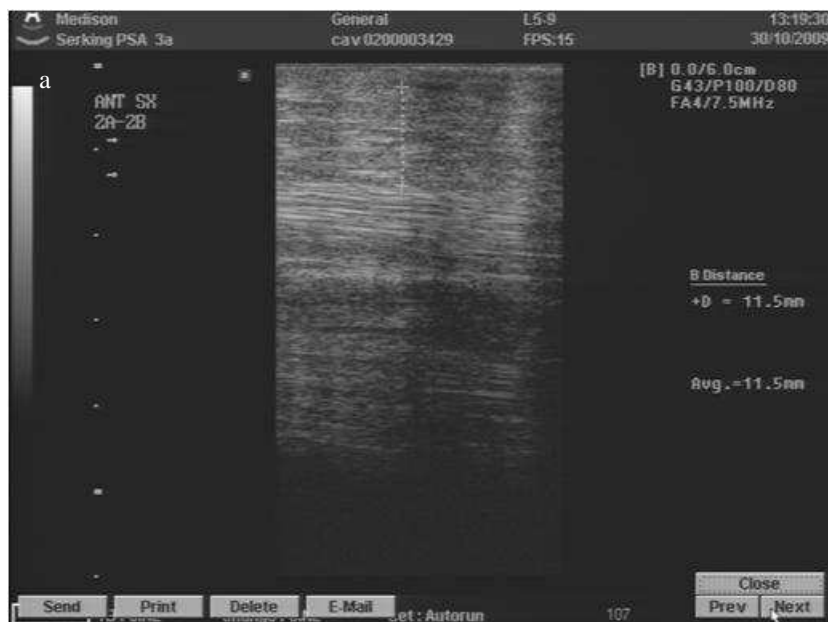


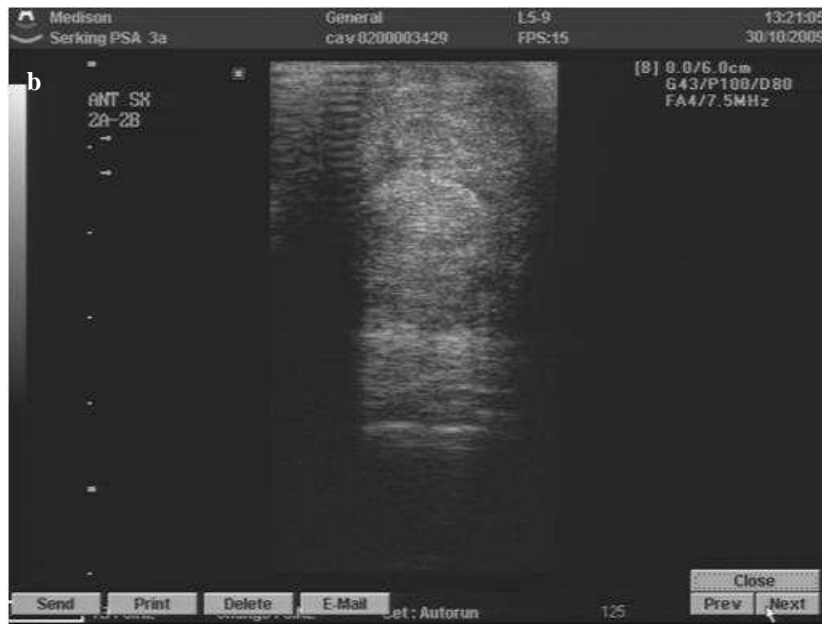
**Fig.1.25:** Visione laterale arto anteriore destro sei mesi dopo l'infortunio.

All'esame ecografico il tendine lesionato è apparso leggermente più sottile del controlaterale nella parte in cui era stato reciso; dato che l'animale al momento dell'esecuzione dell'esame non era ancora stato sottoposto ad attività fisica, a carico del tendine erano presenti aree iperecogene di calcificazione, normali in caso di prolungato riposo posttraumatico e che tenderanno a scomparire con la ripresa dell'esercizio. L'andamento delle fibre tendinee evidenziato all'esame ecografico risultava essere nella norma (Fig.1.27; Fig.1.28).

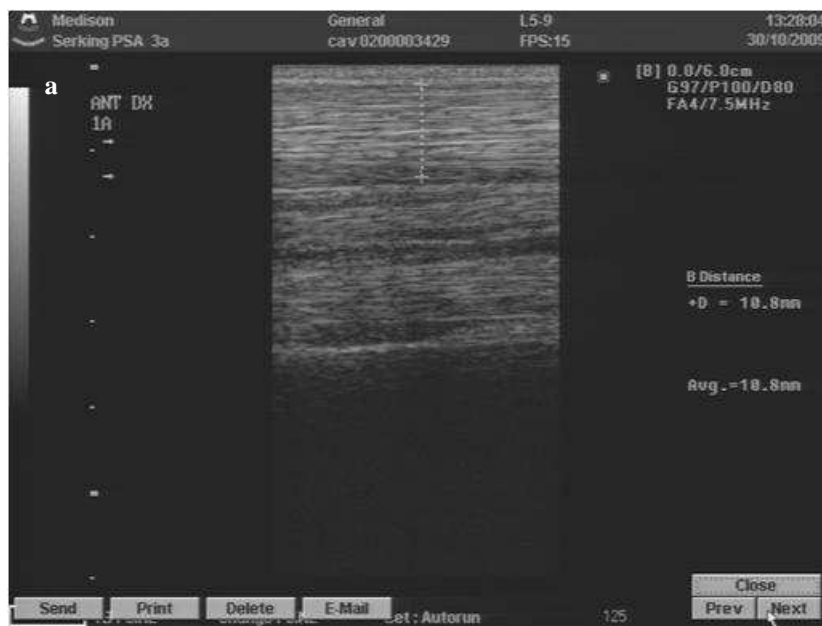


**Fig.1.26:** Esecuzione dell'indagine ecografica, arto anteriore destro





**Fig.1.27:** Immagini ecografiche longitudinali (a) e trasversali (b) regione palmare metacarpo sinistro





**Fig.1.28:** Immagini ecografiche longitudinali (a) e trasversali (b) regione palmare metacarpo destro.

#### Caso Clinico 8:

A seguito dell'impianto di cellule staminali eterologhe, non è stata evidenziata alcuna reazione infiammatoria a carico della parte di inoculo. Durante l'attività riabilitativa non sono state segnalate recidive a carico dell'arto trattato o del controlaterale. Il cavallo riprenderà a breve l'attività sportiva.

#### Caso Clinico 9:

Dopo aver fatto ritorno alle scuderie di origine, il soggetto è stato sottoposto a terapia riabilitativa. Per il momento, anche se non è ancora stata ripresa l'attività agonistica, non sono state segnalate recidive.

### 1.4 Discussioni

Nel presente studio, sono state isolate con una percentuale del 100% cellule con caratteristica formula fibroblasto-simile da campioni di tessuto adiposo e di midollo osseo di cavalli adulti (range 2-10 anni di età). La staminalità di queste cellule è stata dimostrata

non solo attraverso la differenziazione in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico, ma anche attraverso caratterizzazione molecolare.

Per quanto riguarda le cellule isolate da midollo osseo, queste hanno presentato un tempo di duplicazione cellulare di  $3,2\pm 1,5$ , senza presentare una fase di latenza iniziale; il numero totale di duplicazioni cellulari al passaggio 5 è stato pari a  $26,2\pm 5,0$ . I dati da noi ottenuti si discostano da quelli messi in evidenza precedentemente da altri Autori; Vidal et al (2006), per esempio evidenziarono come le cellule da loro isolate si caratterizzassero per una iniziale fase di latenza, caratterizzate da un tempo di duplicazione cellulare pari a  $5\pm 1,6$  giorni, seguita successivamente da una rapida ripresa della duplicazione cellulare, con tempo di duplicazione pari a  $1,4\pm 0,26$  giorni. Data la fase di latenza iniziale il numero totale di duplicazioni cellulari è pressoché simile a quello da noi calcolato. Gli stessi Autori (Vidal et al 2007), successivamente evidenziarono invece come le cellule isolate da tessuto adiposo di cavallo fossero caratterizzate da tempo di duplicazione superiore rispetto alle BMMSCs, pari a  $2,1\pm 0,9$  e da un numero totale di duplicazione cellulare inferiore, pari a  $28\pm 2$ . Questi dati, così come quelli riguardanti la differenziazione cellulare, sono in netto disaccordo con quanto riscontrato alle nostre condizioni di coltura. Il tempo di duplicazione delle cellule mesenchimali isolate da tessuto adiposo di cavallo, da noi riscontrato, è stato significativamente inferiore rispetto a quello delle BMMSCs coltivate alle medesime condizioni ( $1,3\pm 0,7$  vs  $3,2\pm 1,5$ ). La coltura cellulare in vitro è stata protratta per le cellule isolate da tessuto adiposo fino al passaggio 8, mentre per quelle isolate da midollo osseo la coltura è terminata al passaggio 5. Ancora sono state riscontrate differenze nella capacità differenziativa di queste due linee cellulari: infatti le cellule isolate da tessuto adiposo, a differenza di quanto già dimostrato da Vidal et al (2007; 2008) nella specie equina e da Huang et al (2005) e Solchaga et al (2005), dopo coltura in media opportunamente supplementati per tre settimane, mostrano maggiori accumuli di

glicosaminoglicani, sali di calcio e vacuoli lipidici. Anche Colleoni et al (2009) mettendo a confronto le medesime linee cellulari, ne hanno evidenziato le medesime differenze. Gli Autori ipotizzarono come le differenze riscontrate nelle capacità differenziative delle cellule potessero essere imputabili alla senescenza cellulare, ed alla capacità o meno delle cellule di mantenere il loro potenziale differenziativo dal primo all'ultimo passaggio della coltura *in vitro*, come precedentemente dimostrato per le MSCs umane (Bruder et al. 1997; Digirolamo et al. 1999). Variabili critiche che possono influenzare l'isolamento e la successiva coltura *in vitro* delle linee cellulari in esame, secondo quanto riportato da Sotiropoulou et al. (2006) e successivamente da Wagner e Ho (2007), potrebbero essere la variabilità del donatore, il tessuto di origine, la selezione cellulare, la superficie di coltura, il terreno di coltura, la tensione di ossigeno, il siero fetale, la densità cellulare, tutti fattori che possono avere un impatto sulla morfologia e sulla composizione della preparazione cellulare. Colleoni et al (2009), riportarono le medesime differenze da noi riscontrate tra le linee cellulari in esame, in termini di tempo di duplicazione cellulare e di numero totale di duplicazioni, evidenziando come il tessuto adiposo possa essere considerato nella specie equina una miglior risorsa di MSCs in termini di replicazione cellulare.

Come per altre specie animali anche per la specie equina gli studi relativi alla caratterizzazione molecolare delle MSCs sono alquanto scarsi dato l'esiguo numero in commercio di markers di superficie specifici per questa specie; Arnhold et al (2007) riportano come le cellule isolate da midollo osseo equino siano positive per CD 90, mentre più recentemente de Mattos Carvalho et al (2009), hanno dimostrato la positività di tali cellule a CD90 dal passaggio 1 al 4 di coltura utilizzando markers specifici per ratto. Le stesse cellule sono risultate positive a CD44, positività che aumenta con l'aumentare dei passaggi; nessuna reazione invece è stata rilevata per il CD13. Nel presente studio, le cellule isolate da tessuto adiposo e midollo osseo di cavallo sono state

sottoposte a caratterizzazione molecolare con alcuni markers specifici di staminalità mesenchimali. Non esistendo markers specifici per la specie equina, la prova è stata svolta con markers normalmente impiegati per la caratterizzazione di cellule umane. Le cellule sono risultate positive per CD90, CD44 e CD105, e negative per markers di staminalità tipicamente emopoietici quali CD34, CD14 e CD45. È risultata negativa anche l'espressione di CD73, che però, a differenza degli altri antigeni non ha dimostrato una cross-reazione ottimale con le cellule equine, quindi la sua negatività potrebbe non essere significativa.

Dal punto di vista clinico, non sono stati riscontrati eventi patologici secondari né a seguito del prelievo né a seguito dell'inoculo di cellule staminali mesenchimali eterologhe o autologhe. I cavalli trattati seppur numericamente poco significativi, hanno avuto nel 66,7% (6/9) dei casi un'evoluzione fino a questo momento positiva; di 1/9 è andato incontro a recidiva, 1/9 hanno presentato una lesione all'arto controlaterale. I risultati riportati nel presente studio non si discostano da quelli riportati precedentemente in letteratura (Pacini 2007; Ferris 2009). Dato che non ci è stato possibile valutare personalmente il follow up degli animali trattati non possiamo essere certi della corretta esecuzione del protocollo riabilitativo suggerito, essenziale per ridurre al minimo il rischio di recidive o lesioni a carico dell'arto controlaterale. Per la prima volta nel presente studio, BMMSCs autologhe sono state inoculate in tendine non traumatizzato ma nettamente reciso. I risultati ottenuti in quest'ultimo caso sono da ritenersi ampiamente soddisfacenti, dato che già a due settimane e successivamente a 4 mesi dall'inoculo il tendine presentava una riorganizzazione delle fibre del tutto fisiologica.



## **1.5 Conclusioni**

Questo studio ha permesso di sviluppare, nella specie equina, protocolli efficaci di isolamento e differenziazione condrogenica, osteogenica ed adipogenica, di cellule staminali mesenchimali a partire da tessuti adulti, quali tessuto adiposo e midollo osseo. Grazie alle potenzialità differenziative dimostrate *in vitro*, le cellule isolate, in particolare quelle da tessuto adiposo, sembrano riservare grandi promesse nel campo dell'applicazione clinica in cavalli affetti da infermità ortopediche. Tale ipotesi è stata avvalorata dal successo ottenuto nell'applicazione clinica delle medesime cellule, anche se tali risultati dovranno essere confermati da prove effettuate su un numero di soggetti maggiormente significativo.

## **2. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAZIONE, CARATTERIZZAZIONE E APPLICAZIONI CLINICHE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA SANGUE CORDONALE, GELATINA DI WHARTON E LIQUIDO AMNIOTICO NELLA SPECIE EQUINA**

### **2.1 Materiali e metodi**

#### 2.1.1 Prelievo dei campioni e isolamento delle cellule

I campioni di liquido amniotico, gelatina di Wharton e sangue cordonale sono stati prelevati da fattrici di età compresa tra i 6 e 15 anni. Parte dei prelievi è stata effettuata da fattrici afferenti all'Unità di Perinatologia, Dipartimento Clinico Veterinario, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna, per l'assistenza al parto; la restante parte dei campioni è stata invece prelevata al momento del parto presso la Scuderia Trio (Ozzano Emilia-Bo). Le procedure sono state effettuate in accordo con il DL 116/92, e previa approvazione del Comitato Etico dell'Università di Bologna e del Ministero della Salute. Tutte le cavalle, impiegate nella prova, hanno avuto una gravidanza normale seguita da parto spontaneo e eutocico; inoltre tutti i puledri hanno manifestato immediatamente dopo la nascita un APGAR score compreso tra 9 e 10 (ottimo).

Tutti i reagenti utilizzati sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) se non diversamente specificato. Tutte le plastiche impiegate sono state invece acquistate presso Sartstedt Inc. (Newton, NC, USA).

##### *2.1.1.1 Liquido Amniotico*

I campioni di liquido amniotico sono stati prelevati al momento del parto, immediatamente dopo il passaggio del puledro e del sacco amniotico attraverso la vulva utilizzando una siringa sterile da 60 ml (IMI, Padova, Italia) contenente 1 ml di una

soluzione di EDTA, per evitare la formazione di coaguli che avrebbero potuto inficiare l'isolamento cellulare. I campioni sono stati conservati in frigorifero a +4°C per un tempo massimo di 12 ore prima di essere processati. Una volta in laboratorio ogni campione è stato trasferito in provette da 50 ml, diluito 1:1 con PBS addizionato con antibiotici (100 UI/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina) e centrifugato per 15 minuti a 1500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R). Dopo centrifugazione, il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in 5ml di medium di coltura costituito da DMEM/TCM199 (1:1), addizionato con 10% FBS (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA), 100 UI/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina. Per separare la componente cellulare mononucleata e non del liquido amniotico, il campione è stato posto su 5 ml di una soluzione di Percoll al 70% in una provetta da 50 ml. La centrifugazione è stata effettuata a 3000 rpm per 30 minuti. Le cellule a livello di interfaccia tra le due soluzioni sono state quindi aspirate e lavate per 3 volte con medium di coltura mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti. Una volta effettuato l'ultimo lavaggio ed eliminato il surnatante, le cellule sono state risospese in 1 ml di medium di coltura e sottoposte a conta cellulare mediante emocitometro.

#### *2.1.1.2 Sangue Cordonale*

I campioni di sangue cordonale sono stati prelevati dalla vena ombelicale immediatamente prima del distacco del cordone ombelicale, utilizzando una siringa da 60 ml (IMI, Padova, Italia) contenente 1 ml di eparina (Eparina Vister 5000 UI/ml. Marvecspharma, Milano) per evitare che la coagulazione ematica inficiasse l'isolamento cellulare. I campioni sono stati conservati in frigorifero a +4°C per massimo 12 ore prima di essere processati. In laboratorio ogni campione di sangue cordonale è stato trasferito in provette da 50 ml, diluito 1:1 con PBS addizionato con antibiotici e centrifugato per 15

minuti a 1500 rpm. Dopo centrifugazione il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in 5 ml di terreno di coltura. Per separare i globuli rossi dalla componente cellulare mononucleata, il campione è stato posto su 5 ml di una soluzione di Percoll al 70% in una provetta da 50 ml. La centrifugazione è stata effettuata a 3000 rpm per 30 minuti. Le cellule a livello di interfaccia tra le due soluzioni sono state aspirate e lavate per 3 volte con terreno di coltura mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti. Dopo tale procedura, le cellule presenti sul fondo della provetta sono state diluite in 1 ml di medium di coltura e si è quindi proceduto con la conta cellulare mediante emocitometro.

#### *2.1.1.3 Gelatina di Wharton*

Immediatamente dopo la rottura del cordone ombelicale, la parte di questo più vicina al puledro, caratterizzata da una maggiore quantità di gelatina di Wharton è stata recisa, posta in una soluzione di PBS e antibiotici e conservata per massimo 12 ore a +4°C. In laboratorio il cordone ombelicale (Fig.2.1a) è stato posto in etanolo al 70% per 10 minuti e poi lavato per immersione ripetuta con PBS addizionato con antibiotici. Successivamente la gelatina di Wharton (Fig.2.1b) è stata isolata, pesata e quindi sminuzzata in pezzi di circa 0.5 cm. Questi sono stati posti in provette da 50 ml contenenti una soluzione allo 0.1% di collagenasi (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) in PBS (1ml di soluzione/1g di campione). I campioni sono stati quindi posti a bagnomaria a 37°C per 1-2 ore. Dopo questo periodo di tempo, la collagenasi è stata inattivata mediante aggiunta di PBS supplementato con 10% FBS; la soluzione è stata quindi filtrata per eliminare i residui di tessuto connettivo non digerito, diluita 1:1 con terreno di coltura e centrifugata a 1500 rpm per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato quindi lavato per tre volte usando il medesimo terreno mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 min. Anche in questo caso, come per il liquido amniotico e il sangue

cordonale, al termine dell'ultimo lavaggio, dopo eliminazione del surnatante, il pellet di cellule è stato diluito con 1 ml di medium di coltura e le cellule sono state contate con emocitometro.



**Fig.2.1:** Campione di cordone ombelicale di cavallo: (a): Porzione di cordone ombelicale con gelatina di Wharton; (b): Primo piano della gelatina di Wharton.

### 2.1.2 Espansione cellulare *in vitro*

Per tutte e tre le linee cellulari, le cellule primarie sono state seminate in flask da 25 cm<sup>2</sup> ad una densità di 5 x 10<sup>4</sup> cellule per cm<sup>2</sup> e incubate in atmosfera umidificata a 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura è stato cambiato per la prima volta dopo 48 ore e successivamente due volte a settimana fino ad ottenere una confluenza cellulare pari all'80%. A questo punto le cellule sono state staccate dalla flask mediante digestione enzimatica con una soluzione allo 0.05 % di tripsina; dopo un tempo massimo di 10 minuti, la tripsina è stata inattivata mediante aggiunta di 5ml di medium di coltura addizionato 10% di FBS, quindi la soluzione cellulare ottenuta è stata posta in provette da 10 ml e centrifugata per 6 minuti a 700 rpm. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato diluito con 1 ml di terreno di coltura, le cellule contate con un emocitometro e riseminate come "Passaggio 1" (P1) ad una densità di 25 x 10<sup>3</sup> cellule/cm<sup>2</sup>. Per i passaggi successivi le cellule sono state poste in flask da 25 cm<sup>2</sup> a 25x 10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup> e lasciate moltiplicare per 6/7 giorni fino al raggiungimento di una confluenza del 90% prima della tripsinizzazione e successivo passaggio. Il tempo di duplicazione cellulare, il numero di duplicazioni cellulari e il tempo di coltura cellulare sono stati calcolati per ogni passaggio utilizzando le due formule seguenti (Vidal et al., 2007):

$$CD = \ln (N_f / N_i) / \ln (2) \quad (1)$$

$$DT = CT / CD \quad (2)$$

I dati sono stati espressi come media ± deviazione standard e sono stati analizzati mediante ANOVA (Statistica for Windows-Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Le differenze sono state considerate significative per P<0.05.

### 2.1.3 Differenziazione *in vitro*

#### 2.1.3.1 Differenziazione condrogenica

Le cellule espanse al passaggio P3 dopo lavaggio con PBS, sono state sottoposte a tripsinizzazione e successiva centrifugazione a 700 rpm per 6 minuti. Dopo conta cellulare,  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> sono state risospese in 2 ml di medium di coltura e poste in piastre 6 well in incubatore a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub> per 24 ore al fine di ottenere l'adesione cellulare. Dopo questo periodo di tempo il medium è stato sostituito con medium da differenziazione condrogenica consistente in TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina, 6.25 µg/ml di insulina, 50 nM di acido ascorbico, 0.1 µM di desametazone, 10 ng/ml hTGF-β1 (PeproTech, UK) e 1% FBS (Mizuno e Hyakusoku, 2003). Le cellule sono quindi state coltivate in monostrato a 38,5°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 21 giorni e il medium da differenziazione è stato cambiato completamente due volte a settimana. Passate le tre settimane di coltura, le cellule sono state fissate in formalina al 10% per un'ora a temperatura ambiente; successivamente è stato effettuato un lavaggio con acqua demineralizzata e le cellule sono state colorate con una soluzione in acido acetico di Alcian Blu (1% in una soluzione al 3% di acido acetico; pH 2.5) per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo questo tempo la soluzione di Alcian Blu è stata rimossa e le cellule lavate per tre volte con una soluzione di acido acetico al 3% al fine di eliminare i residui di colorante. La colorazione impiegata colora in blu i depositi di glicosaminoglicani intra ed extra cellulari caratteristici della condrogenesi.

### *2.1.3.2 Differenziazione osteogenica*

Le cellule espanse al passaggio P3 sono state lavate con PBS, sottoposte a tripsinizzazione e successiva centrifugazione. Una volta diluito il pellet ottenuto con 1 ml di medium da coltura e contate le cellule, queste sono state poste in piastre 6 well alla densità di  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in 2 ml di terreno di coltura per 24 ore al fine di ottenere l'adesione cellulare. Passato questo tempo, il terreno è stato sostituito con medium da differenziazione consistente in TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 10% di FBS, 10 mM di β-glicerofosfato, 0.1 µM di desametasone, 50 µM di acido ascorbico (Mizuno e Hyakusoku, 2003). Le cellule sono state coltivate, a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub>, in monostrato per tre settimane e il medium è stato completamente cambiato due volte a settimana.

L'avvenuta osteogenesi, caratterizzata dai depositi di calcio, è stata evidenziata dopo tre settimane di coltura utilizzando la colorazione di von Kossa e Alizarin Red. Per la colorazione di von Kossa, le cellule sono state fissate in una soluzione di formalina al 10% per un'ora a temperatura ambiente, quindi lavate con acqua bidistillata, ricoperte con una soluzione al 5% di nitrato di argento e successivamente esposte alla luce gialla per 15 minuti. I depositi di calcio fosfato si colorano di nero. Per effettuare la colorazione Alizarin Red, le cellule sono invece state fissate per un'ora a temperatura ambiente in una soluzione di etanolo al 70%; successivamente sono state lavate con acqua bidistillata quindi ricoperte con una soluzione al 2% di Alizin Red per 30 minuti. Dopo 4 lavaggi con acqua bidistillata, i depositi di calcio si colorano di arancione-rosso.

### *2.1.3.3 Differenziazione adipogenica*

Al passaggio P3 di coltura, le cellule, dopo tripsinizzazione e successiva centrifugazione sono state poste in piastre 6 well ad una densità di  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in



2 ml di medium di coltura per 24 ore per farsi che le cellule aderissero alla piastra. Dopo 24 ore il medium è quindi stato sostituito con terreno da differenziazione adipogenica costituito da TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 15% di siero di coniglio, 1 µM di desametasone, 0.5 mM di isobutil-metilxantina, 10 mM di insulina, 0.2 mM di indometacina, (Mizuno e Hyakusoku 2003; Koch et al 2007). Le cellule sono state coltivate in monostrato a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 74 ore, il medium è stato sostituito da medium nuovo privo di isobutil-metilxantina, e successivamente le cellule sono state mantenute in coltura per 21 giorni e il terreno sostituito 2 volte a settimana (Schuh et al 2009). Dopo questo periodo di tempo le cellule sono state fissate con una soluzione al 10% di formalina per 1 ora a temperatura ambiente, quindi lavate con acqua bidistillata e successivamente con isopropanolo al 60% per 5 minuti e quindi colorate con una soluzione di Oil Red O (0.3% in isopropanolo 60%) per 5 minuti. Passato questo tempo la soluzione di colorante è stata rimossa, le cellule lavate con acqua bidistillata. I vacuoli lipidici vengono colorati in rosso.

#### 2.1.4 Caratterizzazione molecolare

Una volta raggiunto il passaggio P3, le cellule sono state inoltre sottoposte a caratterizzazione molecolare. Per questo sono state lavate con PBS e staccate dalla superficie cellulare mediante a tripsinizzazione per massimo 10 minuti; successivamente la tripsina è stata inattivata con PBS+10%FBs, e le cellule sono state lavate mediante centrifugazione a 600 rpm per 5 minuti per due volte. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet è stato sospeso in 100 µl di Intraprep Kit Reagent 1 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) e incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 4 ml di PBS e la soluzione è stata centrifugata a 600 rpm per 5 min. Il pellet di cellule ottenuto, risospeso in 100 µl di PBS è stato incubato per 20 minuti a temperatura

ambiente con anticorpi CD105, CD90, CD44, CD45, CD34, CD14 e CD73 direttamente coniugati con FITC, PE o APC (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Sono stati utilizzati appropriati isotopi coniugati di controllo (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Dopo colorazione, le cellule sono state lavate per due volte con PBS e l'intensità della fluorescenza è stata valutata con citofluorimetro dotato di doppio laser FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) e i risultati successivamente analizzati con programma CXP.

## **2.2 Applicazioni Cliniche**

Segnalamento:

Puledro di razza Quarter Horse, ospedalizzato presso l'Unità di Perinatologia Equina del Dipartimento Clinico Veterinario, Università di Bologna, 36 ore dopo la nascita con un peso di 39 Kg. All'inizio dei trattamenti l'età del soggetto era di 15 giorni e il peso 44 Kg.

Anamnesi:

Il puledro, nato durante la notte, senza assistenza, e ritrovato il mattino seguente al di fuori del box dove si trovava la madre, è stato ricoverato presso l'Unità di Perinatologia Equina a causa di uno stato di depressione; prima del ricovero i proprietari ne avevano osservato la minzione e l'espulsione di parte del meconio. La placenta esaminata dal veterinario referente era stata considerata nella norma in termini di dimensione e colore.

Visita Clinica:

Ad una iniziale visita clinica l'animale si presentava in piedi ma depresso; la temperatura rettale era di 38.1°C (range 37.2-38.9°C), le mucose erano cianotiche, la

frequenza respiratoria di 28 atti respiratori/minuto (range di riferimento 20-40) respiro discordante, la frequenza cardiaca di 136 battiti/minuto (range di riferimento 70-100), il polso periferico era assente e il tempo di riempimento capillare >3 sec (normale 1-2 sec). Il puledro presentava inoltre sclera iniettata, banda coronarica rosse e petecchie evidenti. Era inoltre evidente edema sottocutaneo a livello di gomiti e garretti. L'esame clinico, accompagnato da alterati livelli ematici di lattato, creatin-chinasi, bilirubina totale e urea, hanno permesso di effettuare una diagnosi di setticemia.

#### Terapia:

Il puledro è stato immediatamente sottoposto a ossigenoterapia, terapia fluida con soluzione di Ringer in bolo inizialmente, poi soluzione salina con glucosio al 2.5% a valori di mantenimento per tre giorni. L'animale è stato inoltre trattato con terapia antibiotica endovenosa a base di ampicillina e amikacina. Tre giorni dopo il ricovero la cute dei garretti e carpi gradualmente è andata incontro a distacco dando luogo alla formazione di ulcere profonde. Inizialmente le aree interessate, prima di essere bendate, sono state pulite giornalmente con soluzione salina e trattate con applicazione di una pomata a base di ozono (RHD; Acme Srl, Reggio Emilia Italia) o di sulfamidico (Socatil; Acme Srl, Reggio Emilia, Italia), gel di aloe, prodotti solitamente impiegati nella cura delle piaghe da decubito tipiche di puledri setticemici o che non assumono la stazione quadrupedale. Il puledro è stato anche trattato con acido acetilsalicilico (aspirina) per evitare il formarsi di trombosi a carico dei vasi arteriosi degli arti, metronidazolo per prevenire le infezioni da germi anaerobici a livello sottocutaneo e fenilbutazone per il controllo del dolore. Dopo 10 giorni dall'ospedalizzazione, a seguito di un intervento di chiusura dell'uraco e della ridotta quantità di latte assunta dal redo, le piaghe cutanee erano ancora molto profonde così che si è deciso per il ricorso alla terapia parenterale a

base di glucosio (10g/kg), aminoacidi (2g/kg) e lipidi (1g/kg). La terapia parenterale è stata poi gradualmente sospesa dopo 5 giorni. Dato che dopo 15 giorni di ospedalizzazione le piaghe cutanee erano ancora molto profonde e non presentavano segni di guarigione si è deciso di procedere con l'applicazione di cellule staminali e gel di piastrine (PRP).

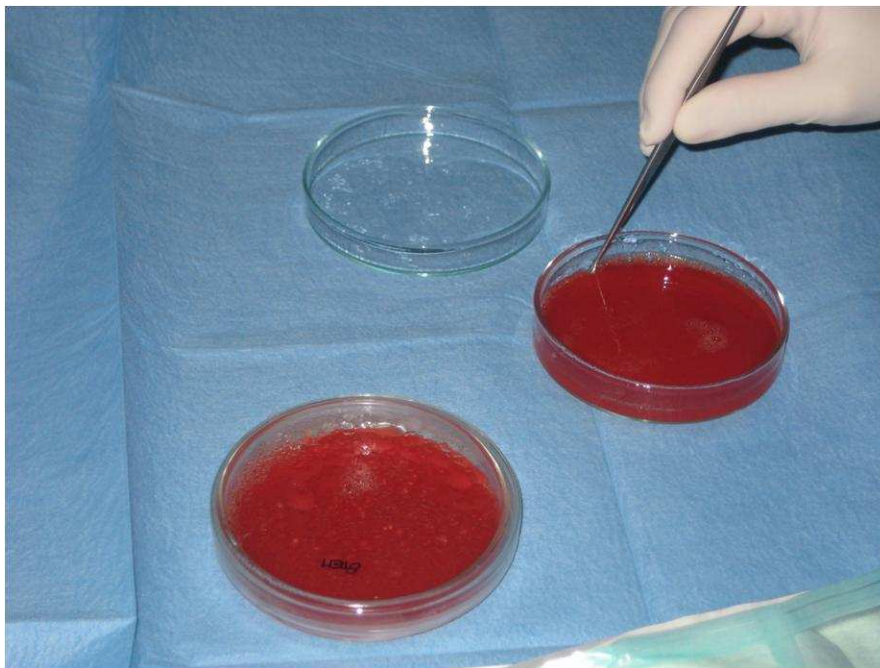
Dato lo scarso peso e le condizioni cliniche critiche del puledro, il gel di piastrine è stato preparato prelevando 350 ml di sangue venoso della madre, raccolto in sacche ematiche Baxter. Il sangue è stato inizialmente centrifugato a 500 g per 20 minuti, poi una volta separata la frazione corpuscolata dal plasma, è stata effettuata una seconda centrifugazione a 3000 g per 10 minuti. A questa è seguita la separazione del platelet poor plasma (plasma povero di piastrine) dalla frazione di platelet rich plasma (plasma ricco di piastrine); quest'ultima frazione che rappresenta circa il 5-10% del totale, è stata stoccata in eppendorf da 1,5 ml e posta in congelatore a -80°C, così da ottenere il lisato piastrinico ricco di fattori di crescita.

Le cellule staminali impiegate sono state isolate da liquido amniotico prelevato al momento del parto da una cavalla ricoverata presso l'Unità di Perinatologia Equina per assistenza al parto. Sono state impiegate le procedure di isolamento ed espansione cellulare *in vitro* precedentemente descritte.

Le piaghe sono state divise in tre gruppi:

- Controllo: Piaghe a carico di carpo e garretto sinistro trattate con gel di aloe;
- PRP: Piaga a carico del carpo destro trattata con gel di piastrine;
- Staminali+ PRP: Piaghe a carico del garretto destro trattata con staminali applicate utilizzando come scaffold gel di piastrine.

Subito prima di effettuare le applicazioni di cellule staminali e gel piastrinico, sotto cappa a flusso laminare, in condizioni sterili, le cellule sono state staccate dalle flask di coltura mediante tripsinizzazione e sottoposte a due centrifugazioni di lavaggio; al tempo stesso, circa 20 ml di gel di piastrine sono stati scongelati a temperatura ambiente e successivamente, sotto cappa a flusso laminare, secondo le norme di sterilità, sono stati suddivisi in due piastre Petri sterili di vetro di 100 mm di diametro. In una delle due piastre, al gel è stato aggiunto 1 ml di medium di coltura, senza FBS, contenente le cellule staminali ( $\sim 5 \times 10^6/\text{ml}$ ); entrambe le piastre sono state poste su piastra riscaldata a  $38.5^\circ\text{C}$  ed è stato aggiunto gluconato di calcio per favorire la solidificazione del PRP e la formazione di un disco gelatinoso applicabile sulle piaghe (Fig. 2.2).



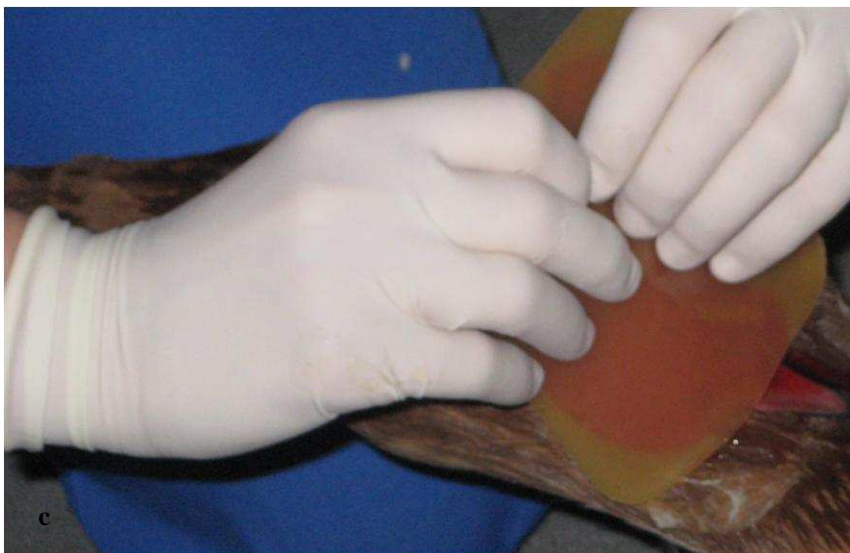
**Fig.2.2:** Dischi gelatinosi di PRP e PRP con cellule staminali.

In sala operatoria con il puledro in decubito laterale, le piaghe sono state lavate accuratamente con soluzione fisiologica sterile, senza effettuare alcuna azione di sfregamento. Prima dell'applicazione i dischi gelatinosi formati dal PRP solidificato sono stati trasferiti dalle piastre su garze Duoderm® sterili (Convatec, Roma, Italia) (Carter et al 2003).



**Fig.2.3:** (a) Trasferimento del disco gelatinoso dalla piastra Petri; (b) Disco gelatinoso su garza sterile Duoderm

Una volta effettuata l'applicazione, al di sopra delle garze Duoderm® (Fig.2.4a, b), sono state poste garze chirurgiche sterili e la fasciatura è stata effettuata con strati sovrapposti di cotone garzato, benda e Vetrap® (3M, Milano, Italia) (Fig.2.5).





**Fig.2.4:** Applicazione del disco gelatinoso con garza Duoderm su carpo (a,b) e garretto (c,d).



**Fig.2.4:** Bendaggio carpo destro dopo applicazione di PRP

Le applicazioni di cellule staminali e gel piastrinico sono state effettuate per quattro volte consecutive due volte a settimana. Le fasciature venivano tolte solo poco prima di procedere con l'applicazione; dopo l'ultima applicazione le fasciature venivano cambiate due volte a settimana, ma senza che venisse applicato altro trattamento. Gli arti con le piaghe trattate con applicazione di gel di aloe, venivano sfasciate, pulite e medicate ogni 48 ore. Tutte le piaghe ad un mese dall'inizio del trattamento sono state lasciate scoperte,



e non sono stati effettuati trattamenti successivi. Le aree di tutte le piaghe sono state misurate, inizialmente due volte a settimana, poi una volta a settimana per due mesi consecutivi.

I dati raccolti, espressi come percentuale di regressione media delle aree, sono stati analizzati mediante ANOVA (Statistica for Windows-Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0.05$ .

Dopo 25 giorni di degenza il puledro è stato dimesso, in buone condizioni fisiche, con un peso corporeo di 55 Kg; al proprietario è stata raccomandata terapia antibiotica per bocca, accompagnata da probiotici, fino alla completa guarigione delle piaghe.

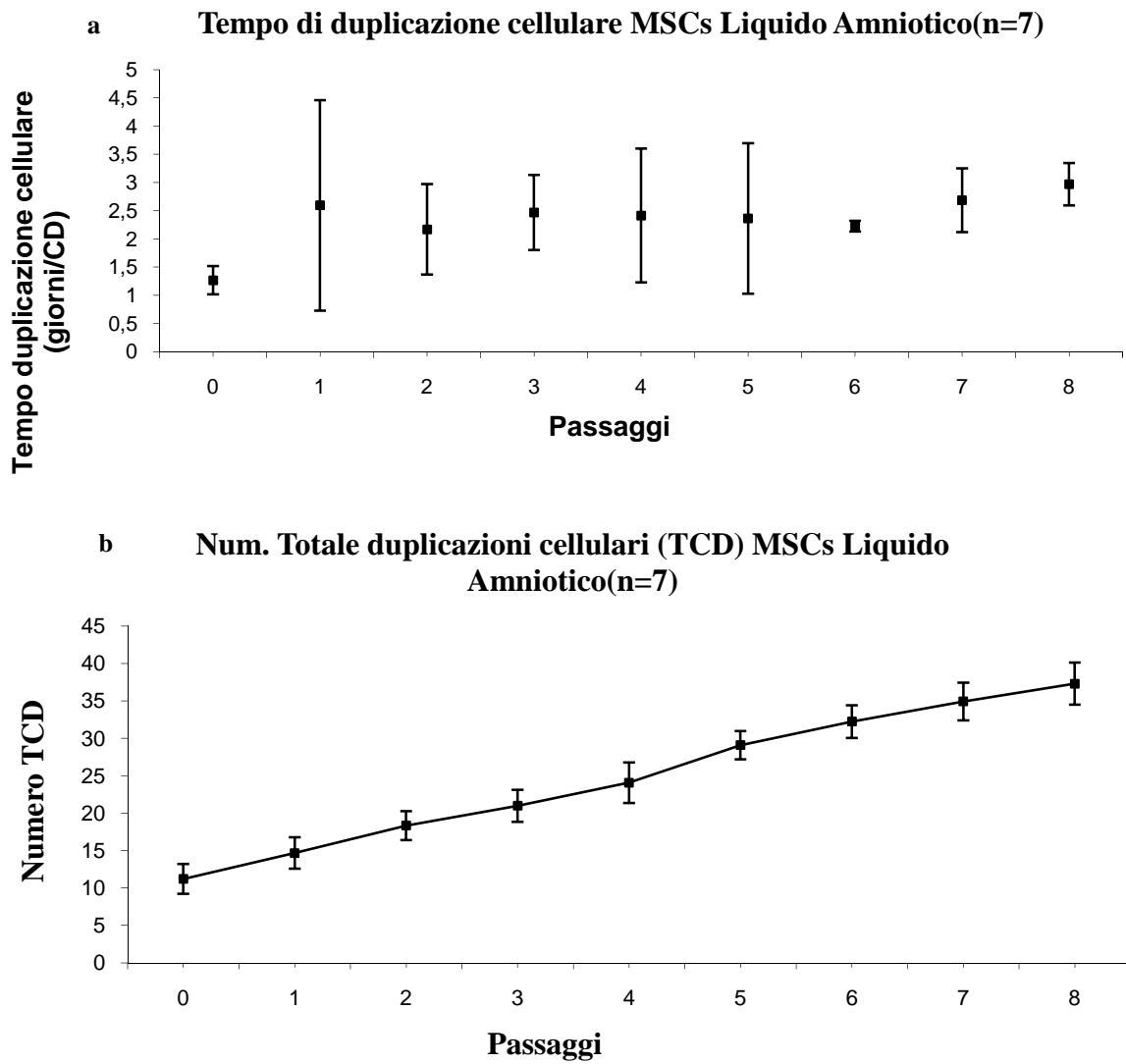
## **2.3 Risultati**

### 2.3.1 Isolamento, differenziazione e caratterizzazione

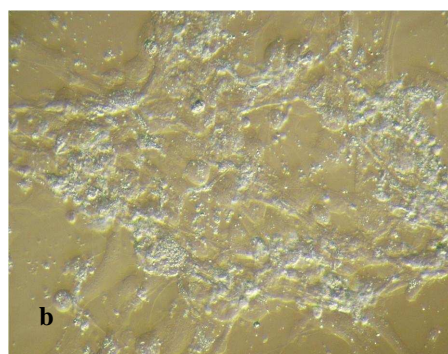
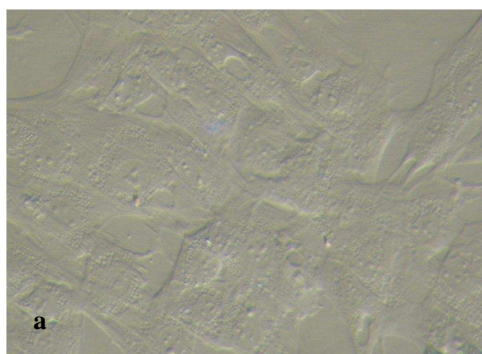
In nessuna delle fattrici e in nessuno dei puledri si sono verificati problemi a seguito dei prelievi effettuati.

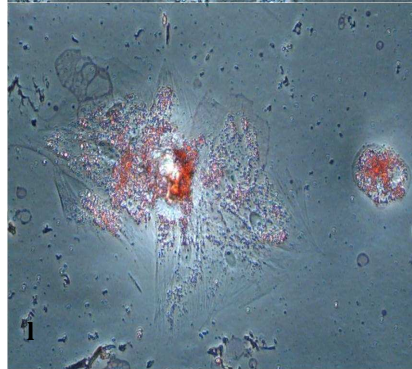
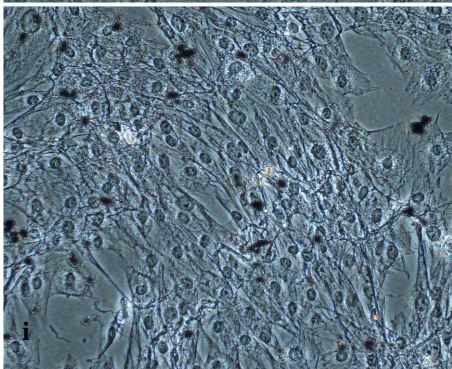
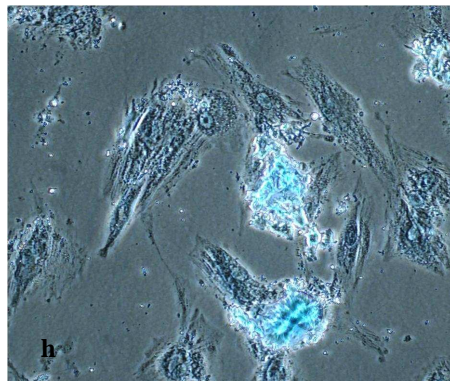
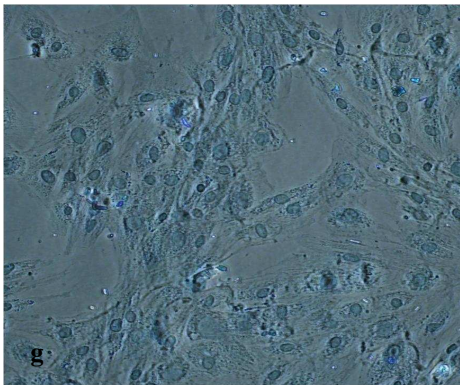
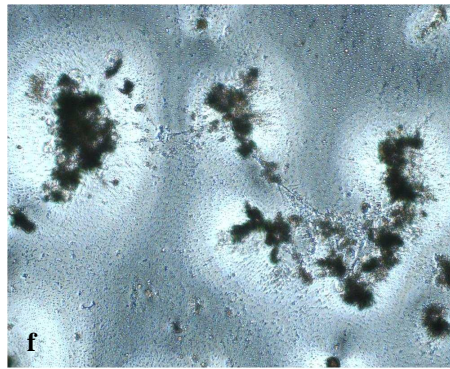
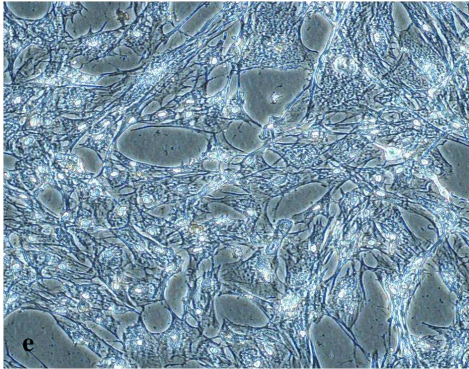
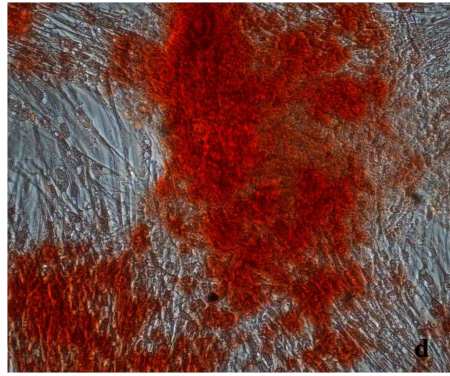
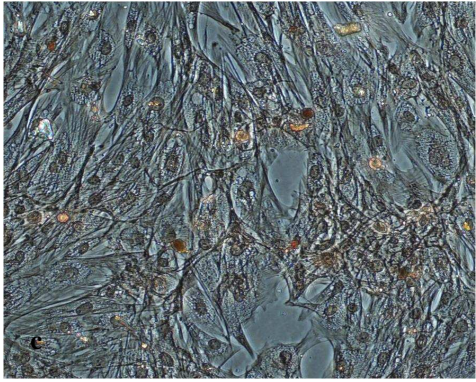
Per quanto riguarda il liquido amniotico, il volume raccolto ad ogni parto è stato di 15-50 ml con una media di  $35,0 \pm 23,5$  ml. È stato possibile effettuare il prelievo in 10 fattrici su 13 (77,0%); in 7/10 (70,0%) campioni si sono sviluppate colonie con la classica morfologia fibroblasto-simile delle cellule staminali mesenchimali (Fig.2.6a); mentre 3 campioni su 10 (30,0%) sono stati contaminati (1 da batteri e 2 da muffe). Il tempo di duplicazione delle popolazioni è stato compreso tra 0,6 e 4,5 giorni ed è risultato in media pari a  $2,3 \pm 1,0$  giorni per i passaggi P0-P8. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative ( $P > 0,05$ ) per quanto riguarda il tempo di duplicazione nei diversi passaggi (Fig.2.5a). Al passaggio 8 il numero di duplicazioni cellulari è stato di  $37,3 \pm 3$  (Fig.2.5b). Dopo tre settimane di coltura in medium da differenziazione condrogenica, la coltura cellulare, colorata con Alcian blu presentava accumuli di

glicosaminoglicani sia intracellulari che nella matrice extracellulare, accumuli tipici dell'avvenuta differenziazione condrogenica (Fig.2.6h); al contrario le cellule coltivate in medium di coltura normali presentavano scarse quantità di glicosaminoglicani all'interno del citoplasma, mentre erano assenti accumuli extracellulari (Fig.2.6g). Dopo induzione della differenziazione osteogenica, con coltura per 21 giorni in medium opportunamente addizionato, la morfologia cellulare si è presentata nettamente modificata, con cellule cubiche e non più affusolate (Fig.2.6b). Gli accumuli di sali di calcio sono stati evidenziati sia mediante colorazione di von Kossa, che colora in nero i depositi extracellulari (Fig.2.6f), sia mediante colorazione Alizarin Red, che invece colora in arancione-rosso i depositi (Fig.2.6d). Le cellule coltivate in medium di coltura standard sono invece risultate negative per entrambe le colorazioni, presentando solo una minima quantità di depositi di sali di calcio ritenuti fisiologici (Fig.2.6c,e). Per quanto riguarda la differenziazione adipogenica, invece, la colorazione Oil Red O, effettuata dopo tre settimane di coltura in medium specifico, ha messo in evidenza la differenziazione di queste cellule in adipociti, come testimoniato da un accumulo intracellulare di vacuoli lipidici superiore al controllo (Fig.2.6i,l)



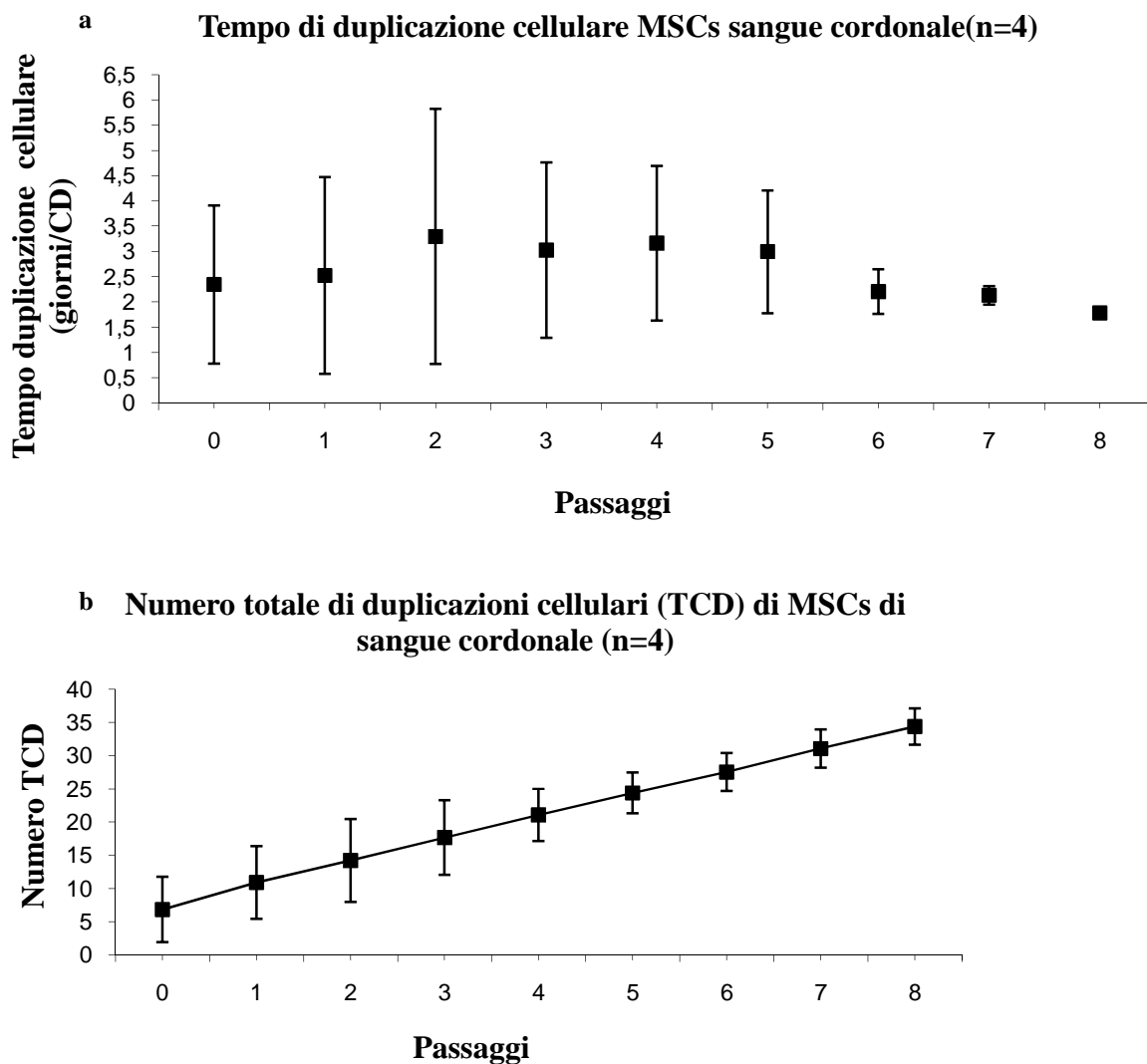
**Fig. 2.5** : Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dal liquido amniotico di cavallo.





**Fig.2.6:** Differenziazione *in vitro* di MSCs isolate da liquido amniotico di cavallo. (a) controllo dopo tre settimane in un medium di coltura standard: morfologia cellulare fibroblasto-simile (Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U; x20); (b) induzione osteogenica dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, le cellule assumono una morfologia cubica e sono visibili i depositi di calcio (x20); (c) controllo: dopo 21 giorni in medium di coltura standard: cellule negative alla colorazione Alizarin Red (x20); (d) induzione osteogenica: dopo tre settimane in medium di differenziazione: cellule positive a colorazione Alizarin Red (x20); (e) induzione osteogenica: controllo: cellule negative alla colorazione di von Kossa (x20); (f) induzione osteogenica: cellule positive alla colorazione di von Kossa (x20); (g) controllo: dopo tre settimane in un medium di coltura standard, le cellule hanno mantenuto una morfologia classica e risultano negative alla colorazione con Alcian Blu (x20); (h) induzione condrogenica: dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, cellule positive alla colorazione con Alcian Blu (x20); (i) controllo: cellule negative alla colorazione Oil Red O (x20); (h) induzione adipogenica: dopo 21 giorni di coltura in medium da differenziazione le cellule mostrano evidenti vacuoli positivi alla colorazione Oil Red O (x20).

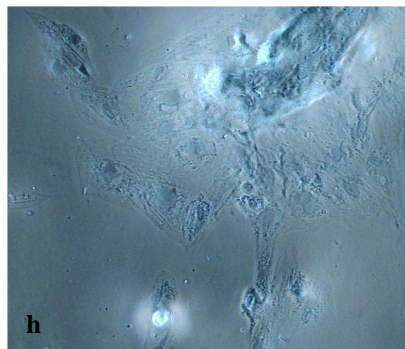
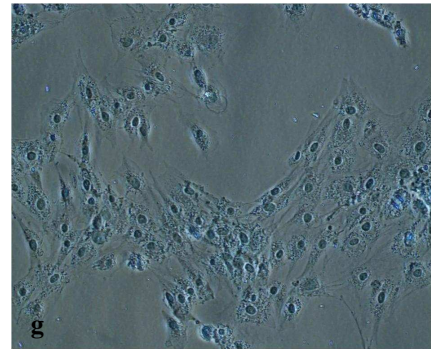
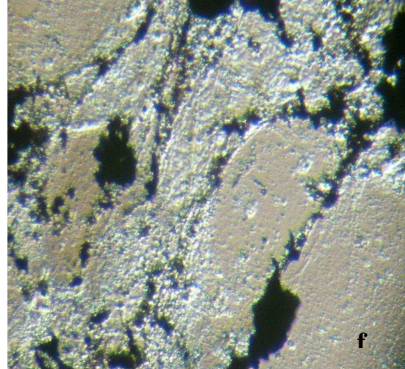
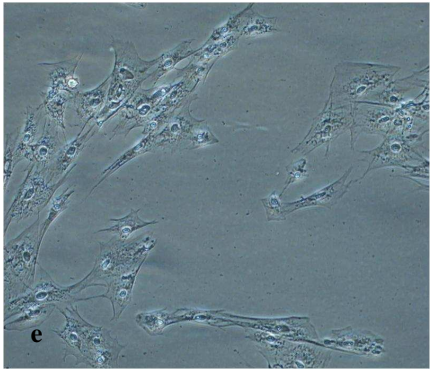
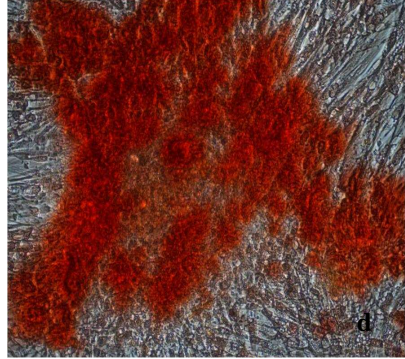
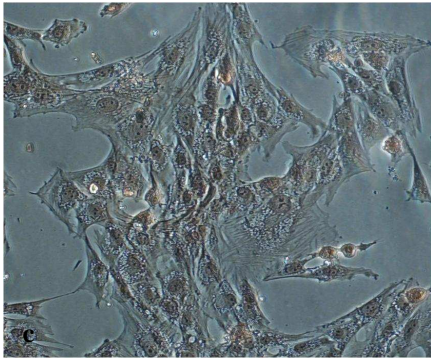
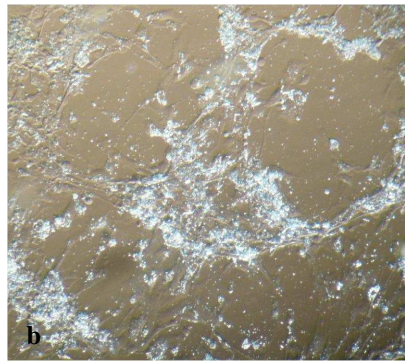
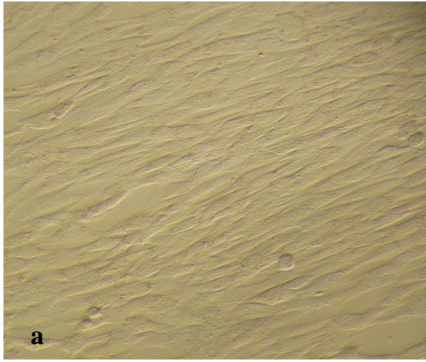
Per quanto riguarda il sangue cordonale, è stato possibile effettuare il prelievo solo in 8 casi su 13 (61,5%) a causa del precoce collasso della vena ombelicale. In media sono stati prelevati  $36,7 \pm 13,9$  ml (range 15-55 ml). In 6/8 campioni (75%) sono state isolate colonie di cellule con la classica morfologia fibroblasto simile (Fig.2.8a), mentre in un campione (1/8: 12,5%) non sono state isolate cellule e un campione è stato contaminato da muffe (1/8: 12,5%). Il tempo di duplicazione delle popolazioni è stato compreso tra 1,1 e 5 giorni e è risultato in media pari a  $2,6 \pm 1,3$  giorni per i passaggi P0-P8. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative ( $P > 0,05$ ) per quanto riguarda il tempo di duplicazione nei diversi passaggi (Fig.2.7a). Al passaggio 8 il numero di duplicazioni cellulari è stato di  $34,4 \pm 2,3$  (Fig.2.7b).



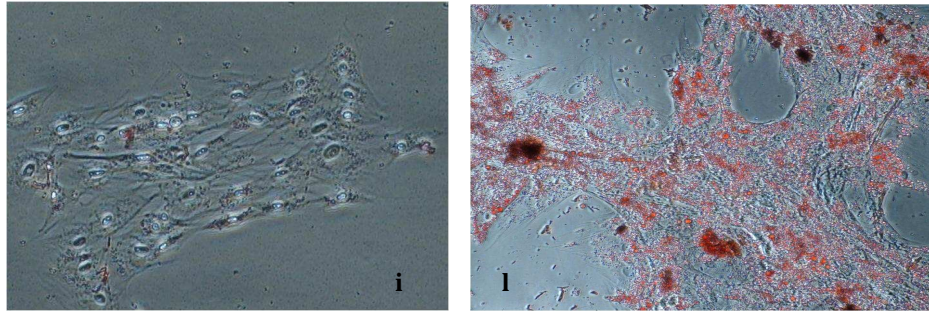
**Fig. 2.7:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dal sangue cordonale di cavallo.

La colorazione con Alcian Blu, effettuata dopo 21 giorni di coltura in medium da differenziazione, ha evidenziato accumuli di glicosaminoglicani intracellulari ed extracellulari, caratteristici dell'avvenuta differenziazione condrogenica (Fig.2.8h); al contrario le cellule coltivate in medium di coltura standard presentavano scarse quantità di glicosaminoglicani all'interno del citoplasma, mentre erano assenti accumuli extracellulari (Fig.2.8g). Dopo coltura per 21 giorni in medium opportunamente addizionato per ottenere una differenziazione cellulare in senso osteogenico, le cellule

presentavano morfologia cubica e non più fibroblasto-simile (Fig.2.8b). I sali di calcio depositati nella matrice extracellulare sono stati evidenziati in nero con la colorazione di von Kossa (Fig.2.8f), e in arancione-rosso con colorazione Alizarin Red (Fig.2.8d). Le cellule coltivate in medium di coltura standard sono invece risultate negative per entrambe le colorazioni, presentando solo una minima quantità di depositi di sali di calcio ritenuti fisiologici (Fig.2.8c,e). Nelle cellule coltivate con medium da differenziazione adipogenica per tre settimane, la colorazione Oil Red O ha messo in evidenza un ingente accumulo di vacuoli lipidici nella cellule, di gran lunga superiore rispetto a quelli presenti nella coltura di controllo, ma anche rispetto a quelle di liquido amniotico e Wharton's Jelly in cui era stata indotta la medesima differenziazione (Fig.2.8i,l).

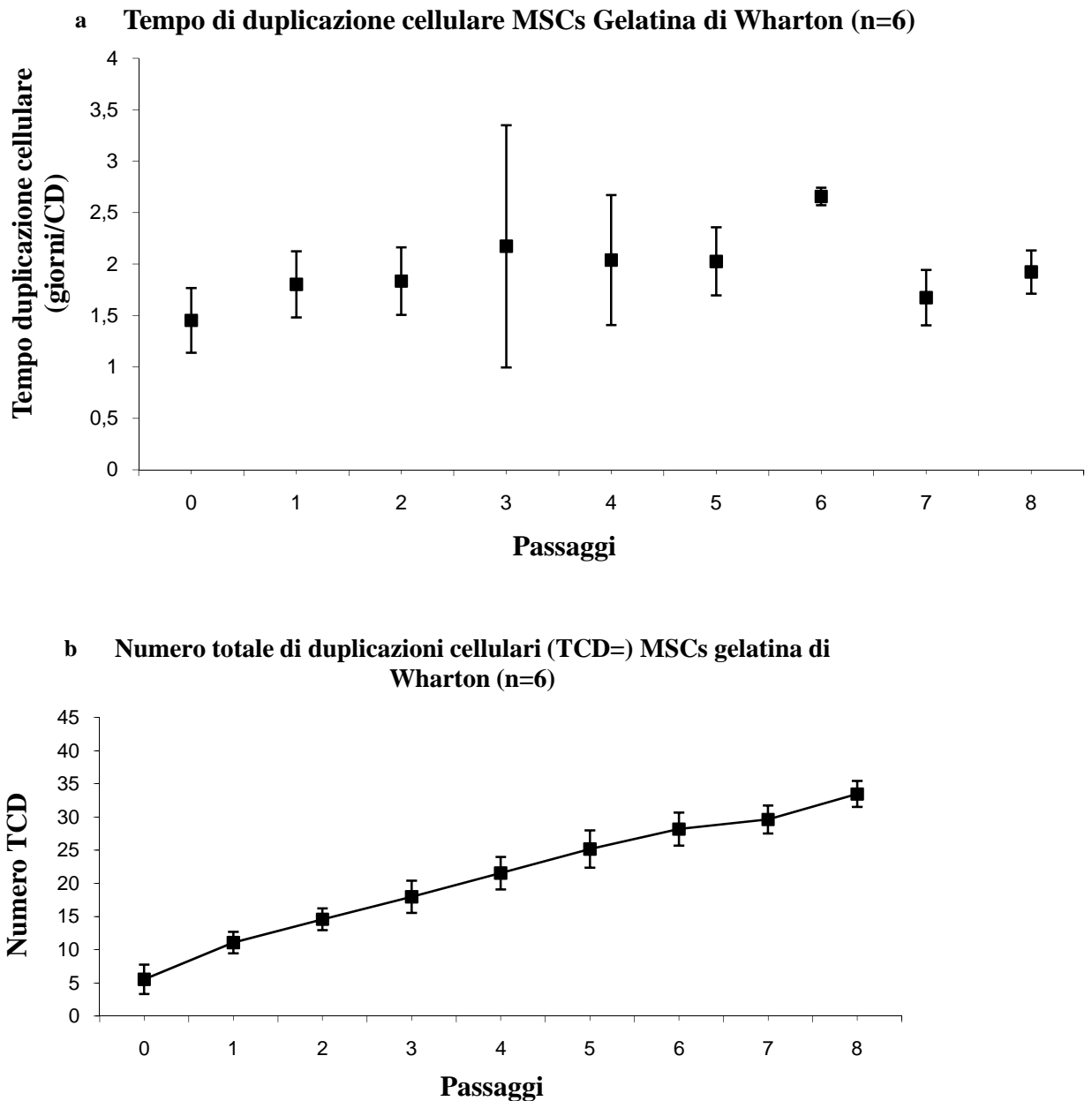






**Fig.2.8:** Differenziazione *in vitro* di MSCs isolate da sangue cordonale di cavallo. (a) controllo dopo tre settimane in un medium di coltura standard: morfologia cellulare fibroblasto-simile (Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U; x20); (b) induzione osteogenica dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, le cellule assumono una morfologia cubica e sono visibili i depositi di calcio (x20); (c) controllo: dopo 21 giorni in medium di coltura standard: cellule negative alla colorazione Alizarin Red (x20); (d) induzione osteogenica: dopo tre settimane in medium di differenziazione: cellule positive a colorazione Alizarin Red (x20); (e) induzione osteogenica: controllo: cellule negative alla colorazione di von Kossa (x20); (f) induzione osteogenica: cellule positive alla colorazione di von Kossa (x20); (g) controllo: dopo tre settimane in un medium di coltura standard, le cellule hanno mantenuto una morfologia classica e risultano negative alla colorazione con Alcian Blu (x20); (h) induzione condrogenica: dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, cellule positive alla colorazione con Alcian Blu (x20); (i): controllo: cellule negative alla colorazione Oil Red O (x20); (h) induzione adipogenica: dopo 21 giorni di coltura in medium da differenziazione le cellule mostrano evidenti vacuoli positivi alla colorazione Oil Red O (x20).

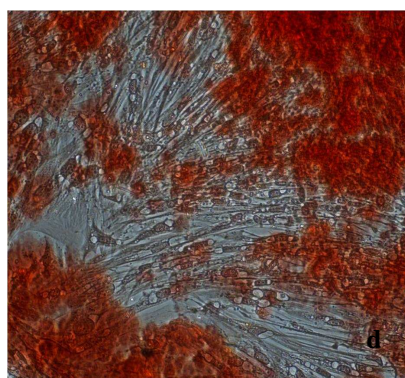
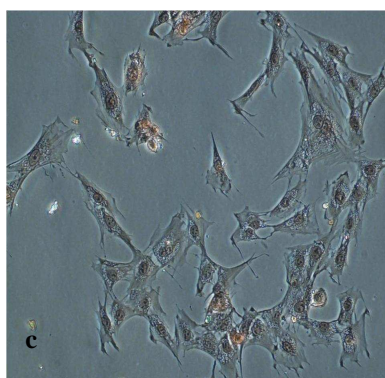
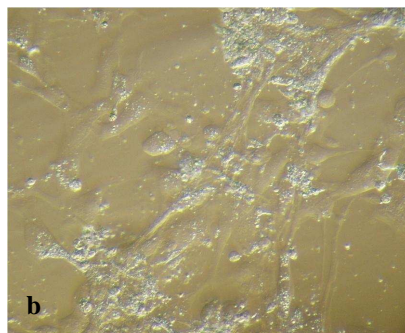
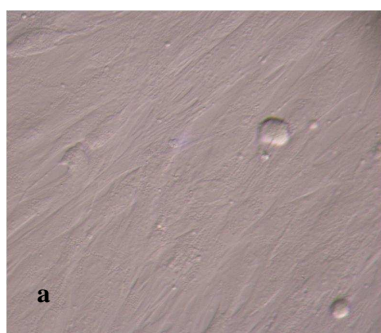
Il prelievo del cordone ombelicale è stato effettuato in tutti i casi (13/13: 100%); in media la quantità di gelatina raccolta è stata pari a  $5,0 \pm 3,7$  g (range 1,8-11 g). In 8/12 (66,7%) campioni sono state isolate colonie di cellule con classica morfologia fibroblasto simile (Fig.2.10a); data l'assenza di Wharton's Jelly, in 1 campione su 13 (7,7%) non è stato possibile l'isolamento cellulare, mentre 4/12 (33,3%) sono stati contaminati con batteri. Il tempo di duplicazione delle popolazioni è stato compreso tra 1,2 e 4 giorni e è risultato in media pari a  $2,0 \pm 0,6$  giorni per i passaggi P0-P8. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative ( $P > 0,05$ ) per quanto riguarda il tempo di duplicazione nei diversi passaggi (Fig.2.9a). Al passaggio 8 il numero di duplicazioni cellulari è stato di  $37,4 \pm 2,0$  (Fig.2.9b).

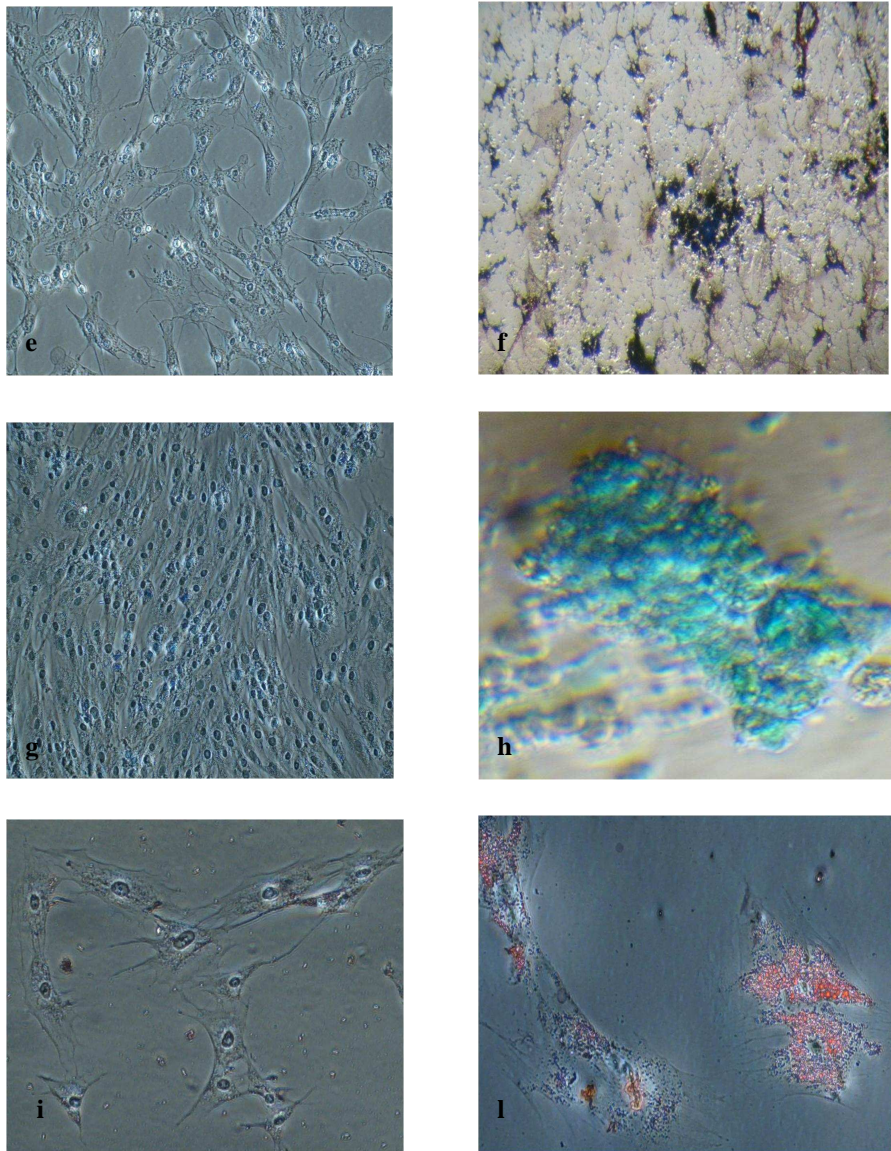


**Fig. 2.9:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dalla gelatina di Wharton di cordone ombelicale cavallo.

A tre settimane dal'inizio della coltura in medium specifico per l'induzione della differenziazione condrogenica, le cellule presentavano ingenti accumuli intra ed extra cellulari, colorati in azzurro con Alcian Blu (Fig.2.10h); le cellule coltivate in medium di coltura standard, invece, ne sono risultate pressoché prive, come evidenziato dalla debole colorazione azzurra assunta dopo trattamento con Alcian Blu, e del tutto assenti sono gli accumuli di glicosaminoglicani extracellulari (Fig.2.10g). Dopo 21 giorni di coltura in

medium da differenziazione osteogenica, la morfologia cellulare si presentava cubica e non più fibroblasto-simile (Fig.2.10b). I sali di calcio depositati nella matrice extracellulare sono stati evidenziati in nero con la colorazione di von Kossa (Fig.2.10f), e in arancione-rosso con colorazione Alizarin Red (Fig.2.10d). Le cellule coltivate in medium di coltura standard sono invece risultate negative per entrambe le colorazioni, presentando solo una minima quantità di depositi di sali di calcio ritenuti fisiologici (Fig.2.10c,e). Con colorazione Oil Red O sono invece stati colorati gli accumuli lipidici all'interno delle cellule coltivate per tre settimane in medium da differenziazione adipogenica; tali accumuli sono risultati superiori nelle cellule andate incontro a differenziazione rispetto alla coltura di controllo (Fig.2.10i,l).



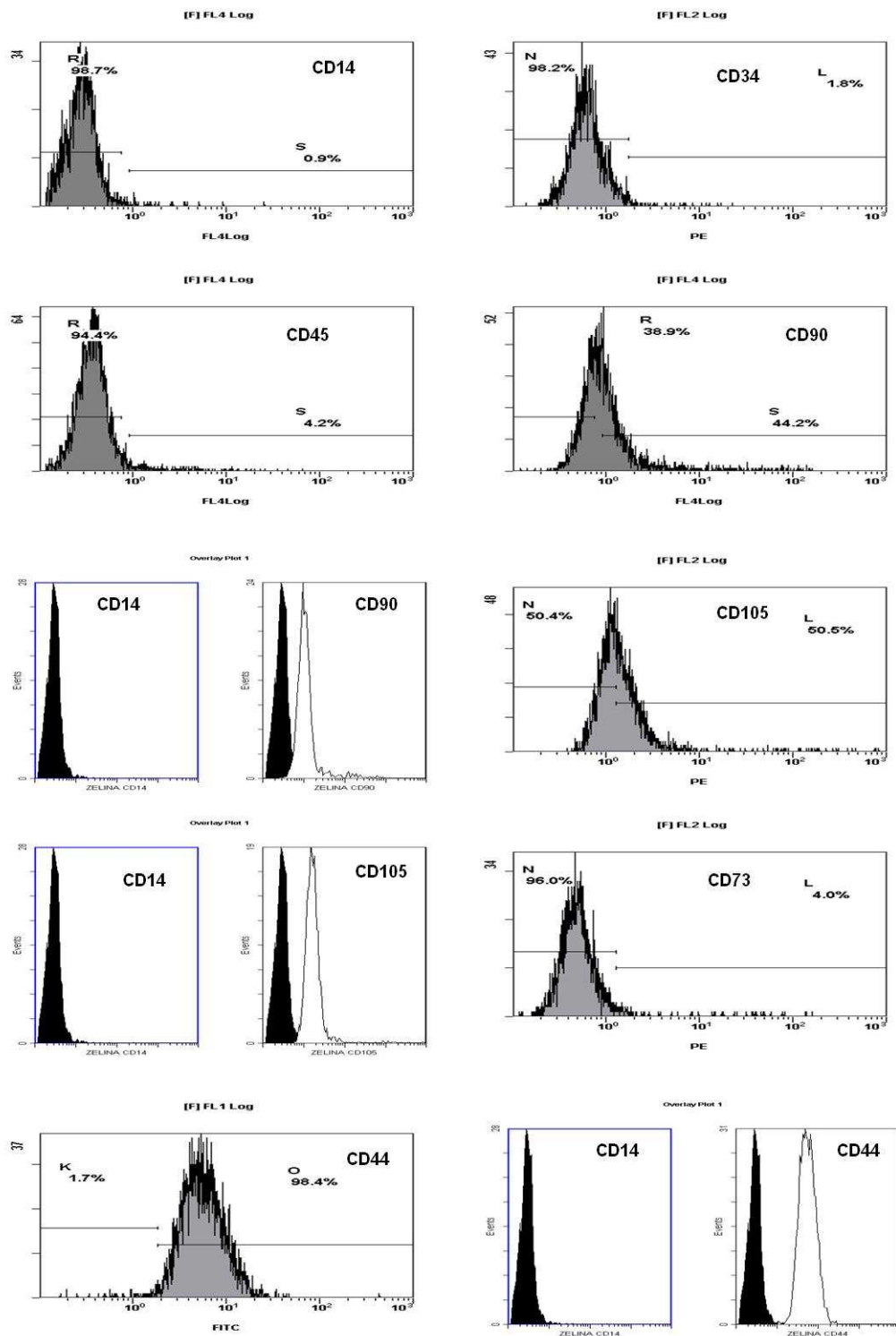


**Fig.2.10:** Differenziazione *in vitro* di MSCs isolate da gelatina di Wharton di cavallo. (a) controllo dopo tre settimane in un medium di coltura standard: morfologia cellulare fibroblasto-simile (Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U; x20); (b) induzione osteogenica dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, le cellule assumono una morfologia cubica e sono visibili i depositi di calcio (x20); (c) controllo: dopo 21 giorni in medium di coltura standard: cellule negative alla colorazione Alizarin Red (x20); (d) induzione osteogenica: dopo tre settimane in medium di differenziazione: cellule positive a colorazione Alizarin Red (x20); (e) induzione osteogenica: controllo: cellule negative alla colorazione di von Kossa (x20); (f) induzione osteogenica: cellule positive alla colorazione di von Kossa (x20); (g) controllo: dopo tre settimane in un medium di coltura standard, le cellule hanno mantenuto una morfologia classica e risultano negative alla colorazione con Alcian Blu (x20); (h) induzione condrogenica: dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, cellule positive alla colorazione con Alcian Blu (x20); (i): controllo: cellule negative alla colorazione Oil Red O (x20); (h) induzione adipogenica: dopo 21 giorni di coltura in medium da differenziazione le cellule mostrano evidenti vacuoli positivi alla colorazione Oil Red O (x20).

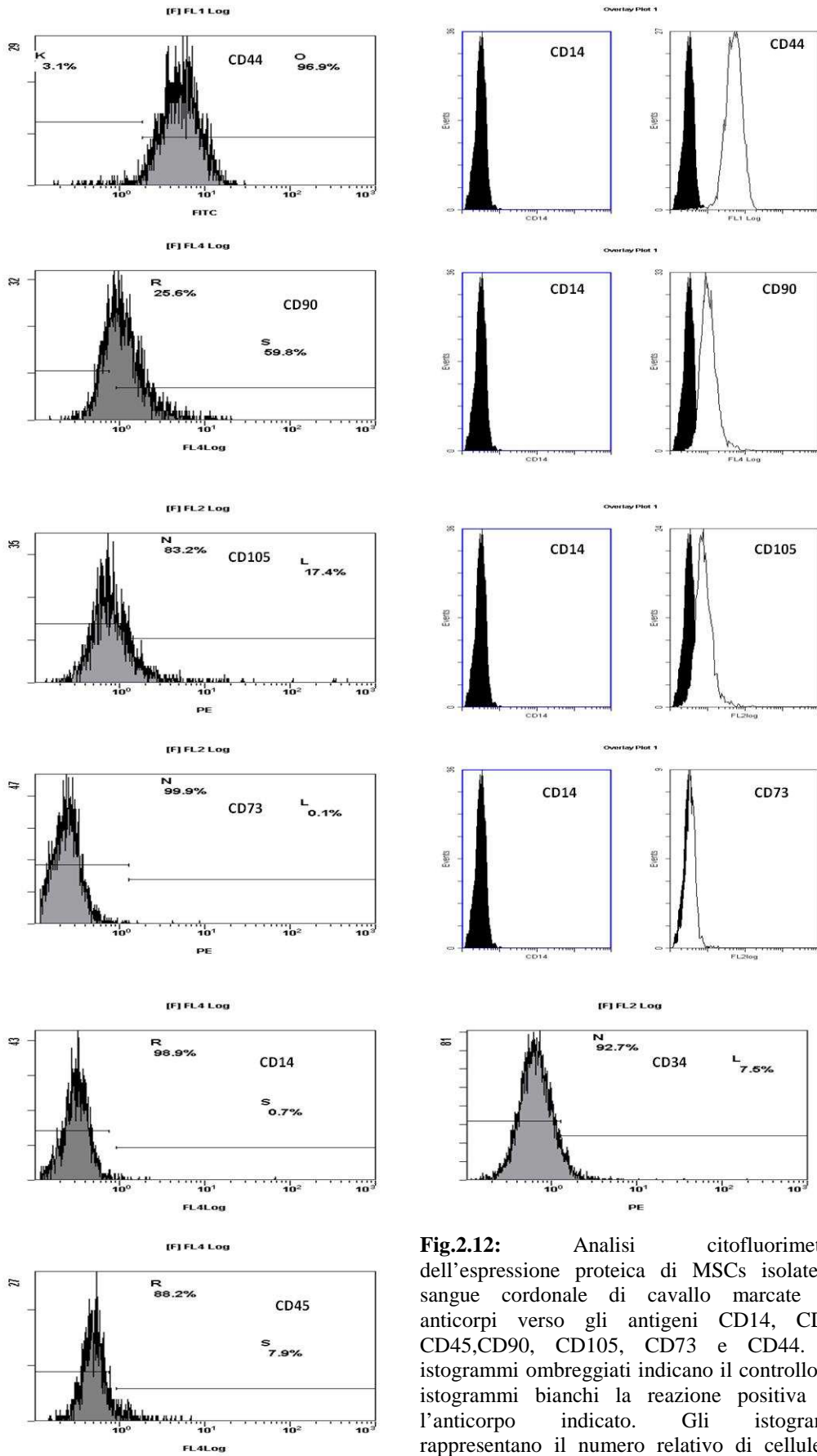
In nessuna delle linee cellulari isolate è stata evidenziata una fase di latenza al momento di inizio della coltura cellulare; in tutte le linee in fatti non si sono evidenziate differenze statisticamente significative nel numero di duplicazioni cellulari tra i diversi

passaggi ( $P>0,05$ ). Confrontando tempi di duplicazione di tutte le linee cellulari isolate, le MSCs da tessuto adiposo hanno presentato un tempo di duplicazione inferiore rispetto a tutte le altre linee ( $P<0,05$ ), ad eccezione delle cellule isolate da gelatina di Wharton ( $P>0,05$ ). Le BMMSCs hanno presentato un tempo di replicazione cellulare superiore a quello di tutte le altre linee ( $P<0,05$ ), con la sola eccezione delle cellule isolate da sangue cordonale ( $P>0,05$ ).

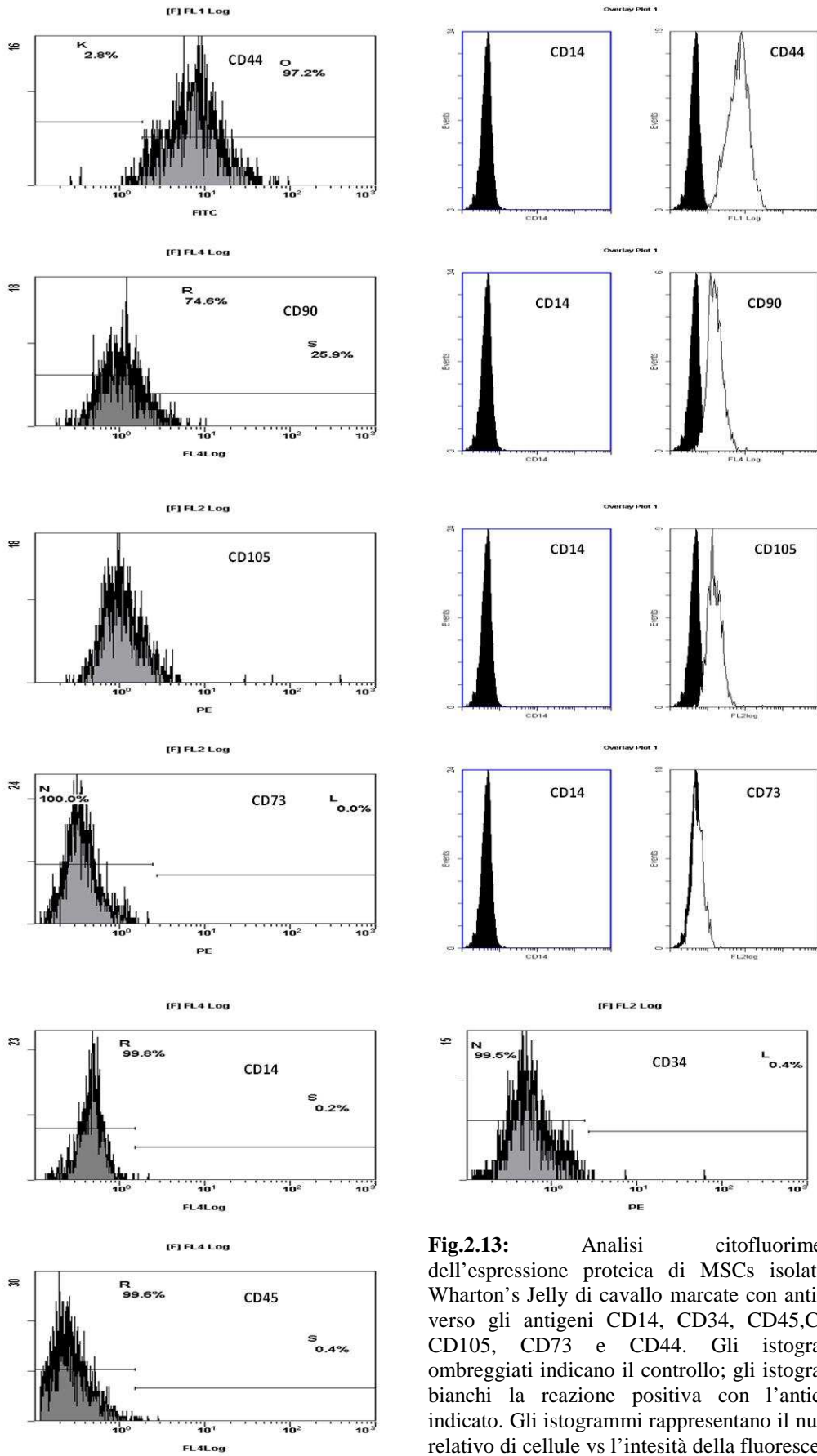
L'espressione di un numero di markers associati con cellule staminali mesenchimali è stata valutata mediante impiego di citofluorimetria sulle cellule isolate da liquido amniotico, sangue cordonale e gelatina di Wharton. Tutte le linee cellulari isolate hanno mostrato espressione di markers di staminalità mesenchimale quali CD90, CD44 e CD105, mentre sono risultate negative per markers di staminalità tipicamente emopoietici quali CD34, CD14 e CD45. È risultata negativa anche l'espressione di CD73 (Fig. 2.11; Fig.2.12; Fig2.13).



**Fig.2.11:** Analisi citofluorimetrica dell'espressione proteica di MSCs isolate da liquido amniotico di cavallo marcate con anticorpi verso gli antigeni CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 e CD44. Gli istogrammi ombreggiati indicano il controllo; gli istogrammi bianchi la reazione positiva con l'anticorpo indicato. Gli istogrammi rappresentano il numero relativo di cellule vs l'intensità della fluorescenza.



**Fig.2.12:** Analisi citofluorimetrica dell'espressione proteica di MSCs isolate da sangue cordonale di cavallo marcate con anticorpi verso gli antigeni CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 e CD44. Gli istogrammi ombreggiati indicano il controllo; gli istogrammi bianchi la reazione positiva con l'anticorpo indicato. Gli istogrammi rappresentano il numero relativo di cellule vs l'intensità della fluorescenza.



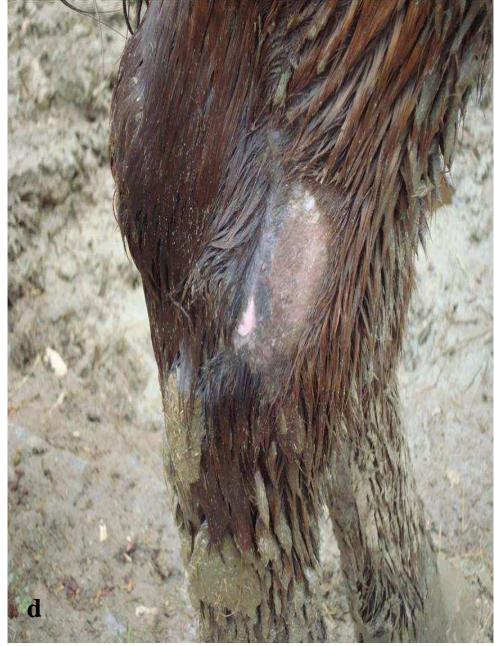
**Fig.2.13:** Analisi citofluorimetrica dell'espressione proteica di MSCs isolate da Wharton's Jelly di cavallo marcate con anticorpi verso gli antigeni CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 e CD44. Gli istogrammi ombreggiati indicano il controllo; gli istogrammi bianchi la reazione positiva con l'anticorpo indicato. Gli istogrammi rappresentano il numero relativo di cellule vs l'intensità della fluorescenza.

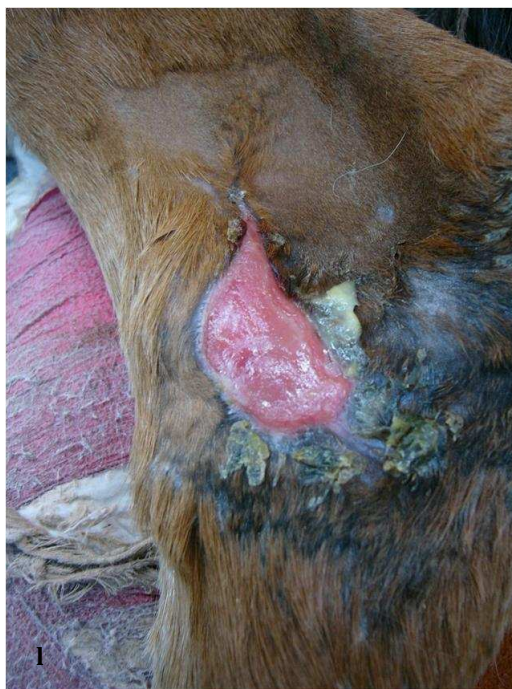


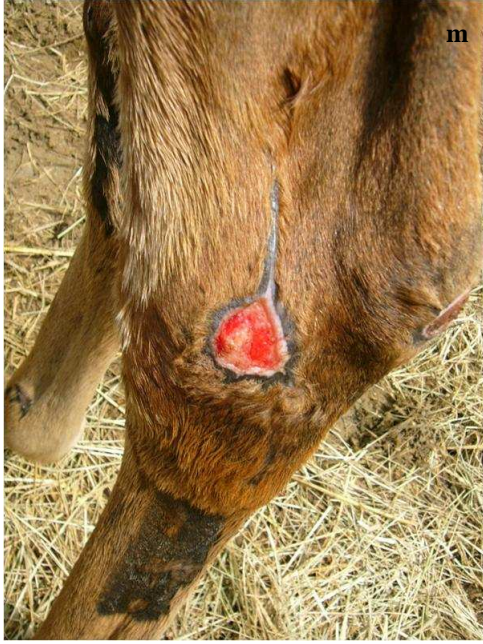
### 2.3.2 Applicazioni cliniche

Le lesioni riportate sugli arti anteriori e posteriori di un puledro Quarter Horse ospedalizzato presso l'Unità di perinatologia del Dipartimento Clinico Veterinario, sono state sottoposte a tre diversi trattamenti: Aloe, gel piastrinico, gel piastrinico+cellule staminali isolate da liquido amniotico equino. L'area di partenza della lesione a carico del garretto destro (MSCs+PRP) era di  $63,5 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14a); a un mese dall'inizio del trattamento, quindi 15 giorni dopo l'ultima applicazione, la dimensione della piaga era di  $19,3 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14b) e a due mesi era di  $2,2 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14c). La lesione a carico del carpo destro (PRP) presentava al momento dell'inizio del trattamento un'area di  $19,8 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14.e); a un mese l'area della lesione era regredita a  $7,1 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14.f) e a due mesi era pari a  $0,9 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14g). Per quanto riguarda il garretto sinistro l'area della lesione inizialmente era di  $20,8 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14i), un mese dopo era di  $6,1 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14l) e due mesi dopo era di  $3,7 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14m). Infine, l'area della piaga a carico del carpo destro in partenza era di  $46,5 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14e) per poi ridursi a  $13,0 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14o) un mese dopo l'inizio del trattamento e a  $4,6 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14p) due mesi dopo.









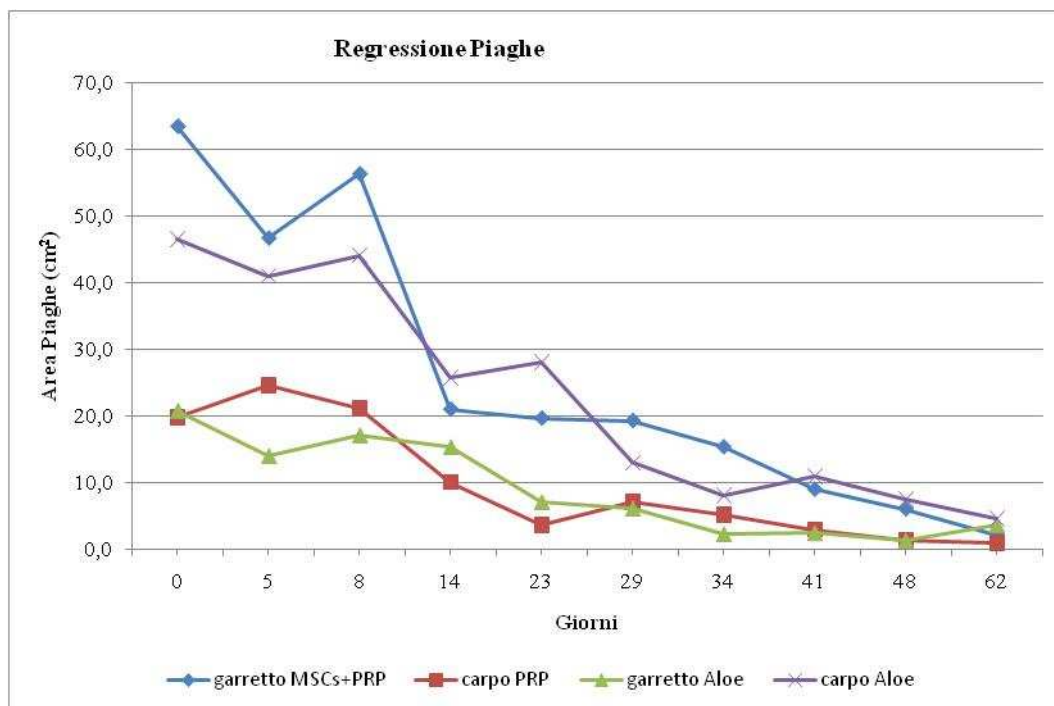


**Fig.2.14:** Regressione delle piaghe a carico di garretto destro (MSC+PRP), carpo destro (PRP), garretto sinistro (Gel di Aloe), carpo sinistro (Gel di Aloe).

La percentuale di regressione media della lesione a carico del garretto sinistro, trattato con cellule staminali+PRP è risultata statisticamente superiore rispetto a quella della lesione a carico del contro laterale garretto destro trattato con gel di Aloe (26,1% vs 20,6%:  $P<0,05$ ). I dati raccolti hanno evidenziato nella regressione di queste lesioni, differenze statisticamente significative non solo per quanto riguarda il trattamento, ma anche per quanto riguarda l'effetto del tempo e l'interazione tempo x trattamento ( $P<0,05$ ). Per quanto riguarda invece le lesioni a carico del carpo destro e sinistro, trattate rispettivamente con PRP e con gel di Aloe, non sono state evidenziate differenze significative per quanto riguarda il trattamento, essendo la percentuale di regressione media di entrambi pari a 18,1% ( $p>0,05$ ). Sono invece state riscontrate differenze statisticamente significative per quanto riguarda l'effetto del tempo e l'interazione tempo x trattamento ( $P<0,05$ ): la guarigione a carico del carpo sinistro è infatti risultata più lenta. Le stesse differenze si riscontrano anche nel confronto tra le regressioni delle aree delle piaghe trattate con gel di Aloe su carpo e garretto sinistri, mentre trattamento, tempo e tempo x trattamento della lesione a carico del garretto destro trattata con cellule staminali + PRP, sono risultati statisticamente significativi rispetto a quelli della lesione a carico del

carpo destro trattato con il solo PRP ( $P < 0,05$ ; %regresione media: 26,1% vs 18,1%).

L'andamento della regressione delle aree delle piaghe trattate è rappresentato nel Grafico 2.1.



Sette mesi dopo tutte le piaghe erano chiuse (Fig.2.14d,h,n); il garretto destro presentava una cicatrice lineare non esuberante, mentre garretto sinistro e carpo destro presentavano cicatrici a stella, leggermente esuberanti in alcuni punti. La lesione presente sul carpo sinistro era ancora aperta con un'area di circa  $0,5 \text{ cm}^2$  (Fig.2.14q).

## 2.4 Discussioni

Nel presente studio sono state isolate cellule staminali mesenchimali provenienti da sangue cordonale, gelatina di Wharton e, per la prima volta nella specie equina, da liquido amniotico. I campioni sono stati prelevati al momento del parto senza complicazioni successive né per la fattrice né per il neonato.

I primi ad isolare MSCs da sangue cordonale nell'equino furono Koch et al nel 2007, che riportarono il prelievo, con sacche trasfusionali, di un volume medio di sangue

di  $168 \pm 36,08$  ml e una percentuale di isolamento del 57%, utilizzando la separazione cellulare su gradiente di densità di Ficoll con sangue intero. Negli anni successivi, Such et al (2009) ottennero una percentuale di isolamento dell'80% con campioni di 250 ml di sangue processati su gradiente di Ficoll. La percentuale di isolamento di MSCs da sangue cordonale ottenuta nel nostro laboratorio è stata del 75% utilizzando un gradiente di densità a base di una soluzione di Percoll al 70%. Tale resa è stata nettamente superiore rispetto a quella riportata da Koch et al nel 2007 con quantità di sangue nettamente superiori rispetto a quelle a nostra disposizione: avendo effettuato i prelievi con siringhe e non con sacche trasfusionali il volume medio di sangue da noi impiegato è stato di  $35,8 \pm 15,9$  ml, contro i  $168 \pm 36,08$  ml impiegati da Koch et al (2007). Inoltre la percentuale di isolamento da noi ottenuta non si discosta da quella riportata da Such et al (2009) che hanno impiegato campioni di sangue del volume di 250 ml. Nel 2009, Koch et al ottennero invece una percentuale di isolamento del 100% impiegando volumi di sangue di 42 ml su gradiente di densità di PrepaCyte®-EQ: in quest'ultimo caso la grandezza dei campioni di sangue impiegati non si discosta da quella a nostra disposizione, mentre la resa è leggermente superiore. Data l'influenza che le condizioni di laboratorio possono avere sull'esito dei progetti, in futuro sarebbe opportuno confrontare il metodo di isolamento impiegato nel nostro studio con quello riportato da Koch et al (2009), alle medesime condizioni. Rispetto a quanto riportato in letteratura circa le percentuali di isolamento di MSCs da sangue cordonale umano (0%-63%; Gutierrez-Rodriguez et al 2000; Kern et al 2006), la resa da noi ottenuta risulta essere di gran lunga superiore, simile come valore a quella ottenuta dalla processazione di tessuto adiposo e midollo osseo (Kern et al 2006). Il tempo di duplicazione delle cellule isolate è risultato in media pari a  $2,6 \pm 1,3$  giorni per i passaggi P0-P8 e il numero di duplicazioni cellulari al passaggio 8 è stato di  $34,4 \pm 2,3$ . Koch et al in due studi successivi del 2007 e del 2009,

riportano invece tempi di duplicazione inferiori rispetto a quello da noi ottenuto, con una media di circa  $0,8 \pm 0,1$ ; la differenza potrebbe essere determinata dalle condizioni di coltura da noi utilizzate, in particolare dalla minor concentrazione di FBS impiegata pari al 10%, rispetto al 30% utilizzata dal gruppo canadese. Il siero fetale bovino è una miscela di biomolecole di elevato peso molecolare che promuovono o inibiscono la crescita e la differenziazione cellulare: fattori nutrizionali, ormoni, proteine di trasporto, fattori di adesione o estensione come proteine della matrice extracellulare, fattori stabilizzanti e detossificanti. La composizione del FBS è però in gran parte sconosciuta sia in termini qualitativi che quantitativi e varia molto anche a seconda dell'età del feto di origine. La scelta di impiegare una minor percentuale di FBS nella coltura cellulare *in vitro* è stata dettata in parte da quest'ultimo fattore, in parte dall'esigenza di ridurre al massimo i rischi di contaminazione nell'ottica di impiegare le cellule mesenchimali isolate trial clinici per la risoluzione di differenti patologie. Il siero fetale infatti potrebbe essere veicolo non solo di agenti patogeni noti, quali batteri, virus o micoplasmi ma anche di agenti infettivi sconosciuti o di difficile diagnosi quali prioni o nuovi virus. In medicina umana, Chang et al, nel 2006, dimostrarono come le MSCs isolate da sangue cordonale avessero un tempo di duplicazione dimezzato rispetto a quello delle BMMSCs; nel nostro studio invece, il tempo di duplicazione di queste due linee cellulari è risultato pressoché simile ( $2,6 \pm 1,3$  vs  $3,2 \pm 1,5$ ), mentre è risultato superiore rispetto a quello di tutte le altre linee isolate.

La gelatina di Wharton è il tessuto connettivo immaturo che avvolge i vasi del cordone ombelicale ed è composto da cellule stromali miofibroblasto-simili, fibre collagene e proteoglicani (Kobayashi et al 1998). Mentre in campo umano, la percentuale di isolamento di MSCs da gelatina di Wharton riportata in letteratura è per lo più del 100% (Troyer e Weiss 2008), nel nostro studio la resa da questo tessuto è stata del



66,7%. La digestione del cordone, nella nostra esperienza, è stata ottimale sminuzzando la gelatina in pezzetti di area  $< 1\text{cm}^2$  e immergendoli in soluzione di collagenasi allo 0.1% per almeno 1 ora. Altri Autori, pur non riportando il numero dei campioni da cui è stato possibile l'isolamento cellulare rispetto al numero di campioni trattati, utilizzando una soluzione alla stessa concentrazione di collagenasi (Passeri et al 2009) o una soluzione a base di tripsina (Cremonesi et al 2008) hanno invece lasciato il tessuto a contatto con gli enzimi digestivi per un tempo minore, come riportato nei lavori effettuati con cordone ombelicale di uomo (Jomura et al 2007). Il maggior tempo di esposizione all'enzima digestivo nel nostro protocollo potrebbe essere correlato alla diversa collagenasi utilizzata rispetto a quanto riportato dagli altri Autori. Le cellule da gelatina da noi isolate hanno mostrato un tempo di duplicazione medio pari a  $2,0\pm 0,6$ . Il tempo di duplicazione ottenuto è inferiore a quello indicato da Hoyonowsky et al (2007), pari a  $3,6\pm 0,09$ . Questa discrepanza è probabilmente imputabile alle diverse condizioni di coltura ed alla diversa selezione del tessuto cordonale da processare. Infatti, mentre nel nostro studio, è stata digerita solamente la porzione gelatinosa del cordone ombelicale, Hoyonowsky et al (2007), seguendo il protocollo indicato da Weiss et al (2006) per il cordone ombelicale umano, eseguirono la digestione enzimatica di tutto il tessuto cordonale, eliminando solo quello che costituisce i vasi e le pareti vasali (Weiss et al 2003). Gli stessi Autori, riportarono inoltre una fase di latenza nella curva di crescita delle cellule di matrice cordonale, non evidenziata dal nostro studio. Il tempo di duplicazione delle cellule mesenchimali da noi isolate da gelatina di Wharton è risultato statisticamente inferiore rispetto a quello delle cellule isolate da midollo osseo ( $3,2\pm 1,5$ ), sangue cordonale ( $2,6\pm 1,3$ ) ed anche liquido amniotico ( $2,3\pm 1$ ), mentre non sono state rilevate differenze con il valore di duplicazione cellulare delle cellule isolate da tessuto adiposo ( $1,3\pm 0,7$ ). Tali differenze sono simili a quelle riportate nello studio

delle medesime linee cellulari in medicina umana (Sarugaser et al 2005; Karahuseyinoglu et al 2007), fatta eccezione per il liquido amniotico (Tsai et al 2004). Il numero di duplicazioni cellulari al passaggio 8 è stato di  $37,4 \pm 2,0$ ; tale valore risulta essere simile a quello riportato da Passeri et al (2009), di  $36,5 \pm 3,4$  al passaggio 12 in medium di coltura  $\alpha$ -MEM (alpha modified minimum essential medium) con 20% di FBS. Gli Autori riscontrarono invece un incremento nel numero di duplicazioni fino a  $55 \pm 7$ , accompagnato da una riduzione del tempo di duplicazione cellulare, quando al medium veniva aggiunto EGF (Epidermal Growth Factor). Tale fattore si è infatti rivelato essere un buon promotore della mitosi e induttore di noduli osteogenici più voluminosi durante la differenziazione (Passeri et al 2009).

Per la prima volta in questo studio sono state isolate cellule staminali mesenchimali da liquido amniotico di equino, prelevato, senza complicazioni, al momento del parto. Anche se in passato era già stata dimostrata la presenza di tali cellule nel liquido amniotico di pecora (Kaviani et al 2001), suino (Sartore et al 2005) e uomo (Prusa et al 2003) e recentemente anche nel cane (Choi et al 2010), in questo lavoro, a differenza degli altri i campioni sono stati tutti recuperati al momento del parto, non a seguito di amniocentesi o cesareo. In tutte le specie citate le cellule sono state isolate dopo centrifugazione semplice delle aliquote di liquido amniotico e sospensione del pellet ottenuto con terreno di coltura. Anche nella specie equina così come in quella umana (Olver e Strang 1974; Mescher et al 1975), la quantità di urina presente nel liquido amniotico aumenta durante la gravidanza (Holdstock et al 1995), così come testimoniato dalla presenza di detriti composti da mucoproteine e depositi di sali minerali, specialmente fosfato di calcio (Ginther et al 1979). Per ridurre quindi la presenza di cristalli minerali, che possono ledere la membrana cellulare, i campioni di liquido amniotico dopo un primo lavaggio con PBS sono stati centrifugati su gradiente di Percoll

70%. In medicina umana questo procedimento non si rende necessario dato che i campioni vengono prelevati al momento dell'amniocentesi, quindi nel primo trimestre di gravidanza quando ancora l'urina non è presente nel liquido amniotico; non sono riportati in letteratura dati sull'isolamento di cellule staminali da campioni di liquido amniotico prelevati prima della rottura degli invogli fetali al momento del parto. Negli studi effettuati su liquido amniotico di pecora (Kaviani et al 2001), maiale (Sartore et al 2005) e cane (Choi et al 2010), nonostante i prelievi vennero eseguiti durante parto cesareo a fine gravidanza, gli Autori non riportarono la necessità di utilizzare un gradiente di densità al fine di eliminare i cristalli urinari, probabilmente perché in concentrazione inferiore rispetto a quelli presenti nella specie equina. La percentuale di isolamento delle cellule con morfologia fibroblasto simile è stata pari al 70%; il tempo di duplicazione delle cellule isolate è stato in media pari a  $2,3 \pm 1,0$  giorni per i passaggi P0-P8, statisticamente inferiore rispetto a quello delle cellule isolate sia da midollo osseo che da sangue cordonale coltivate nelle medesime condizioni ( $3,2 \pm 1,5$ ;  $2,6 \pm 1,3$ ). Il tempo di duplicazione delle MSCs isolate da liquido amniotico è invece risultato statisticamente superiore rispetto a quello delle cellule isolate da Wharton's Jelly e tessuto adiposo ( $2,0 \pm 0,6$ ;  $1,3 \pm 0,7$ ). Rispetto al tempo di duplicazione delle cellule isolate da liquido amniotico umano, pari a 20-24 ore (Tsai et al 2004), quello delle cellule da noi isolate è risultato di gran lunga superiore; questo potrebbe essere imputabile non solo alle condizioni di coltura, ma anche al momento in cui è stato effettuato il prelievo. Le cellule isolate da campioni di liquido umano infatti, essendo fatti i prelievi nel primo trimestre di gravidanza, potrebbero essere ad uno stadio più precoce rispetto a quelle isolate nel presente studio.

Indubbiamente uno dei limiti principali del lavoro effettuato è stato dato dalle contaminazioni di muffe e batteri, verificatesi a seguito dell'ambiente non sterile in cui

sono stati prelevati i campioni, quale è la scuderia, in cui, a differenza di una sala parto, o di una sala operatoria, paglia, fieno e materiale fecale costituiscono un pabulum perfetto per la proliferazione di muffe e batteri. Passeri et al (2009), riuscirono ad evitare le contaminazioni di colture cellulari da Wharoton's Jelly immergendo il campione in terreno (RPMI-1640. Invitrogen, CA, USA) addizionato con il 5% di una soluzione di penicillina/streptomicina e 2% anfotericina per 24h a 4°C. Nel nostro studio, invece il problema è stato affrontato immergendo il cordone in soluzione di alcool etilico al 70% per 10 minuti. Nel caso del sangue cordonale, la percentuale di contaminazione dei campioni è stata del 12,5%, inferiore rispetto a quella riportata da Koch et al (2007), pari al 25%. Le percentuali di contaminazioni maggiori presentate dal liquido amniotico (30%) e dal Wharton's Jelly (33,3%), potrebbero essere dovute al fatto che i prelievi sono stati eseguiti, nel primo caso, subito dopo che la membrana amniotica ha preso contatto con la zona perineale e i batteri e le muffe presenti si sono dimostrati resistenti alla quantità di penicillina/streptomicina impiegata nel liquido di lavaggio e nel terreno di coltura. Negli altri studi effettuati in ambito animale, le cellule sono state isolate da campioni prelevati in un ambiente sterile quale la sala operatoria e non in condizioni di campo, come quelle del presente studio, che si pone quindi come assoluta novità sia per scopi che per metodi per quanto concerne l'isolamento di cellule staminali mesenchimali dal liquido amniotico equino. Nel caso della matrice cordonale invece i prelievi sono stati eseguiti dopo rottura del cordone ombelicale, quando questo aveva già preso contatto con la paglia, in alcuni casi il trattamento con etanolo al 70%, effettuato dopo conservazione del campione per diverse ore, non è stato sufficiente a debellare batteri e le muffe contaminanti in tutti i casi.

In questo studio, oltre all'isolamento, è stata dimostrata anche la capacità differenziativa delle cellule provenienti da tutte e tre le fonti (liquido amniotico, sangue e

matrice cordonale) in senso condrogenico, osteogenico e adipogenico. La scelta di queste linee di differenziazione è stata fatta sia sulla base dei principi stabiliti dall'International Society for Cytotherapy, secondo cui le cellule staminali mesenchimali sono definite tali qualora, oltre a crescere in colture aderenti alle piastre, vadano incontro a differenziazione in queste tre linee cellulari (Dominici et al 2006). La differenziazione osteogenica e condrogenica sono state inoltre effettuate nell'ottica di una futura applicazione clinica delle suddette cellule. Tutte e tre le linee isolate sono andate incontro a differenziazione osteogenica, condrogenica e adipogenica, come dimostrato dalle colorazioni effettuate dopo 21 giorni di coltura in medium appositi. Mentre non sembrano esservi ingenti differenze circa la differenziazione condrogenica e osteogenica, a seguito di colorazione con Oil Red O, il sangue cordonale sembra andare incontro ad una maggiore differenziazione adipogenica rispetto a matrice cordonale e liquido amniotico, caratterizzata da un maggior accumulo di vacuoli lipidici. Le linee cellulari isolate sono inoltre state sottoposte ad caratterizzazione molecolare con alcuni markers specifici di staminalità mesenchimali. Non esistendo markers specifici per la specie equina, la prova è stata svolta con markers normalmente impiegati per la caratterizzazione di cellule umane. Le cellule sono risultate positive per CD90, CD44 e CD105, e negative per markers di staminalità tipicamente emopoietici quali CD34, CD14 e CD45. È risultata negativa anche l'espressione di CD73, che però, a differenza degli altri antigeni non ha dimostrato una cross-reazione ottimale con le cellule equine, quindi la sua negatività potrebbe non essere significativa.

La ricerca di trattamenti che facilitino la guarigione delle piaghe cutanee sta rivestendo un sempre maggior interesse anche in medicina equina, data la frequenza con cui si verificano e la loro incidenza non solo in termini clinici ma anche economici. La piaga cutanea è un fenomeno fisiologico che prende inizio con la perdita di integrità della cute

che genera una soluzione di continuo, con coinvolgimento degli strati sottostanti e dipendente da una serie di reazioni classicamente separate in quattro fasi: infiammazione, deterioramento, riparazione e maturazione (Bertone 1989; Fitch e Swaim 1995). Molti sono i fattori che influenzano la guarigione dopo lesione traumatica o chirurgica, quali età del soggetto, malnutrizione e patologie endocrine, quale può essere il diabete nell'uomo. Nel cavallo, sia adulto che puledro, le lesioni cutanee che principalmente diventano piaghe sono quelle a livello di arti anteriori e posteriori, portando a deterioramento dell'intero stato di salute dell'animale (Dyson 1997). Infatti, data la distanza esistente tra tronco e porzione distale degli arti, il circolo ematico a questo livello risulta essere molto ridotto, con conseguente basso apporto di ossigeno ai tessuti, riduzione della temperatura e mancanza di fattori di crescita (Dyson 1997). Questa condizione risulta ulteriormente amplificata nei puledri con setticemia in cui il rilascio incontrollato di mediatori endocrini, determina una precipitazione a cascata del metabolismo cellulare e alterazioni emodinamiche che culminano con il collasso di più organi e la formazione di piaghe cutanee per la mancanza di ossigeno e fattori di crescita. Questi ultimi risultano essere di fondamentale importanza per la ricostruzione tissutale, in quanto stimolano la proliferazione e differenziazione cellulare e la produzione di matrice extracellulare (Steed, 1998; Komarcevic, 2000). I trattamenti da applicare in caso di piaghe cutanee devono avere come fine quello di fornire fattori di crescita stimolanti la rigenerazione cellulare. Le piastrine costituiscono una fonte ricca di fattori di crescita fondamentali per la riparazione tissutale (Dugrillon e Kluter 2002) in quanto stimolano l'angiogenesi e promuovono proliferazione di fibroblasti che porta ad un incremento del collagene (Robson 1997; Marx 2004). Il plasma arricchito di piastrine (PRP) si è dimostrato essere un prodotto sicuro al 100%, perché prodotto con il sangue del soggetto da trattare; il gel di piastrine si ottiene mediante lisi piastrinica a seguito del contatto con gluconato di calcio e trombina. La lisi

piastrinica porta alla liberazione dei fattori di crescita, quali TGF- $\beta$  (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), tromboplastina piastrinica, fattori di coagulazione, calcio, serotonina, istamina e enzimi idrolitici (Harrison e Cramer 1996). Carter et al (2003) e De Rossi et al (2009), hanno dimostrato come l'applicazione di gel piastrinico su piaghe sperimentalmente indotte in arti di cavalla adulti determinerebbe una riduzione del tempo di guarigione e una maggior deposizione di collagene evidenziabile con l'istologia. Carter et al (2003) inoltre evidenziarono come il PRP anche in assenza di trattamento antibiotico, non determinasse la comparsa di infiammazione, che porta solitamente a cicatrice esuberante o di infezione batterica; gli Autori, infatti osservarono come utilizzando PRP su piaghe cutanee areate, i fattori di crescita e i successive eventi cellulo-mediati fossero indirizzati verso un'accelerazione della differenziazione cellulare in epidermide e una organizzazione del collagene in assenza di una prolungata reazione infiammatoria. Diversi studi sono stati fatti in medicina umana sull'applicazione di gel di aloe su piaghe cutanee, prevalentemente indotte da radioterapia. Sembrerebbe infatti che i polisaccaridi contenuti nel gel inducano un'accelerazione dei processi di riparazione cutanea anche a seguito della loro azione antiinfiammatoria, antibatterica e immunomodulatrice (Hamman 2008). Recentemente in medicina umana, l'interesse dei ricercatori si sta indirizzando verso l'impiego di cellule staminali mesenchimali nel trattamento di piaghe cutanee quali quelle da decubito o diabete (Wu et al. 2007; Lataillade et al. 2007; Vojtassák et al. 2006). Le cellule infatti produrrebbero sostanze bioattive in grado di accelerare la rigenerazione tissutale (Fu e Li 2009). In medicina equina non esistono lavori in letteratura circa l'impiego di cellule staminali mesenchimali in piaghe cutanee. Per la prima volta in questo studio sono state applicate cellule staminali mesenchimali isolate da liquido amniotico su piaghe sviluppatesi sugli arti di un puledro neonato affetto da setticemia. Il trattamento con MSCs

associate a PRP è stato confrontato con l'applicazione su altre piaghe dello stesso soggetto di solo PRP e il gel di aloe. La percentuale media di regressione è risultata superiore nella piaga a carico del garretto destro trattata con MSCs e PRP. Anche se ad eccezione della piaga trattata con MSCs e PRP sulla quale erano presenti isole epiteliali (Fig.2.15), si sono formate escare superficiali, nessuna delle piaghe trattate ha presentato segni di reazione infiammatoria. Armstrong e Ferguson (1995) e Cowin et al (1998), dimostrarono infatti come una delle caratteristiche principali delle piaghe nel puledro sia la mancanza di reazione infiammatoria; per questo motivo, come già dimostrato da McCallion e Ferguson (1995), nessuna delle piaghe trattate ha dato origine a reazioni cicatriziali esuberanti, anche se, mentre la piaga trattata con MSCs+ PRP è esitata in una cicatrice lineare, nelle altre piaghe era presente la stella cicatriziale, e addirittura a sette mesi di distanza dal primo trattamento con gel di aloe, sul carpo sinistro era ancora presente una piaga di 0,5 cm<sup>2</sup>. La mancanza di una reazione infiammatoria sulla piaga trattata con MSCs e PRP conferma quanto già ipotizzato da DeCoppi et al (2007) circa la ridotta immunogenicità delle cellule isolate da liquido amniotico e il possibile utilizzo di queste cellule per trapianti eterologhi. Inoltre, dato che anche il gel piastrinico in questo caso era eterologo, essendo stato prodotto dal sangue venoso materno, la mancanza di reazione infiammatoria porterebbe a confermare la sicurezza di questo prodotto anche per impiego eterologo.



Fig.2.15. Piaga a carico del garretto destro, trattata con cellule staminali mesenchimali e PRP. Le frecce indicano le isole di tessuto epiteliale, segno di rigenerazione tissutale.



Fino ad ora la maggior parte delle terapie cellulari nel cavallo è stata effettuata mediante impiego di cellule derivate da tessuto adiposo e midollo osseo; in un prossimo futuro, banche di cellule derivanti da LA, SC e WJ potrebbero fornire una ricca e conveniente risorsa sia per la terapia eterologa che autologa. Rimane comunque da stabilire se in tutti e tre i casi, eventuali stati patologici del feto possano determinare anomalie anche nelle cellule staminali isolate.

## **2.5 Conclusioni**

Questo studio ha permesso di sviluppare protocolli efficaci di isolamento e differenziazione, condrogenica, osteogenica ed adipogenica, di cellule staminali mesenchimali a partire da tessuti extra-embryonali, quali sangue cordonale, gelatina di Wharton e, per la prima volta nella specie equina, anche liquido amniotico. I risultati ottenuti evidenziano l'esistenza di fonti alternative di cellule multipotenti che consentono, tramite un approccio non invasivo, lo sfruttamento di materiale altrimenti considerato di scarto. Grazie alle potenzialità differenziative dimostrate *in vitro*, le cellule isolate sembrano riservare grandi promesse nel campo dell'applicazione clinica in cavalli affetti da infermità ortopediche. Anche se sono necessari studi su un maggior numero di soggetti, i risultati soddisfacenti ottenuti dopo applicazione di cellule staminali mesenchimali isolate da liquido amniotico su piaghe di un puledro affetto da setticemia, porterebbero ad ipotizzare un possibile impiego di queste cellule, eterologhe o autologhe, nel trattamento non solo delle patologie muscolo-scheletriche.

### **3. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA LIQUIDO AMNIOTICO E ALLANTOIDEO, INVOGLI FETALI ED ENDOMETRIO NEL GATTO DOMESTICO.**

#### **3.1 Materiali e metodi**

##### 3.1.1 Prelievo dei campioni e isolamento delle cellule

I campioni di liquidi fetali, membrane fetali e endometrio sono stati prelevati da uteri di 5 gatte gravide afferenti al Servizio di Riproduzione Animale, Dipartimento Clinico Veterinario, per l'esecuzione di ovarioisterectomia. Le procedure sono state effettuate in accordo con il DL 116/92, e previa approvazione del Comitato Etico dell'Università di Bologna e del Ministero della Salute. Il range di età dei feti era compreso fra 18-35 giorni di gestazione, valutato in base alle dimensioni del feto stesso.

Tutti i reagenti utilizzati sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) se non diversamente specificato. Tutte le plastiche impiegate sono state invece acquistate presso Sartstedt Inc. (Newton, NC, USA).

Dal'utero con feti di 18 giorni, non essendo ancora evidenti gli involgi e i liquidi fetali, sono stati prelevati campioni di liquido e sacco vitellino. Il liquido vitellino, aspirato con siringa sterile da 2,5 ml, è stato diluito 1:1 con PBS addizionato con antibiotici e sottoposto a centrifugazione a 700 rpm per 6 minuti. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato diluito con medium di coltura (DMEM/TCM119+10%FBS+antibiotici) e le cellule contate con emocitometro. La membrana vitellina è stata tagliata in piccoli pezzi e sottoposta a digestione con una soluzione allo 0.1% di collagenasi (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) in PBS (1ml di soluzione/1g di campione). Il campione è stato quindi

posto a bagnomaria a 37°C per 1 ora. Dopo questo periodo di tempo, la collagenasi è stata inattivata mediante aggiunta di PBS addizionato con 10% FBS; la soluzione è stata quindi, diluita 1:1 con terreno di coltura e centrifugata a 1500 rpm per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato lavato per tre volte usando il medesimo terreno mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 min. Al termine dell'ultimo lavaggio, dopo eliminazione del surnatante, il pellet di cellule è stato diluito con 1 ml di medium di coltura e le cellule sono state contate con emocitometro.

Per quanto riguarda i quattro uteri con feti di 25-35 giorni, le camere gestazionali sono state separate dall'endometrio, quindi sono stati prelevati mediante siringhe sterili da 2,5 ml il liquido allantoideo di colore giallo, e amniotico di colore trasparente; questi sono stati diluiti 1:1 con PBS supplementato con antibiotici e sottoposti a centrifugazione a 700 rpm per 6 minuti. Una volta eliminato il surnatante, i pellet sono stati diluiti con medium di coltura (DMEM/TCM119+10%FBS+antibiotici) e le cellule contate con emocitometro. Sono quindi state separate la membrana amniotica, più interna e a contatto con il feto, e l'allanto-corion, che si trova ai lati della placenta zonata. Dopo essere state tagliate in piccoli pezzi, le due membrane sono state sottoposte a digestione enzimatica con una soluzione allo 0.1% di collagenasi (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) in PBS (1ml di soluzione/1g di campione). I campioni sono stati quindi posti a bagnomaria a 37°C per 1 ora. Dopo questo periodo di tempo, la collagenasi è stata inattivata mediante aggiunta di PBS addizionato con 10% FBS; la soluzione è stata quindi, diluita 1:1 con terreno di coltura e centrifugata a 1500 rpm per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato lavato per tre volte usando il medesimo terreno mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 min. Al termine dell'ultimo lavaggio, dopo eliminazione del surnatante, il pellet di cellule è stato diluito con 1 ml di medium di coltura e le cellule sono state contate con emocitometro. Per l'isolamento delle cellule

endometriale, la superficie uterina è stata raschiata con una lama da bisturi all'interno di una piastra Petri di 100 mm di diametro, e il materiale ottenuto è stato quindi posto in una provetta da 5 ml con 1 ml di una soluzione 0.1% di collagenasi (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) in PBS. I campioni sono stati quindi posti a bagnomaria a 37°C per 1 ora. Dopo questo periodo di tempo, la collagenasi è stata inattivata mediante aggiunta di PBS addizionato con 10% FBS; la soluzione è stata quindi, diluita 1:1 con terreno di coltura e centrifugata a 1500 rpm per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato lavato per tre volte usando il medesimo terreno mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 min. Al termine dell'ultimo lavaggio, dopo eliminazione del surnatante, il pellet di cellule è stato diluito con 1 ml di medium di coltura e le cellule sono state contate con emocitometro.

### 3.1.2 Espansione cellulare *in vitro*

Per tutte e tre le linee cellulari, le cellule primarie sono state seminate in flask da 25 cm<sup>2</sup> ad una densità di  $5 \times 10^4$  cellule per cm<sup>2</sup> e incubate in atmosfera umidificata a 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura è stato cambiato per la prima volta dopo 48 ore e successivamente due volte a settimana fino ad ottenere una confluenza cellulare pari all'80%. A questo punto le cellule sono state staccate dalla flask mediante digestione enzimatica con una soluzione allo 0.05 % di tripsina; dopo un tempo massimo di 10 minuti, la tripsina è stata inattivata mediante aggiunta di 5ml di medium di coltura addizionato 10% di FBS, quindi la soluzione cellulare ottenuta è stata posta in provette da 10 ml e centrifugata per 6 minuti a 700 rpm. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato diluito con 1 ml di terreno di coltura, le cellule contate con un emocitometro e riseminate come "Passaggio 1" (P1) ad una densità di  $25 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup>. Per i passaggi successivi le cellule sono state poste in flask da 25 cm<sup>2</sup> a  $25 \times 10^3$ /cm<sup>2</sup> e lasciate

moltiplicare per 6/7 giorni fino al raggiungimento di una confluenza del 90% prima della tripsinizzazione e successivo passaggio. Il tempo di duplicazione cellulare, il numero di duplicazioni cellulari e il tempo di coltura cellulare sono stati calcolati per ogni passaggio utilizzando le due formule seguenti (Vidal et al., 2007):

$$CD = \ln (N_f / N_i) / \ln (2) \quad (1)$$

$$DT = CT / CD \quad (2)$$

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard e non è stato possibile analizzarli mediante ANOVA per l'esiguità del numero dei campioni di alcune linee cellulari.

### 3.1.3 Differenziazione *in vitro*

#### 3.1.3.1 Differenziazione condrogenica

Le cellule espanse al passaggio P3 dopo lavaggio con PBS, sono state sottoposte a tripsinizzazione e successiva centrifugazione a 700 rpm per 6 minuti. Dopo conta cellulare,  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> sono state risospese in 2 ml di medium di coltura e poste in piastre 6 well in incubatore a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub> per 24 ore al fine di ottenere l'adesione cellulare. Dopo questo periodo di tempo il medium è stato sostituito con medium da differenziazione condrogenica consistente in TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 6.25 µg/ml di insulina, 50 nM di acido ascorbico, 0.1 µM di desametasone, 10 ng/ml hTGF-β1 (PeproTech, UK) e 1% FBS (Mizuno e Hyakusoku, 2003). Le cellule sono quindi state coltivate in monostrato a 38,5°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 21 giorni e il medium da differenziazione è stato cambiato completamente due volte a settimana. Passate le tre settimane di coltura, le cellule sono state fissate in formalina al 10% per un'ora a temperatura ambiente; successivamente è

stato effettuato un lavaggio con acqua demineralizzata e le cellule sono state colorate con una soluzione in acido acetico di Alcian Blu (1% in una soluzione al 3% di acido acetico; pH 2.5) per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo questo tempo la soluzione di Alcian Blu è stata rimossa e le cellule lavate per tre volte con una soluzione di acido acetico al 3% al fine di eliminare i residui di colorante. La colorazione impiegata colora in blu i depositi di glicosaminoglicani intra ed extra cellulari caratteristici della condrogenesi.

### *3.1.3.2 Differenziazione osteogenica*

Le cellule espanse al passaggio P3 sono state lavate con PBS, sottoposte a tripsinizzazione e successiva centrifugazione. Una volta diluito il pellet ottenuto con 1 ml di medium da coltura e contate le cellule, queste sono state poste in piastre 6 well alla densità di  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in 2 ml di terreno di coltura per 24 ore al fine di ottenere l'adesione cellulare. Passato questo tempo, il terreno è stato sostituito con medium da differenziazione consistente in TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomycin, 10% di FBS, 10 mM di β-glicerofosfato, 0.1 µM di desametasone, 50 µM di acido ascorbico (Mizuno e Hyakusoku, 2003). Le cellule sono state coltivate, a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub>, in monostrato per tre settimane e il medium è stato completamente cambiato due volte a settimana.

L'avvenuta osteogenesi, caratterizzata dai depositi di calcio, è stata evidenziata dopo tre settimane di coltura utilizzando la colorazione di von Kossa e Alizarin Red. Per la colorazione di von Kossa, le cellule sono state fissate in una soluzione di formalina al 10% per un'ora a temperatura ambiente, quindi lavate con acqua bidistillata, ricoperte con una soluzione al 5% di nitrato di argento e successivamente esposte alla luce gialla per 15 minuti. I depositi di calcio fosfato si colorano di nero. Per effettuare la colorazione Alizarin Red, le cellule sono invece state fissate per un'ora a temperatura ambiente in una

soluzione di etanolo al 70%; successivamente sono state lavate con acqua bidistillata quindi ricoperte con una soluzione al 2% di Alizarin Red per 30 minuti. Dopo 4 lavaggi con acqua bidistillata, i depositi di calcio si colorano di arancione-rosso.

#### *3.1.3.2 Differenziazione adipogenica*

Al passaggio P3 di coltura, le cellule, dopo tripsinizzazione e successiva centrifugazione sono state poste in piastre 6 well ad una densità di  $5 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in 2 ml di medium di coltura per 24 ore per far sì che le cellule aderissero alla piastra. Dopo 24 ore il medium è quindi stato sostituito con terreno da differenziazione adipogenica costituito da TCM199/DMEM, 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 15% di siero di coniglio, 1 µM di desametasone, 0.5 mM di isobutil-metilxantina, 10 mM di insulina, 0.2 mM di indometacina, (Mizuno e Hyakusoku 2003; Koch et al 2007). Le cellule sono state coltivate in monostrato a 38.5°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 74 ore, il medium è stato sostituito da medium nuovo privo di isobutil-metilxantina, e successivamente le cellule sono state mantenute in coltura per 21 giorni e il terreno sostituito 2 volte a settimana (Schuh et al 2009). Dopo questo periodo di tempo le cellule sono state fissate con una soluzione al 10% di formalina per 1 ora a temperatura ambiente, quindi lavate con acqua bidistillata e successivamente con isopropanolo al 60% per 5 minuti e quindi colorate con una soluzione di Oil Red O (0.3% in isopropanolo 60%) per 5 minuti. Passato questo tempo la soluzione di colorante è stata rimossa, le cellule lavate con acqua bidistillata. I vacuoli lipidici vengono colorati in rosso.

#### 3.1.4 Caratterizzazione molecolare

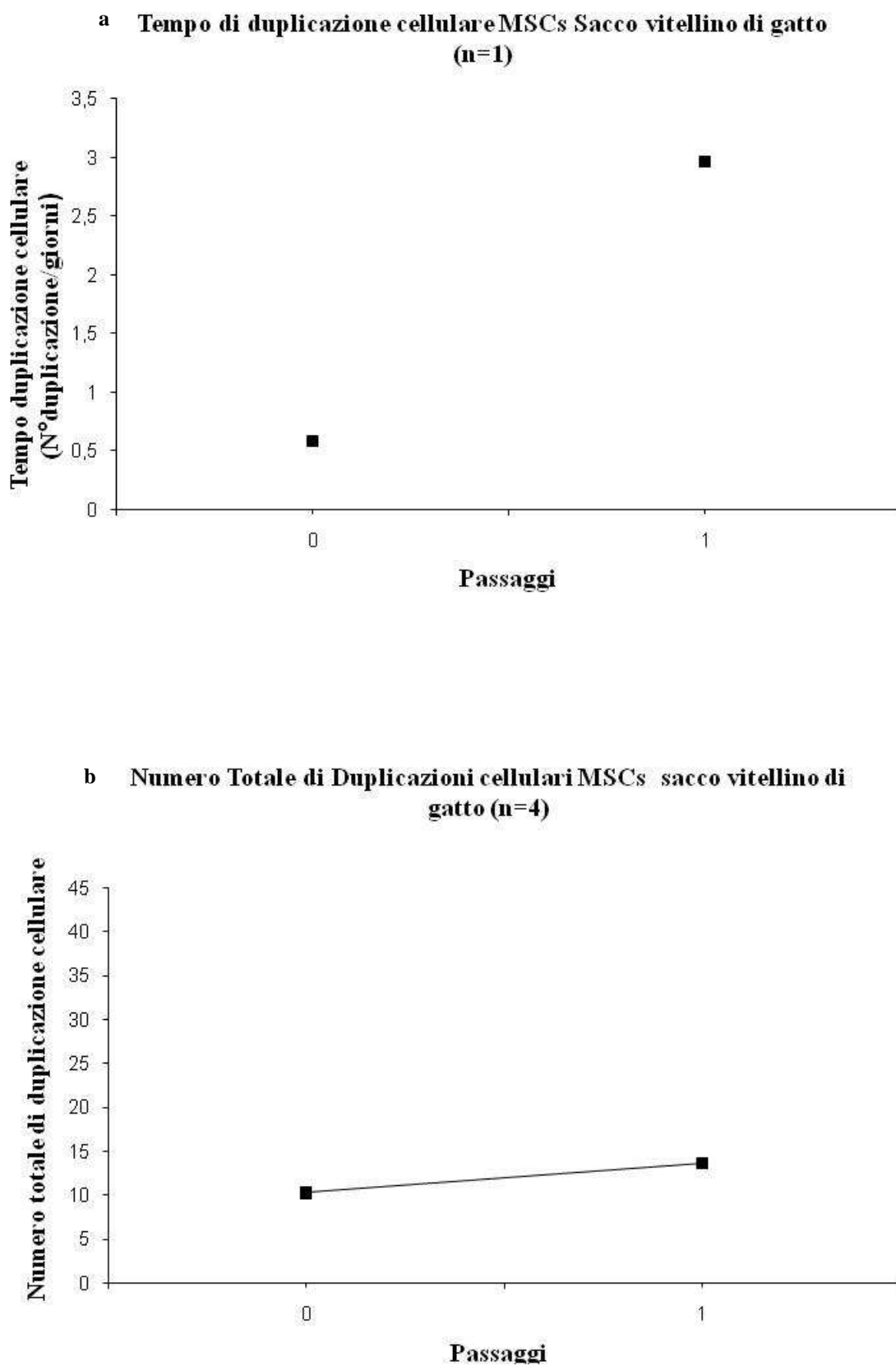
Una volta raggiunto il passaggio P3, le cellule sono state inoltre sottoposte a caratterizzazione molecolare. Per questo sono state lavate con PBS e staccate dalla

superficie cellulare mediante a tripsinizzazione per massimo 10 minuti; successivamente la tripsina è stata isolata con PBS+10% FBS, e le cellule sono state lavate mediante centrifugazione a 600 rpm per 5 minuti per due volte. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet è stato sospeso in 100  $\mu$ l di Intraprep Kit Reagent 1 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) e incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 4 ml di PBS e la soluzione è stata centrifugata a 600 rpm per 5 min. Il pellet di cellule ottenuto, risospeso in 100  $\mu$ l di PBS è stato incubato per 20 minuti a temperatura ambiente con anticorpi CD105, CD90, CD44, CD45, CD34, CD14 e CD73 direttamente coniugati con FITC, PE o APC (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Sono stati utilizzati appropriati isotopi coniugati di controllo (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Dopo colorazione, le cellule sono state lavate per due volte con PBS e l'intensità della fluorescenza è stata valutata con citofluorimetro dotato di doppio laser FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) e i risultati successivamente analizzati con programma CXP.

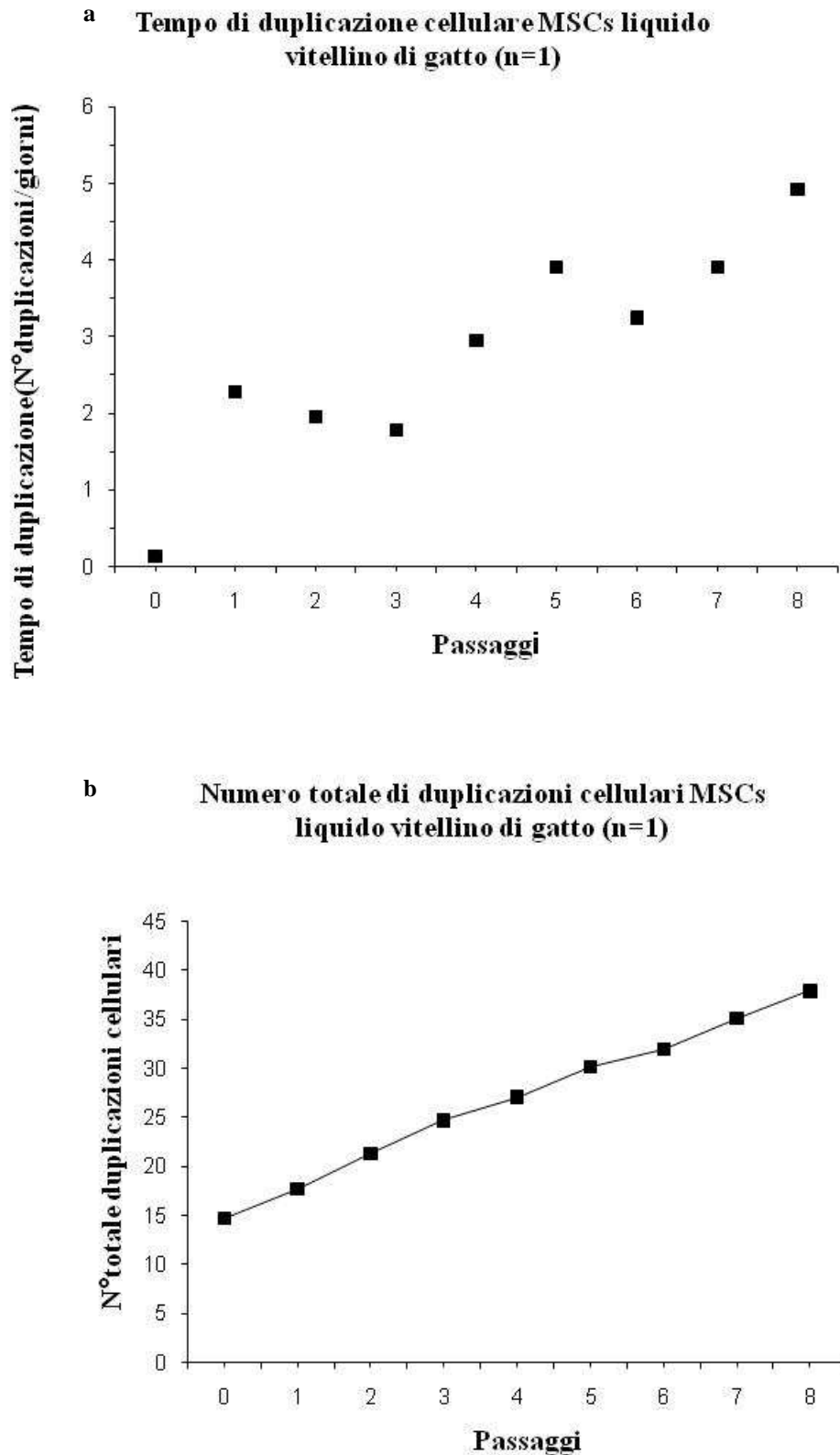
### **3.2 Risultati**

Nel presente studio da un campione di liquido vitellino di 2,5 ml e da 1,2 g di membrana vitellina di feti di 18 giorni, sono state isolate colonie di cellule con la classica morfologia fibroblasto-simile delle cellule staminali mesenchimali. A causa di una accidentale contaminazione da muffe, è stato possibile mantenere in coltura le cellule isolate dal sacco vitellino solo per 2 passaggi consecutivi; il tempo di duplicazione delle popolazioni è risultato in media pari a  $1,8 \pm 1,7$  giorni e il numero totale di duplicazioni cellulari è stato di 13,7 (Fig.3.1a, b). Per quanto riguarda invece il liquido vitellino le cellule sono state mantenute in coltura fino al passaggio 8; il tempo di duplicazione cellulare è risultato in media di  $2,8 \pm 1,4$  giorni e il numero totale di duplicazioni cellulari è stato di 37,9 (Fig.3.2a,b).



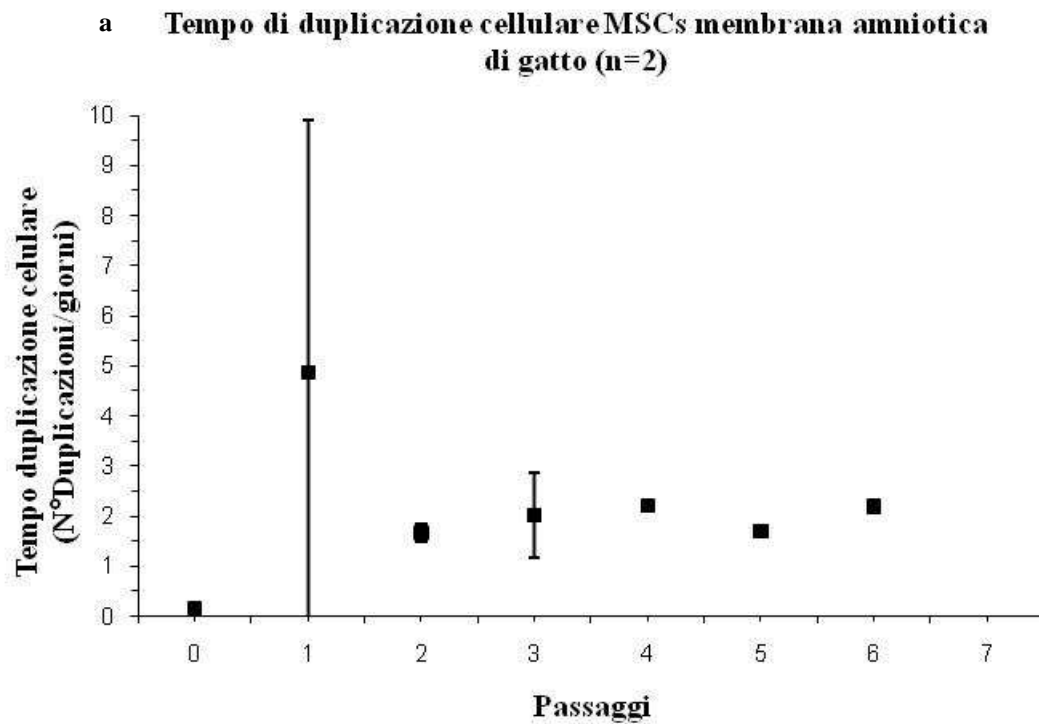


**Fig. 3.1:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dal sacco vitellino di gatto

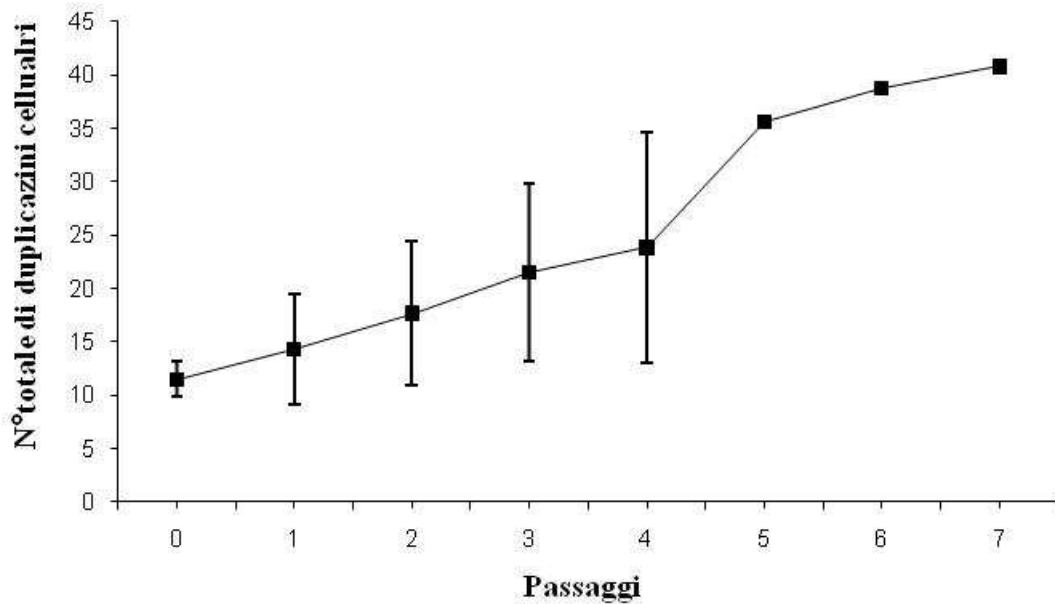


**Fig. 3.2:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dal liquido vitellino di gatto

Per quanto riguarda la membrana amniotica, i campioni in media erano di 0,73g (range 0,2-1,3); l'isolamento di cellule fibroblasto-simili è stata possibile in tutti e due i campioni utilizzati. Il tempo di duplicazione rilevato è stato pari a  $2,8 \pm 3,2$  giorni, mentre il numero di duplicazioni cellulari è stato pari a  $23,8 \pm 10,8$  nei passaggi P0-P4 (Fig.3.3a,b).



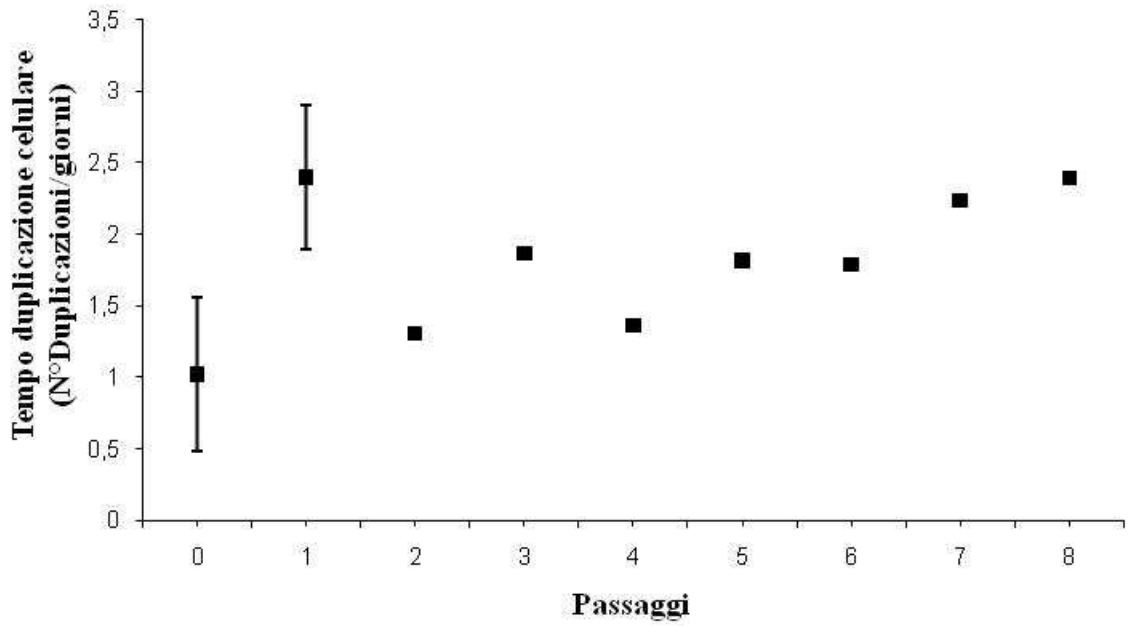
**b** Numero totale duplicazioni cellulari MSCs Membrana amniotica di gatto (n=2)



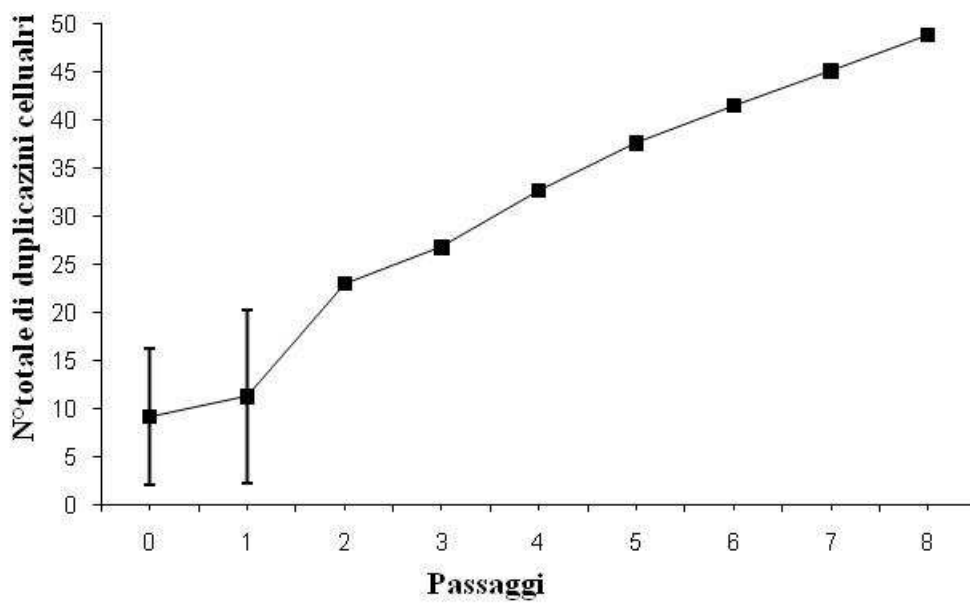
**Fig. 3.2:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dalla membrana amniotica di gatto

I grammi di membrana allantoidea a disposizione sono stati in media 2,1 (range 0,3-3,4) ed è stato possibile isolare cellule con morfologia fibro-blasto simile da tutti i campioni impiegati. Le cellule sono state caratterizzate da un tempo di duplicazione cellulare di  $2,0 \pm 1,0$  (Fig.3.3a). In 1/3 campioni le cellule dapprima adese sono andate incontro a morte prima di poter effettuare il primo passaggio, dopo l'aggiunta di antimicotico al terreno di coltura, mentre in 1/3 è stata possibile la coltura *in vitro* fino al passaggio 1 a causa di una contaminazione con muffe; solo le cellule isolate da 1/3 campioni sono state mantenute in coltura fino al passaggio 8, con un numero di duplicazioni totali di 48,9 (Fig.3.3b).

**a** Tempo di duplicazione cellulare MSCs membrana corion-allantoidea di gatto (n=3)

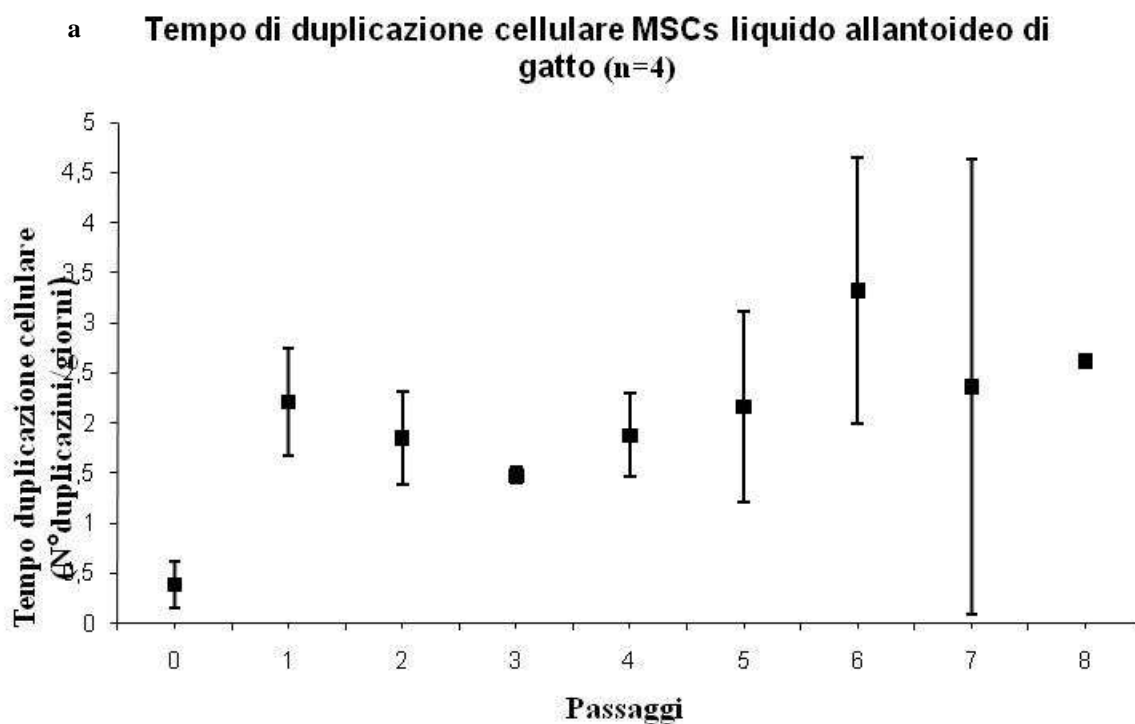


**b** Numero totale duplicazioni cellulari MSCs Membrana corion-allantoidea di gatto(n=3)

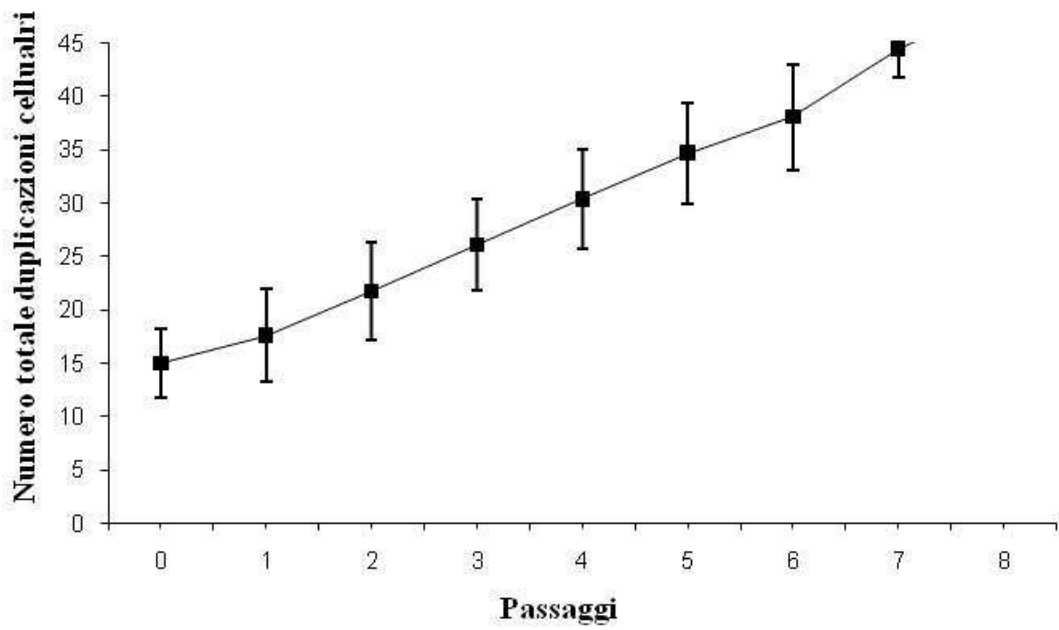


**Fig. 3.3:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dalla membrana allantoidea di gatto

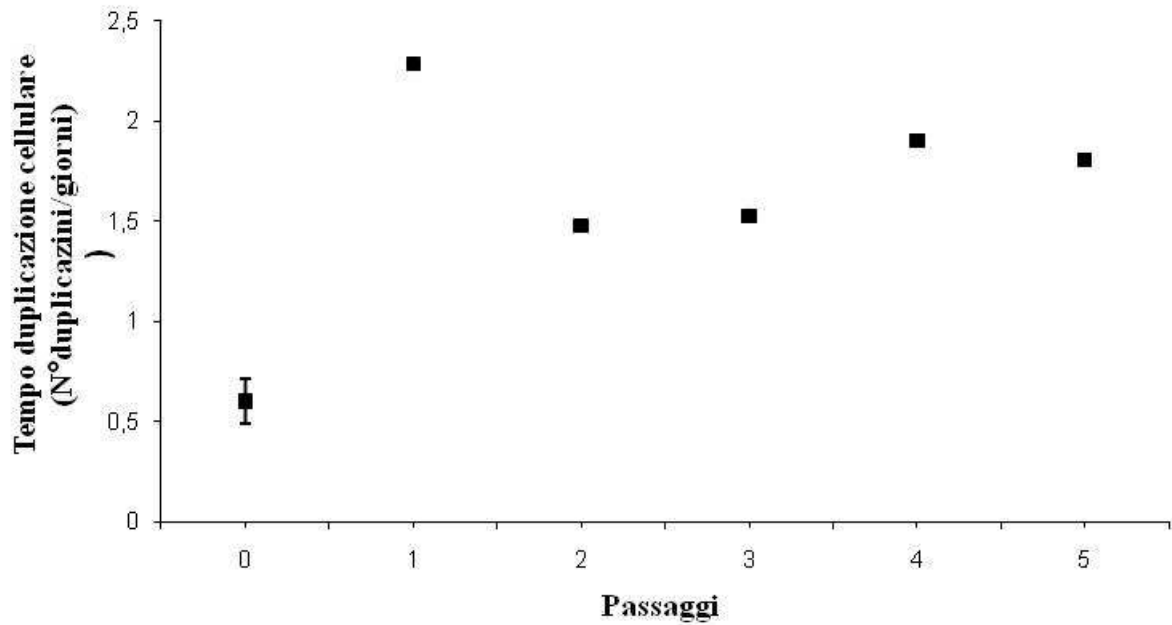
I volumi di liquido amniotico ed allantoideo utilizzati sono stati rispettivamente di 12,3 ml (range 4,5-20) e 23,1 (range 6-60); in tutti campioni è stato possibile effettuare l'isolamento di colonie di cellule fibroblasto-simili. Il tempo di duplicazione delle linee cellulari isolate è stato rispettivamente di  $1,5 \pm 0,6$  e  $1,9 \pm 1,0$  (Fig.3.4a,c). Per quanto riguarda le cellule di liquido allantoideo, al passaggio 7 il numero di passaggi cellulari è risultato di  $44,5 \pm 2,7$  (Fig.3.4b). Dei due campioni di liquido amniotico, solo uno è stato mantenuto in coltura fino al passaggio 5, mentre l'altro ha subito una contaminazione da muffe. Il numero di duplicazioni cellulari delle cellule isolate da liquido amniotico è stato pari a 31,0 (Fig.3.4d).



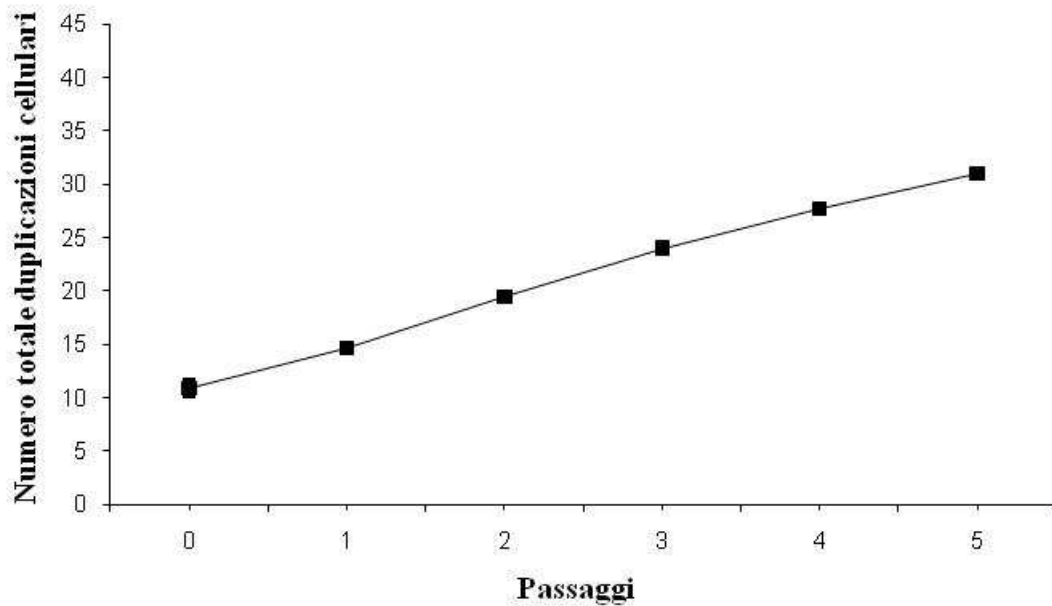
**b** Numero totale di duplicazioni cellulari MSCs liquido allantoideo di gatto (n=4)



**c** Tempo di duplicazione cellulare MSCs liquido amniotico di gatto (n=2)



**d** Numero totale di duplicazioni cellulari MSCs liquido amniotico di gatto (n=2)

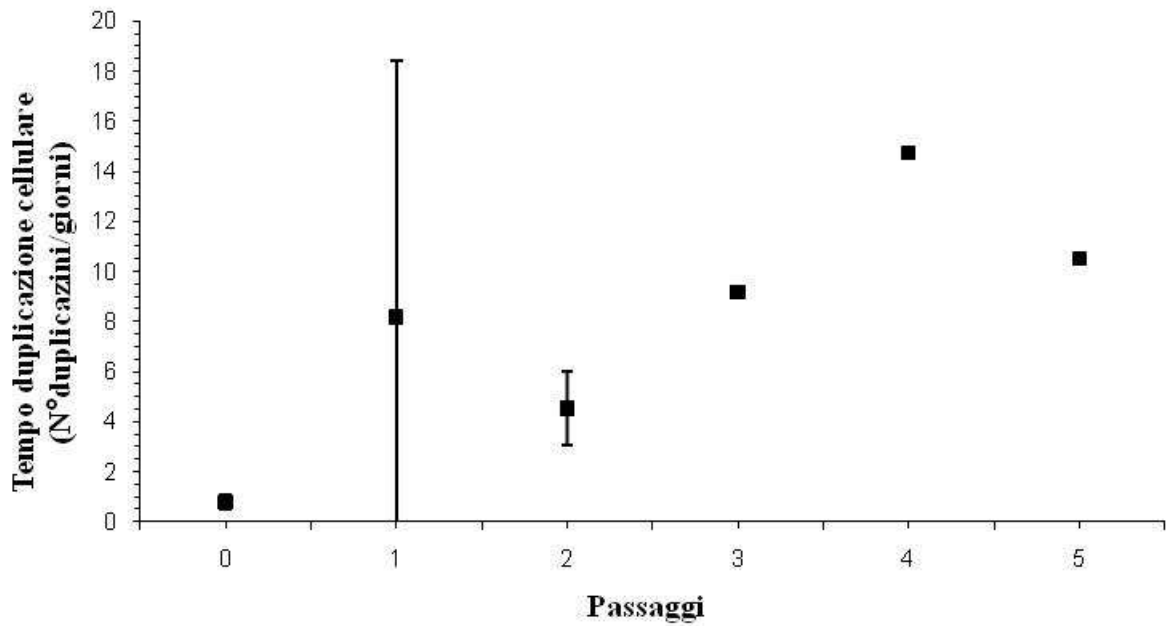


**Fig. 3.4:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule mesenchimali isolate dal liquido allantoideo e amniotico di gatto

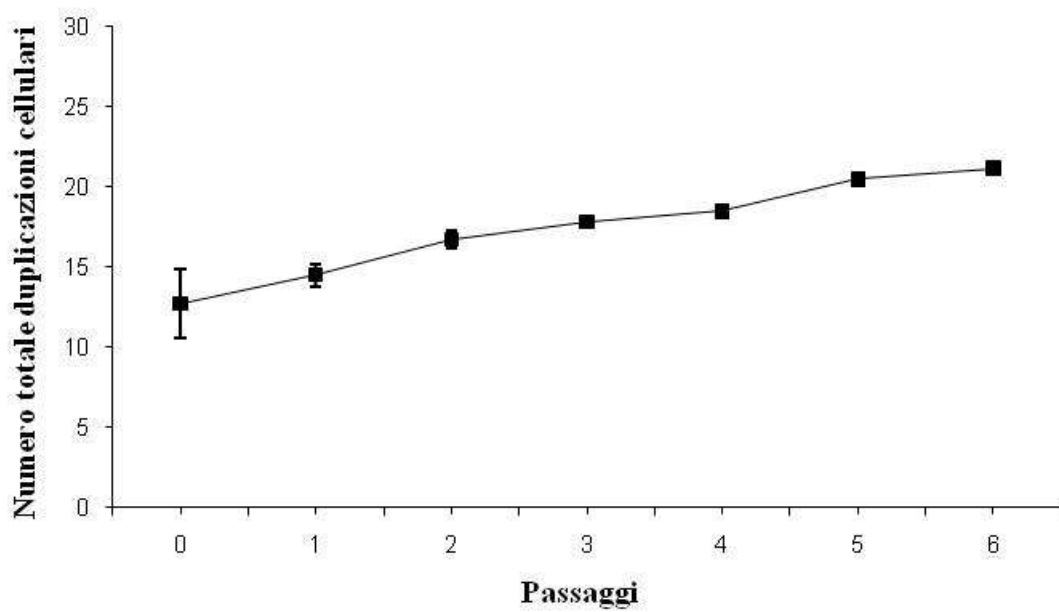
Da tutti e quattro i campioni di tessuto endometriale sono state invece isolate cellule dalla forma cubica e non allungata fibroblasto simile; è inoltre stato possibile mantenere in coltura solo 1/4 campioni, mentre negli altri le cellule al passaggio 1 e 3 non sono più state in grado di replicarsi. Il tempo di duplicazione cellulare di questa linea è stato di  $5,8 \pm 6,1$  giorni, mentre il numero di duplicazioni cellulari al passaggio 6 è risultato pari a 21,2 (Fig.3.5a,b).



**Numero totali di duplicazioni cellulari cellule endometriali di gatto (n=4)**

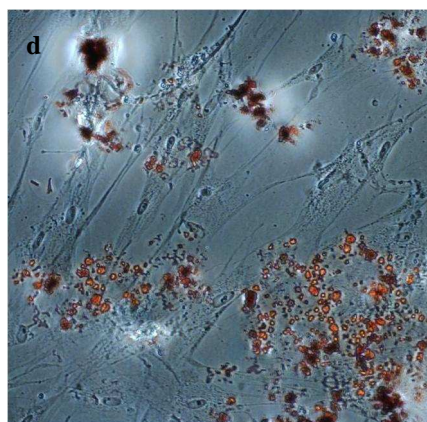
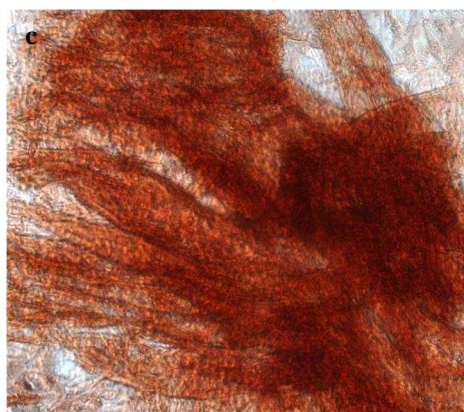
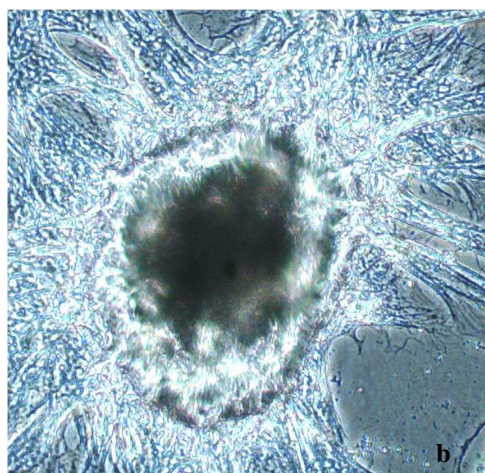
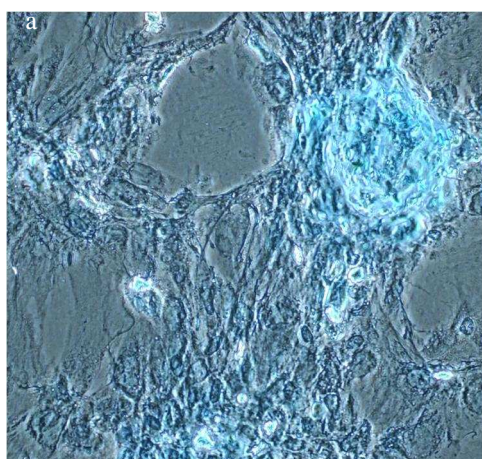


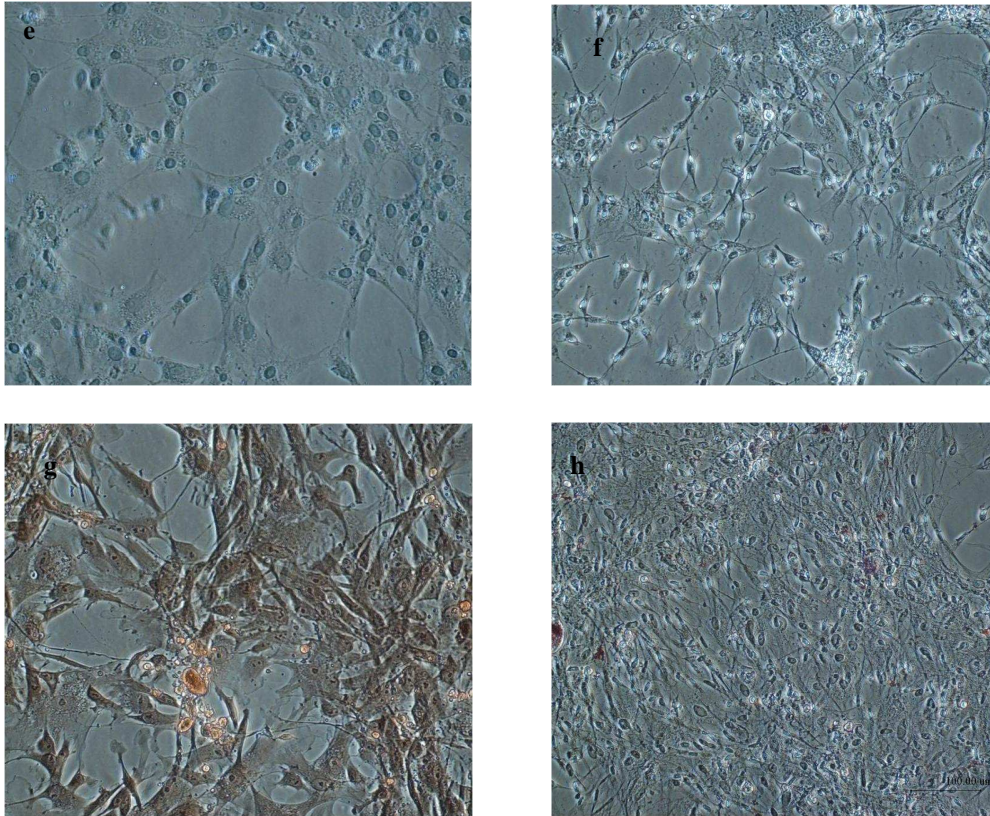
**Numero totali di duplicazioni cellulari cellule endometriali di gatto (n=4)**



**Fig. 3.5:** Caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule isolate da endometrio di gatto

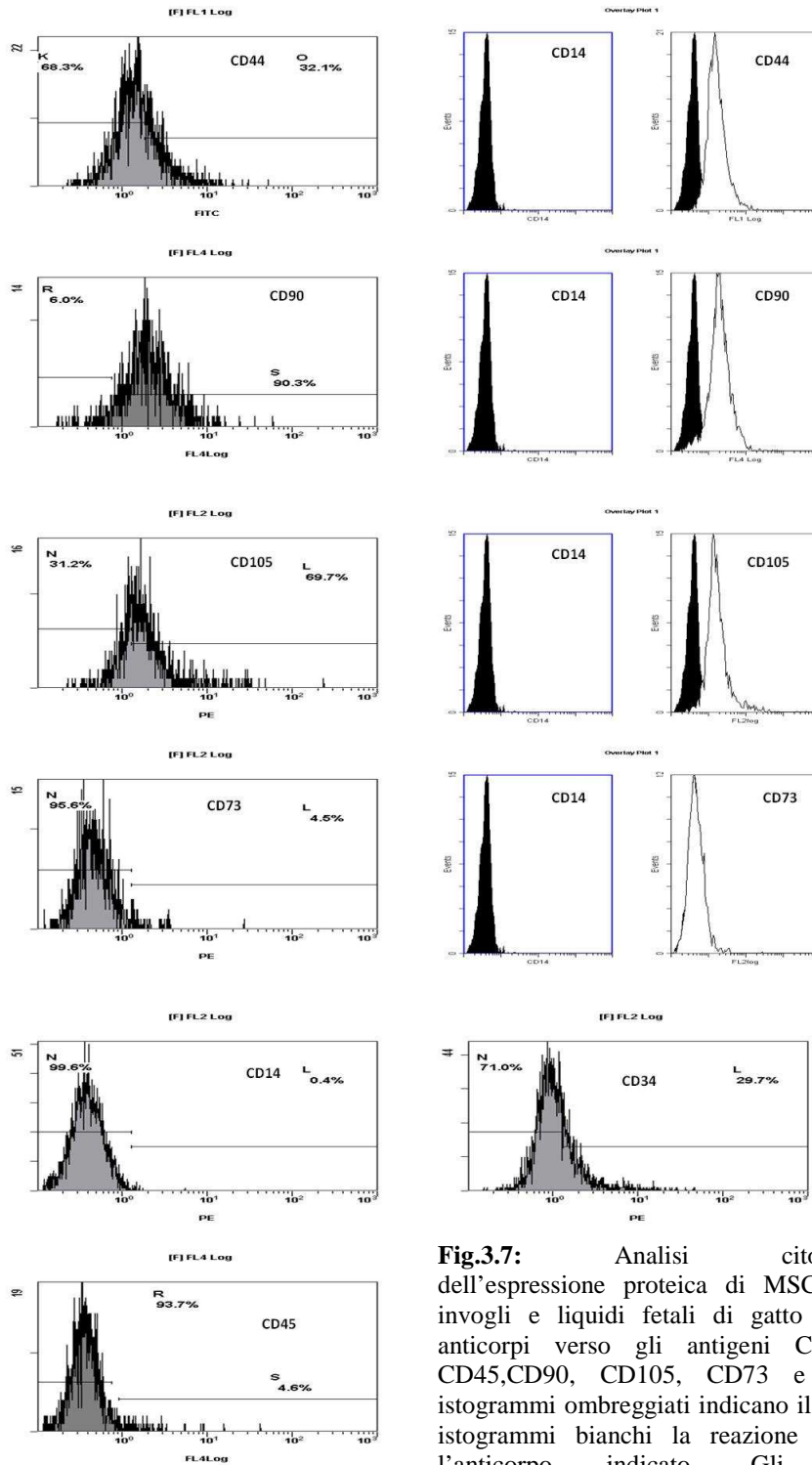
Dato l'unico caso ottenuto e la contaminazione, non è stato possibile effettuare la differenziazione e caratterizzazione delle cellule isolate da liquido e sacco vitellino. Dopo tre settimane di coltura in medium da differenziazione condrogenica, osteogenica e adipogenica, le cellule isolate da liquido amniotico e allantoideo, da membrana amniotica e allantoidea sono risultate positive per le colorazioni Alcian Blu, Von Kossa e Alizarin Red e Oil Red O (Fig.3.6a,b,c,d), a differenza delle stesse cellule coltivate in medium di coltura standard (Fig.3.6e,f,g,h). Le cellule isolate da endometrio, dopo tre settimane di coltura in medium da differenziazione, sono invece risultate negative alle colorazioni per glicosaminoglicani, sali di calcio e vacuoli lipidici, non presentando alcuna differenza rispetto a quelle coltivate in medium di coltura standard.



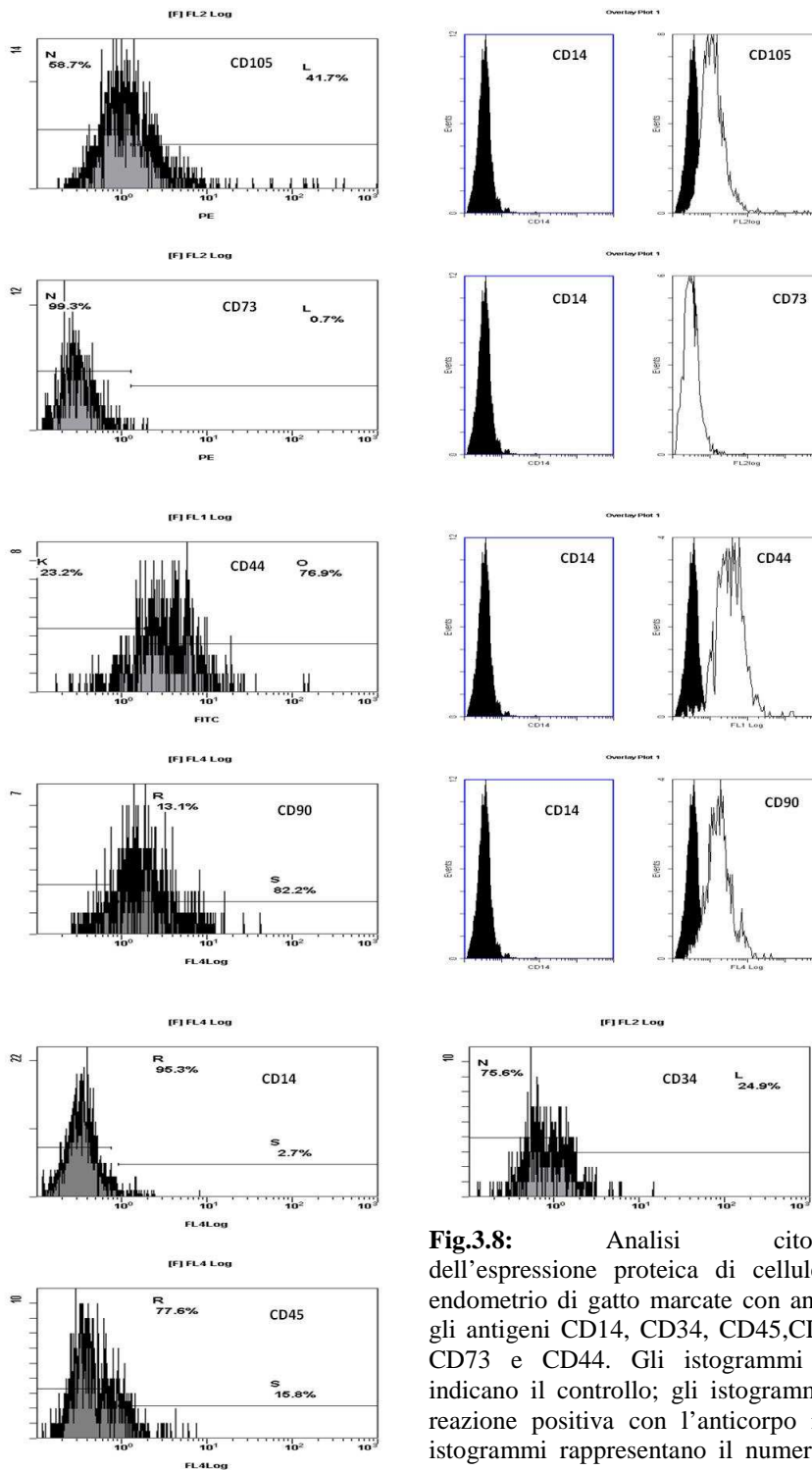


**Fig.3.6:** Differenziazione *in vitro* di MSCs isolate da liquidi e invogli fetali di gatto. (a) induzione condrogenica: dopo tre settimane di coltura in medium di differenziazione, cellule positive alla colorazione con Alcian Blu (MSCs Liquido allantoideo) (Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U; x20); (b) induzione osteogenica: cellule positive alla colorazione di von Kossa (x20) (MSCs Membrana corion-allantoidea); (c) induzione osteogenica: dopo tre settimane in medium di differenziazione: cellule positive a colorazione Alizarin Red (x20) (MSCs Membrana amniotica); (d) induzione adipogenica: dopo 21 giorni di coltura in medium da differenziazione le cellule mostrano evidenti vacuoli positivi alla colorazione Oil Red O (x20) (MSCs Liquido amniotico); (e) controllo: dopo tre settimane in un medium di coltura standard, le cellule hanno mantenuto una morfologia classica e risultano negative alla colorazione con Alcian Blu (x20) (MSCs Liquido allantoideo); (f) induzione osteogenica: controllo: cellule negative alla colorazione di von Kossa (x20) (MSCs Membrana corion-allantoidea); (g) controllo: dopo 21 giorni in medium di coltura standard: cellule negative alla colorazione Alizarin Red (x20) (MSCs Membrana amniotica); (h) controllo: cellule negative alla colorazione Oil Red O (x20) (MSCs Liquido amniotico).

L'espressione di un numero di markers associati con cellule staminali mesenchimali è stata valutata mediante impiego di citofluorimetria su tutte le linee cellulari isolate. Queste, fatta eccezione per le cellule isolate da endometrio, hanno mostrato espressione di markers di staminalità mesenchimale quali CD90, CD44 e CD105, mentre sono risultate negative per markers di staminalità tipicamente emopoietici quali CD34, CD14 e CD45 (Fig.3.7; Fig.3.8).



**Fig.3.7:** Analisi citofluorimetrica dell'espressione proteica di MSCs isolate da invogli e liquidi fetali di gatto marcate con anticorpi verso gli antigeni CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 e CD44. Gli istogrammi ombreggiati indicano il controllo; gli istogrammi bianchi la reazione positiva con l'anticorpo indicato. Gli istogrammi rappresentano il numero relativo di cellule vs l'intensità della fluorescenza.

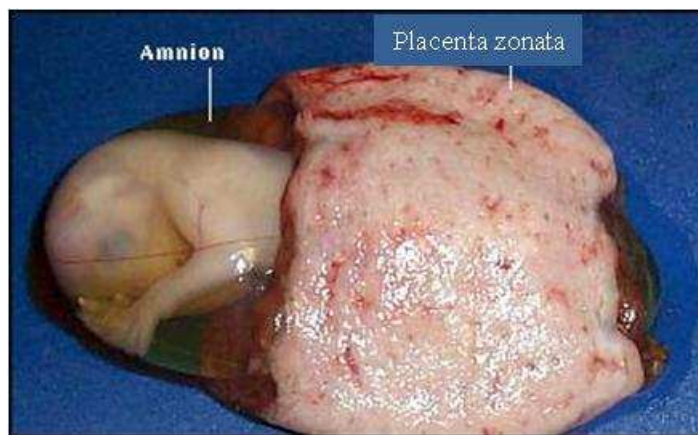


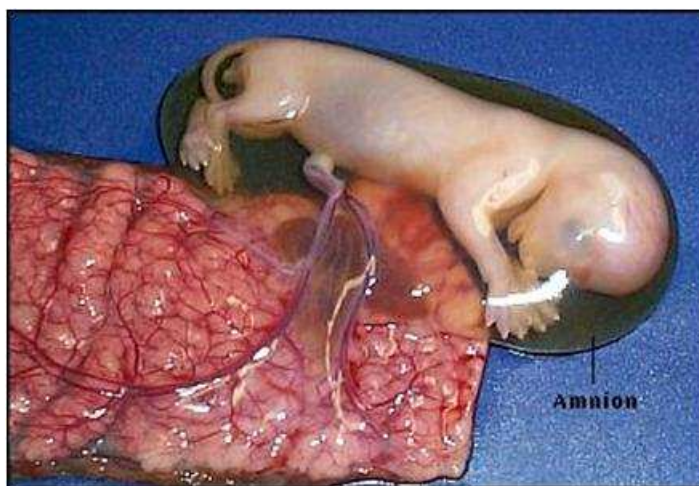
**Fig.3.8:** Analisi citofluorimetrica dell'espressione proteica di cellule isolate da endometrio di gatto marcate con anticorpi verso gli antigeni CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 e CD44. Gli istogrammi ombreggiati indicano il controllo; gli istogrammi bianchi la reazione positiva con l'anticorpo indicato. Gli istogrammi rappresentano il numero relativo di cellule vs l'intensità della fluorescenza.

### 3.3 Discussioni

Mentre nell'uomo (De Coppi et al 2007; Magatti et al 2008), ed ultimamente anche nel cane (Choi et al 2010), gli invogli e i liquidi fetali sono al centro delle più recenti

ricerche quali fonti alternative di cellule staminali, per le specie felina non ne esistono studi riportati in letteratura. In questo studio, l'allanto-corion, l'amnion, il liquido amniotico e allantoideo e l'endometrio sono stati utilizzati quali possibili fonti alternative di MSCs. Nella specie felina, così come nel cane, la placenta vera e propria, così detta zonata si estende, a mo di cintura, attorno al feto (Fig.3.9a), sull'allanto-corion che ha forma di sacco cilindrico, arrotondato alle estremità, liscio, sottile e traslucido (Fig.3.9b). L'amnion (Fig.3.9c) invece, relativamente vasto, si trova più internamente e la sua faccia esterna è separata dal corion dall'interposizione dell'allantoide.





**Fig.3.9:** Placenta e invogli fetali di gatto. (Modificato da [www.vivo.colostate.edu](http://www.vivo.colostate.edu)).

Il liquido amniotico in esso contenuto aumenta progressivamente con il progredire della gravidanza, arrivando ad essere circa un terzo del peso fetale; il liquido allantoideo invece, di colore giallastro, raggiunge il volume massimo a metà gravidanza, per poi decrescere notevolmente soprattutto nella gatta (Barone 1994). Per queste conformazioni anatomiche, una volta in laboratorio gli uteri gravidi sono stati aperti, le camere gestazionali isolate e, dopo aspirazione del liquido allantoideo, l'allanto-corion è stato accuratamente separato dalla placenta zonata ricca in vasi e sangue. Successivamente si è provveduto all'aspirazione del liquido amniotico e all'isolamento dell'amnion. Da tutti gli invogli e liquido fetali sono state isolate cellule adese dalla morfologia fibroblasto simile, simili a quelle isolate nel 2002 da Martin et al da midollo osseo e nel 2008 da Jin et al da sangue cordonale. Le cellule isolate da endometrio hanno invece presentato una differente morfologia, tendenzialmente cubica. Anche se, dato l'esiguo numero di casi non è stata possibile un'analisi statistica dei dati, queste ultime cellule presentano comunque un tempo di duplicazione cellulare apparentemente superiore rispetto alle altre linee e un numero di duplicazioni cellulari inferiore. Gli stessi Autori Martin et al (2007) e Jin et al (2008) dimostrarono poi come le cellule isolate potessero andare incontro a

differenziazione osteogenica, adipogenica e neurogenica. Nel presente studio, sono state valutate le potenzialità condrogeniche, adipogeniche e osteogeniche per stabilire la staminalità delle cellule isolate secondo i criteri proposti dall' International Society for Cytotherapy (Dominici et al 2006). Le cellule isolate dai liquidi e dagli invogli fetali sono andate incontro a differenziazione in tutte e tre le linee dopo coltura per tre settimane in media opportunamente addizionati; le cellule endometriali coltivate in medium da differenziazione non hanno invece presentato alcuna differenza rispetto a quelle coltivate in medium di coltura standard. Nel presente studio inoltre, le cellule isolate sono state sottoposte a caratterizzazione molecolare. Non avendo a nostra disposizione markers specifici per la specie felina, come quelli impiegati da Jin et al (2008), sono stati utilizzati markers di staminalità solitamente impiegati per le linee cellulari di origine umana. Tutte le linee cellulari isolate, fatta eccezione per le cellule endometriali, sono risultate positive ai markers di staminalità mesenchimale CD90, CD44 e CD105, e negative per markers di staminalità tipicamente emopoietici quali CD34, CD14 e CD45. È risultata negativa anche l'espressione di CD73, che però, a differenza degli altri antigeni non ha dimostrato una cross reazione ottimale con le cellule feline, quindi la sua negatività potrebbe non essere significativa.

### **3.4 Conclusioni**

Dai risultati ottenuti si evince quindi che, in questo studio, per la prima volta nel gatto, da invogli e liquidi fetali sono state isolate cellule staminali mesenchimali, mentre lo stesso, valutando i risultati ottenuti non si può dire circa le cellule isolate dall'endometrio, per le quali si rendono necessari ulteriori studi volti a migliorarne la tecnica di isolamento. Pur trattandosi di uno studio preliminare, possiamo affermare che i liquidi e gli invogli fetali di gatto, normalmente considerati scarti a seguito



ovarioisterectomia, possono invece essere considerati quali valide fonti alternative di cellule staminali mesenchimali. Pur essendo stata valutata in questo lavoro la potenzialità differenziativa di queste cellule *in vitro*, sono necessari studi circa la loro applicabilità *in vivo*, sia in termini differenziativi che immunitari.

## BIBLIOGRAFIA

Ackerman JL, Alden JW. Pneumopericardium following sternal bone marrow aspiration; a case report. *Radiology* 1958; 70:408–409.

Albuquerque CA, Nijland MJ, Ross MG. Human and ovine amniotic fluid composition differences: implications for fluid dynamics. *Journal of Maternal Fetal Medicine* 1999; 8: 123-129.

Alison MR, Poulosom R, Forbes S, Wright NA. An Introduction to stem cells. *J of Pathology* 2002; 197: 419-423.

Allgöwer M, Hulliger L, Basel MD. Origin of fibroblasts from mononuclear blood cells: A study on *in vitro* formation of the collagen precursor, hydroxyproline, in buffy coat cultures. *Surgery* 1960; 47: 603-610.

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 11.

Amit M, Shariki C, Msruglets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer and serum free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004; 70: 837-845.

Amaddeo D, Canonici F. Fat derived stem cells platelet gel associated in arthroscopy treatment of a subchondral bone cyst of the medial femoral condyle of a horse. *Proc It Soc Eq Vet* 2008; 14: 353-354.

Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, Van Den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone and Joint Surg. Am Vol* 2003; 85A: 1927-1935.

Armstrong JR, Ferguson MWJ. Ontogeny of the skin and the transition from scar-free to scarring phenotype during wound healing in the pouch young of a marsupial *Monodelphis domestica*. *Dev Biol* 1995; 169: 242-260.

Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2007; 68: 1095-1105.

Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of non-cultured immunologically isolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1728-37.

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Huges C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003; 98: 1235-1249.

Bailey MM, Wang L, Bode CJ, Mitchell KE, Detamore MS. A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage. *Tissue Eng* 2007; 13: 2003-2010.

Bajada S, Mazakava I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng and Regen Med* 2008; 2: 169-183.

Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007; 25: 1384-1392.

Bankowski E, Sobolewski K, Palka J, Jaworski S. Decreased expression of the insulin-like growth factor-I-binding protein-1 (IGFBP-1) phosphoisoform in pre-eclamptic Wharton's jelly and its role in the regulation of collagen biosynthesis. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 175-181.

Bankowski E, Sobolewski K, Romanowicz L, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 66: 109-117.

Barone R. *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*. Edagricole, Bologna, Italia. 1994; Vol 4: 490.

Baschat AA, Hecher K. Fetal growth restriction due to placental disease. *Semin Perinatol* 2004; 28: 67-80.

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuomo I. Study of telomere length rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. *Stem Cells* 2004; 22: 675-682.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.

Berg LC, Koch TG, Heerkens T, Besonov K, Thomsen PD, Betts DH. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 22: 363-370.

Bertone AL. Management of exuberant granulation tissue. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1989; 5: 551-562.

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214-2219.

Bieback K, Kern S, Kluter H et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-634.

Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 1999; 116: 7-14.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adeptly by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999; 283: 534-537.

Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman R. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther* 2007; 8: 272-284.

Black LL, Gaynor J, Adams C, Dhupa S, Sams AE, Taylor R, Harman S, Gingerich DA, Harman R. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet Ther* 2008; 9: 192-200.

Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972; 43: 404-409.

Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 2000; 18 933-944.

Bosnakovskia D, Mizunob M, Kima G, Ishiguroa T, Okumuraa M, Iwanagac T, Kadosawaa T, Fujinagaa T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Experimental Hematology* 2004; 32: 502-509.

Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Delilieri GL, Rebullia P, Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* 2006; 16: 329-336.

Brace RA & Resnik R. Dynamics and disorders of amniotic fluid. In Creasy RK & Renik R (eds.) *Maternal-Fetal Medicine*. Philadelphia: Saunders 1999; 623-643.

Breymann C, Schmidt D, Hoerstrup SP. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 87-92.

Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 566-574.

Brook FA e Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Nat Ac Sci USA* 1997; 94: 5709-5712.

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828-3832.

Bruch JF, Sibony O, Benali K, Challier JC, Blot P, Nessmann C. Computerized microscope morphometry of umbilical vessels from pregnancies with intrauterine growth retardation and abnormal umbilical artery Doppler. *Hum Pathol* 1997; 28: 1139-1145.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997;64: 278-294.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396-402.

Can A, Karahuseyinoglu S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2007; 25: 2886-2895.

Caplan A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009; 217: 318-324.

Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4: 8.

Carstanjen B, Desbois C, Hekmati M, Behr L. Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. *Canadian J Vet Res* 2006; 70: 143-147.

Carter CA, Jolly DG, Worden CE, Hendren DG, Kane CJM. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 244-255

Casey ML, MacDonald PC. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: A property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod* 1996; 55: 1253-1260.

Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, Casteilla L, Pénicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 2005; 579: 3487-3492.

Casteilla L, Planat-Benard V, Cousin B, Silvestre JS, Laharrague P, Charrière G, Carrière A, Pénicaud L. Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005; 98: 922-926.

Cedar SH, Cooke JA, Patel MR, Luo Z, Minger SL. The therapeutic potential of human embryonic stem cells. *Indian J Med Res* 2007; 125: 17-24.

Chang YJ, Tseng CP, Hsu LF, Hwang SM. Characterization of two population of mesenchymal progenitors cells in umbilical cord blood. *Cell Biol Int* 2006; 30: 495-499.

Chang YJ, Shih DTB, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC. Disparate Mesenchyme-Lineage Tendencies in Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Umbilical Cord Blood. *Stem Cells* 2006; 24: 679-685.

Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem and Cell Biol* 2008; 40: 815-820.

Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, Callegari A, Gasparotto L, Taiani J, Piccoli M, Lenzini E, Gerosa G, Vendramin I, Cozzi E, Angelini A, Iop L, Zanon GF, Atala A, De

Coppi P, Sartore S. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42: 746-759.

Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, Harris IR, Popma SH, Sachs DH, Huang CA.. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood* 2007; 111: 430-438.

Choi SA, Lee JH, Kim KJ, Kim EY, Li XX, Lashgari A, Kim MK. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells derived from canine amniotic fluid. *Reprod Fert and Dev* 2010; 22: 346-347 (abstract).

Chunmeng S, Tianmin C. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplant Proc* 2004; 36: 1578-81.

Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari M, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor *Vet Res Commun* 2009; 33:811-821.

Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, Bo P, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. CD105 cells from Wharton's jelly show *in vitro* and *in vivo* myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med* 2006; 18: 1089-1096.

Conley BG, Young JC, Trounson AO, Mollard R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:555-567.

Conrad C, Gottgens B, Kinston S, Ellwart J, Huss R. GATA transcription in a small rhodamine 123(low)CD34 subpopulation of a peripheral blood-derived CD34(-)CD105 mesenchymal cell line. *Exp Hematol* 2002; 30: 887-895.



Corre J, Barreau C, Cousin B, Chavoin JP, Caton D, Fournial G, Penicaud L, Casteilla L, Laharrague P. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol* 2006; 208: 282-288.

Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *New Engl J Med* 2004; 350: 1353-1356.

Cowin AJ, Brosnan MP, Holmes TM, Ferguson MWJ. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev Dynamics* 1998; 212: 385-393.

Cremonesi F, Violini S, Lange Consiglio A, Ramelli P, Ranzenigo G, Mariani P. Isolation, *in vitro* culture and characterization of foal umbilical cord stem cells at birth. *Vet Res Commun* 2008; 32 Suppl 1: S139-142.

Csaki C, Matis U, Mobasher A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol* 2007; 128: 507-520.

Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res* 2002; 20: 910-919.

Dahlgren LA. Review of Treatment Options for Equine Tendon and Ligament Injuries: What's New and How Do They Work? *Proc of Am Assoc Eq Pract* 2005; 51

Dahlgren LA, Nixon AJ. Use of fat-derived stem cells in tendon and ligament injuries. *Trans 2006 ACVS Symposium* October 2006.

Dai W, Kloner RA. Myocardial regeneration by human amniotic fluid stem cells: Challenges to be overcome. *J Mol and Cell Cardiol* 2007; 42: 730-732.

da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C. and Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119: 2204-2213.

Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006; 20: 161-171.

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; 160: 909-918.

De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 100-106.

Delo DM, De Coppi P, Bartsch G Jr, Atala A. Amniotic Fluid and Placental Stem Cells. *Methods in Enzymology* 2006; 419: 426-437.

de Mattos Carvalho A, Garcia Alves AL, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, Gomes de Oliveira PG, Deffune E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue *Vet Immun and Immunopath* 2009; 132: 303-306.

DeRossi R, Anciliero de Oliveira Coelho AC, de Mello GS, Oliveira Frazílio F, Brito Leal CR, Gonçalves Facco G, Bonucielli Brum K Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir Bras* 2009; 24: 276-281.

Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC, Balian G. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *J Orthop Res* 2002; 20: 1232-1239.

Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Rydén M.. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005; 308: 283-290.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay

identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107: 275-281.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM.. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.

Downs KM, Harmann C. Developmental potency of the murine allantois. *Development* 1997; 124: 2769-2780.

Downs KM, Hellman ER, McHugh J, Barrickman K, Inman KE. Investigation into a role for the primitive streak in development of the murine allantois. *Development* 2004; 131: 37-55.

Durando M, Zarucco L, Schaer T. Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet Educ* 2006; 18: 75-78.

Dugrillon A, Kluter H. Current use of platelet concentrates for topical application in tissue repair. *Ther Transfus Med* 2002; 29: 67-70

Dyson S. Treatment of superficial digital flexor tendonitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate. *Proceedings. 43rd Ann Am Ass Eq Pract Conv* 1997; 297-300.

Dyson M. Advances in wound healing physiology: the comparative perspective. *Vet Dermatol* 1997; 8: 227-233.

Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992–2000). *Eq Vet J* 2004; 36: 415-419.

Eiges R, Schuldiner M, Drukker M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Establishment of human embryonic stem cell-transduced clones carrying a marker of undifferentiated cells. *Curr. Biol.* 2001; 11: 514-518.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242.

Eyden BP, Ponting J, Davies H, Bartley C, Torgersen E. Defining the myofibroblast: Normal tissues, with special reference to the stromal cells of Wharton's jelly in human umbilical cord. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1994; 26: 347-355.

Fang B, Song YP, Liao LM, Han Q, Zhao RC.. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 389-390.

Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavillo F. Muscle re generation by bone-marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.

Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, Schneider RK, Zubrod CJ, Watkins JJ, Kawcak CE, Goodrich LR. Clinical follow-up of horses treated with bone marrow derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal lesions. *Proc Am Ass equine Practnrs* 2009; 55: 59-60.

Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell J. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 265-271.

Fitch RB, Swaim SF. The role of epithelization in wound healing. *Comp Cont Edu Pract Vet* 1995; 17: 167-177.

Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005; 34: 415-423.

Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, Cable CS. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 1998; 59: 1182-1187.

Fortier LA, Smith RKW. Evidence for Stem Cells in Cartilage Regeneration. *Proc of Am Assoc Eq Pract* 2007; 53: 329-344.

Fortier LA, Smith RKW. Regenerative Medicine for Tendinous and Ligamentous Injuries of Sport Horses. *Vet Clin Equine* 2008; 24: 191-201.

Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24: 1020-1029.

Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Haematol Blood Transfus* 1980; 25: 19-29.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393- 403.

Friedenstein AJP e Petrokova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-390.

Frisbie DD, McIlwraith CW. Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 379 (Suppl): 273-287.

Fu X e Li H. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. *Cell Tissue Res* 2009; 335: 317-321

Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH, Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to

dopaminergic neurons *in vitro*: Potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* 2006; 24: 115-124.

Fuchs JR, Hannouche D, Terada S, Zand S, Vacanti JP, Fauza DO. Cartilage Engineering from Ovine Umbilical Cord Blood Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells* 2005; 23: 958-964.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169: 12-20.

Gaughan EM. Managing tendonitis in the horse. *Vet Med* 1994; 89: 789-794.

Gehron Robey P. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest* 2000; 105: 1489-1491.

Genovese RL. Prognosis of superficial digital flexor tendon and suspensory ligament injuries. *Proc. 39th Ann Am Ass Eq Pract Conv* 1993; 17-19.

Genovese RL, Reef VB, Longo KL. Superficial digital flexor tendonitis: long term sonographic and clinical study of racehorses. *Proc 1st Dubai Int Eq Symp* 1996; 187-205.

Gianaroli L, Carai P, Stanghellini I, Ferraretti AP, Magli MC. Le cellule staminali: dalla ricerca all'applicazione clinica. *Repronews, Organo Ufficiale della Società Italiana di Riproduzione*, 2009; 11.2 (Online).

Gimble JM, Robinson CE, Wu X et al. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 1996; 19: 421-428.

Ginther OJ. Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects. Cross Plains, WI: Equi Services, 1979.

Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nasic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 2008; 76: 118-129.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with

Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *New Engl J Med* 1989; 321: 1174-1178.

Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *New Engl J Med* 1997; 337: 373-381.

Goodship AE, Birch HL, Wilson AM. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *Vet Clin North Am* 1994; 10: 323-349.

Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 581-588.

Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Brit Med Bull* 1983; 39: 348-354.

Grahaman A. Bio-tech deal that's not horse play. In "Stateline Queenslan" 2003.

Grewal SS, Barker JN, Davies SM et al. Unrelated donorhematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003; 101: 4233-4244.

Griffin B, Baker HJ Domestic cats as laboratory animals. In JG Fox, LC Anderson, FM Lowe, FW Quimby (eds.): *Laboratory Animal Medicine*, 2nd edition. New York: Academic Press 2001: 460

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 54-63.

Gronthos S, Graves SE, Simmons PJ. Isolation, purification and *in vitro* manipulation of human bone marrow stromal precursor cells. In: "Beresford JN, Owen ME", eds. *Marrow Stromal Cell Culture*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1998: 26-42.

Guest DJ, Smith MRW, Allen WR. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. *Equine vet. J.* 2008; 40: 178-181.

Gutierrez-Rodriguez M, Reyes-Maldonado E, Mayani H. Characterization of the adherent cells developed in Dextertype long-term cultures from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2000; 18: 46-52.

Halleux C, Sottile V, Gasser JA, Seuwen K. Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001; 2: 71-76.

Hamman JH. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules* 2008; 13: 1599-1616.

Harrison P, Cramer EM. Platelet -granules. *Blood Rev* 1996; 7: 52-62.

Haskins M, Baker HJ, Birkenmeier E. Transplantation in animal model systems. In RJ Desnick (ed.): *Treatment of Genetic Diseases*. New York: Churchill Livingstone 1991: 183.

Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 298-305.

Hayes AJ, Benjamin M, Ralphs JR. Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. *Matrix Biol.* 2001; 20: 107-121.

Hayes B, Fagerlie SR, Ramakrishnan A, Bara S, Harkey M, Graf L, Bar M, Bendoraite A, Tewari M, Torok-Storb B. Derivation, Characterization, and *In Vitro* Differentiation of Canine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2008; 26: 465–473.



Haynesworth SE, Goldberg VM, Caplan AI. Diminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging. In “Musculoskeletal Soft-tissue Aging: Impact on Mobility”, sezione 1, Buckwalter JA, Goldberg VM, Y Woo SL-Y (eds). American Academy of Orthopaedic Surgeons: Rosemont, IL, USA, 1994; 79–87.

Hertel DJ. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and bone marrow components. *Proc Am Assoc Eq Pract* 2001; 47: 319-321.

Herzenberg LA e De Rosa SC. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 2000; 21: 383- 390.

Hilibrand AS, Carlson GD, Palumbo MA, Jones PK, Bohlman HH. Radiculopathy and myelopathy at segments adjacent to the site of a previous anterior cervical arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81: 519-528.

Hipp J e Atala A. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 3-11.

Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, Omi H, Watanabe T, Serigano K, Tamura F, Sakai D. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res* 2008; 26: 589-600.

Holdstock NB, McGladdery AJ, Ousey JC. Assessing methods of collection and changes of selected biochemical constituents in amniotic and allantoic fluid throughout equine pregnancy. *Biol Reprod Mono* 1995; 1: 21-38.

Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-1161.

Horner HA, Roberts S, Bielby RC, Menage J, Evans H, Urban JP. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype. *Spine* 2002; 27: 1018-1028.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine* 1999; 5: 309-313.

Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, Sand T, Mitchell KE. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 2007; 362: 347-353.

Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res* 2005; 23: 1383-1389.

Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb HJ, Thalmeier K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* 2000; 18: 252-260.

Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004; 6: 543-53.

In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multi-lineage differentiation potential. *Haematologica* 2003; 88: 845-852.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102: 1548-1549.

Jackson K, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1-8.

Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53: 121-127.

Jang BJ, Byeon YE, Lim JH, Ryu HH, Kim WH, Koyama Y, Kikuchi M, Kang KS, Kweon OK. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *J Vet Sci* 2008; 9: 387-393.

Jessop HL, Noble BS, Cryer A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cell population within ovine bone marrow. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 248S.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.

Jin GZ, Yin XJ, Yu XF, Cho SJ, Choi EG, Lee YS, Jeon JT, Yee ST, Kong IK. Generation of neuronal-like cells from umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells of a RFP-transgenic cloned cat. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 723-726.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998; 238: 265-272.

Jomura S, Uy M, Mitchell K, Dallasen R, Bode CJ, Xu Y. Potential treatment of cerebral global ischemia with Oct-4 umbilical cord matrix cells. *Stem Cells* 2007; 25: 98-106.

Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 817–827.

Ka CD, Li SH, Weisel RD, Zhang S, Li RK. Recipient age determines the cardiac functional improvement achieved by skeletal myoblast transplantation. *J Am College Card* 2007; 50: 1086-1092.

Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-134.

Kajikawa Y, Morihara T, Watanabe N, Sakamoto H, Matsuda K, Kobayashi M, Oshima Y, Yoshida A, Kawara M, Kubo T. GFP chimeric models exhibited a biphasic pattern of mesenchymal cell invasion in tendon healing. *J Cell Physiol* 2007; 210: 684-691.

Kalus M, Ghidoni JJ, O’Neal RM. Human buffy coat in three-dimensional matrix tissue cultures and monolayers. *Pathol Microbiol (Basel)* 1968; 31: 353-364.

Kamishina H, Deng J, Oji T, Cheesemen JA, Clemmons RM. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2006; 67: 1921-1928.

Kang JW, Kang KS, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. Soluble Factors–Mediated Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell and Dev* 2008; 17: 681-694.

Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: In situ and *in vitro* surveys. *Stem Cells* 2007; 25: 319-331.

Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 1662-1665.

Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 2005; 23: 412-423.

Kehler J, Roelke-Parker M, Pukazhenthil B, Swanson W, Ware C, Dobrinski I, O'Brien S. Production of *in vitro*- and *in vivo*- derived cat blastocysts for the establishment of feline embryonic stem cells. *Reprod Fert Dev* 2006; 18: 207 (Abstract).

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-1301.

Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, Hadjantonakis AK, Nagy A, Tam PP. The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* 1999; 126: 4691-4701.

Kisiday JD, Kopesky PW, Evans CH, Grodzinsky AJ, McIlwraith CW, Frisbie DD. Evaluation of Adult Equine Bone Marrow- and Adipose-Derived Progenitor Cell Chondrogenesis in Hydrogel Cultures *J Orthop Res* 2008; 26: 322-331.

Klein AK, Dyck JA, Stitzel KA, Shimizu J, Fox LA, Taylor N. Characterization of canine fetal lymphohematopoiesis: studies of CFUGM, CFUL, and CFUF. *Exp Hematol* 1983; 11: 263-274.

Koch TG, Betts DV. Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model. *Expert Op on Biol Ther* 2007; 7: 1621-1626.

Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 2007; 7: 26-34.

Koch TG, Thomsen PD, Betts DH. Improved isolation protocol for equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cytoteraphy* 2009; 11: 443-447.

Koerner J, Nesi D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Verlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1613-1619.

Komarcevic, A. The modern approach to wound treatment. *Med Pregl* 2000; 53: 363-368.

Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg* 1998; 25: 397-405.

Koso H, Satoh S, Watanabe S. c-kit marks late retinal progenitor cells and regulates their differentiation in developing mouse retina. *Dev. Biol.* 2007; 301: 141-154.

Kristoffersen M, Ohberg L, Johnston C, Alfredston H. Neovascularisation in chronic tendon injuries detected with color Doppler ultrasound in horse and man: implications for research and treatment. *Knee Surg, Sports Traumat, Arthrosc* 2005; 13: 505-508.

Kucia M, Reza R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 2005; 19: 1118-1127.

Kumar BM, Yoo JG, Ock SA, Kim JG, Song HJ, Kang EJ, Cho SK, Lee SL, Cho JH, Balasubramanian S, Rho GJ. In vitro differentiation of mesenchymal progenitor cells derived from porcine umbilical cord blood. *Mol Cells* 2007; 24: 343-350.

Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y, Ikeda Y. Human circulating CD14 monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 833- 845.

Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. *Br J Haematol* 1997; 97: 561-570.

Kuznetsov S, Gehron Robey P. Species differences in growth requirements for bone marrow stromal fibroblast colony formation *In vitro*. *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 265-270.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; 153: 11331-1140.

Lange C, Kaltz C, Thalmeier K. Hematopoietic reconstitution of syngeneic mice with a peripheral blood-derived, monoclonal CD34-, Sca-1, Thy-1(low), c-kit stem cell line. *J Hematother Stem Cell Res* 1999; 8: 335-342.

Lange Consiglio A, Corradetti B, Bizzaro D, Cassano M, Cremonesi F. Horse amnion: a source of mesenchymal (AMSC) and epithelial stem cells. *Reprod Fert and Dev* 2010; 22: 349-350 (abstract).

Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, Bottollier-Depois JF, Chapel A, Ernou I, Gourven M, Boutin L, Hayden A, Carcamo C, Buglova E, Joussemet M, Revel T de, Gourmelon P. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med* 2007; 2: 785-794.

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): Implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 557-564.

Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR Jr, Moseley AB, Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded

mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. Biol Blood Marrow Transplant 2005; 11: 389-398.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol 2003; 31: 890-896.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet 2004; 363: 1439-1441.

Lee CK. Accelerated degeneration of the segment adjacent to a lumbar fusion. Spine 1988; 13: 375-377.

Lee EH, Hui JHP. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. J Bone Joint Surg 2006; 88-B: 841-851.

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004; 103: 1669-1675

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cell Physiol Biochem 2004; 14: 311-324.

Lemischka I. A few thoughts about the plasticity of stem cells. Exp Hematol 2002; 30: 848-852.

Li X, Zhou SG, Imreh MP, Ahrlund-richter L, Allen WR. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of Inner Cell Mass cells. Stem Cells and Dev 2006; 15: 523-531.



Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci* 2007; 8: 275-282.

Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC.. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91: 1017-1026.

Liu ZJ, Zughe Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem* 2009; 106: 984-991.

Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauvé Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* 2007; 25 :602-611.

Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 1971; 11: 345-349.

Ma L, Feng XY, Cui BL, Law F, Jiang XW, Yang LY, Xie QD, Huang TH. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J* 2005; 118: 1987-1993.

Magatti M, De Munari S, Vertua E, Gibelli L, Wengler GS, Parolini O. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells* 2008;26: 182-192.

Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res* 1997; 15: 546-577.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; 86: 1099-1100.

Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2046-2055.

Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp hem* 2002; 30: 879-886.

Martin GR Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocitoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-7638.

Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *British J Hemat* 2003; 122: 877-891a.

Martin-Rendon E, Watt SM. Exploitation of stem cell plasticity. *Transf Med* 2003; 13: 325-349 b.

Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofacial Surg* 2004; 62: 489-496.

Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70: 841-847.

Maximow AA. Culture of blood leucocytes: from lymphocyte and monocyte to connective tissues. *Arch Exp Zellforsch* 1928; 5: 169-268.

McCallion RL, Ferguson MWJ. Fetal wound healing and the development of anti-scarring therapies for adult wound healing, in: Clark, R.A.F. (Ed.), *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, Plenum Press, New York.

McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ. Characterization and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2009; 219:324-333.

McCulloch EA. Stem cells and diversity. *Leukemia* 2003; 17: 1042-1048.

Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schäffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brien SJ. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 1999; 57: 9-23.

Mescher EJ, Platzker AC, Ballard PL, Kitterman JA, Clements JA, Tooley WH. Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in the fetal lamb. *Journal of Applied Physiology* 1975; 39: 1017-1021.

Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23: 1549-1559

Miki T, Strom SC. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 133-142.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24: 376-385.

Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia. *Stem Cells* 2003; 21: 50-60.

Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, Yamabe T, Ito Y.. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 2002; 22: 433-440.

Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch* 2003; 70: 300-306.

Montjovent MO, Burri N, Mark S, Federici E, Scaletta C, Zambelli PY, Hohlfeld P, Leyvraz PF, Applegate LL, Pioletti DP. Fetal bone cells for tissue engineering. *Bone* 2004; 35: 1323-1333.

Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006; 17: 279-290.

Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311: 1880-1885.

Moore RM, Silver RJ, Moore JJ. Physiological apoptotic agents have different effects upon human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Placenta* 2003; 24: 173-180.

Muller F, Dommergues M, Ville Y, Muller F, Dommergues M, Ville Y. Amniotic fluid digestive enzymes: diagnostic value in fetal gastrointestinal obstructions. *Prenatal Diagnosis* 1994; 14: 973-979.

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113: 1161-1166.

Murphy JM, Heinegard R, McIntosh A, Sterchi D, Barry FP. Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. *Matrix Biology* 1999; 18: 487-497.

Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139: 504-509.

Nagy RD, Tsai BM, Wang M, Markel TA, Brown JW, Meldrum DR. Stem cell transplantation as a therapeutic approach to organ failure. *J Surg Res* 2005; 129: 152-160.

Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 1997; 18: 53-64.

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cell* 2001; 19: 193-204.

Oedayrajsingh-Varma M, van Ham S, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure. *Cytherapy* 2006; 8: 166-177.

Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal syem cells. *J Cell Biochem* 2010;109: 277–282.

Olver RE, Strang LB. Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. *Journal of Physiology* 1974; 241: 327-357.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar VC, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strm SC. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008; 26: 300-311.

Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R, Orrico C, Foroni L, Stella A, Alviano F, Bagnara GP, Lucarelli E. Ultrastructural characteristics of human

mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastruct Pathol* 2007; 31: 23-31.

Passeri S, Nocchi F, Lamanna R, Lapi S, Miragliotta V, Giannessi E, Abramo F, Stornelli MR, Matarazzo M, Plenteda D, Urciuoli P, Scatena F, Coli A. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Intern* 2009; 33: 100-105.

Paul J. Establishment of permanent cell strains from human adult peripheral blood. *Nature* 1958; 182: 808.

Pelled G, Hoffman A, Eberle P. Tendon repair mediated by genetically engineered mesenchymal stem cells. *Trans Orthop Res Soc* 2004; 50: 346.

Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 1462-1470.

Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4857-4861.

Perin L, Giuliani S, Jin D, Sedrakyan S, Carraro G, Habibian R, Warburton D, Atala A, De Filippo RE. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. *Cell Prolif* 2007; 40: 936-948.

Perin L, Sedrakyan S, Da Sacco S, De Filippo R. Characterization of Human Amniotic Fluid Stem Cells and Their Pluripotential Capability. *Methods in Cell Biology* 2008; 86: 85-99.

Perkins NR. Epidemiology of health and performance in New Zealand racehorses. PhD Thesis, Massey University, Palmertston North, New Zealand, 2005.

Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 72: 570-585.

Piersma AH, Ploemacher RE, Brockbank KG, Nikkels PG, Ottenheim CP. Migration of fibroblastoid stromal cells in murine blood. *Cell Tissue Kinet* 1985; 18: 589-595.

Pieterella S, Anker SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102: 1548-1549.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656-663.

Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 664-673.

Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res* 2006; 312: 727-736.

Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: A new source for stem cell research? *Hum Reprod* 2004; 18: 1489-1493.

Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: A comprehensive study. *Ann Plast Surg* 2005; 54: 288-292.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129: 118-129.

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol* 2008; 215: 329-336.

Radcliffe CH, Fortier LA. Development of a patient-side construct for cartilage regeneration sign mesenchymal stem cells and platelet rich plasma composite grafts generated through simple centrifugation techniques. *Trans 2006 ACVS Symp*, October 2006.

Rangan SR. Origin of the fibroblastic growths in chicken buffy coat macrophage cultures. *Exp Cell Res* 1967; 46: 477-487.

Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2003; 18: 29-40.

Reading L, Still K, Bishop N. Peripheral blood as an alternative source of mesenchymal stem cells. *Bone* 2000; 26 (suppl): S9.

Reed SA, Johnson SE. Equine Umbilical Cord Blood Contains a Population of Stem Cells That Express Oct4 and Differentiate Into Mesodermal and Endodermal Cell Types. *J Cell Physiol* 2008; 215: 329-336.



Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.

Rhodes NP, Srivastava JK, Smith RF, Longinotti C. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 397-402.

Richardson LE, Dudhia J, Sadler CJ. Extracellular matrix cues for mesenchymal stem cell differentiation. *Proc 53rd Orthop Res Soc Meeting* 2007; 472.

Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupl T, Sittinger M. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 321-327.

Risbud MV, Shapiro IM, Guttapalli A, Di Martino A, Danielson KG, Beiner JM, Hillibrand A, Albert TJ, Anderson DG, Vaccaro AR. Osteogenic potential of adult human stem cells of the lumbar vertebral body and the iliac crest. *Spine* 2006; 31: 83-9.

Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Rep Regenerat* 1997; 5: 12-17.

Rohn JL, Gwynn SR, Luring AS, Linenberger ML, Overbaugh J. Viral genetic variation, AIDS, and the multistep nature of carcinogenesis: the feline leukemia virus model. *Leukemia* 1996; 10: 1867-1869.

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21: 105-110.

Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao, MS, Carpenter MK. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dynam* 2004; 229: 259-274.

Rossdale PD, Hopes R, Digby NJ, Offord K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec.* 1985; 116: 66-69.

Rubin H. The disparity between human cell senescence *in vitro* and lifelong replication *in vivo*. *Nat Biotech* 2002; 20: 675-681.

Ryan J, Barry F, Murphy JM, Mahon B. Mesenchymal stem cells avoid allogenic rejection. *J Inflamm* 2005; 2: 8.

Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgemuth R. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* 2008; 14: 181-187.

Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 371-379.

Saito S, Ugai H, Sawai K, Yamamoto Y, Minamihashi A, Kurosaka K, Kobayashi Y, Murata T, Obata Y, Yokoyama K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation *in vitro*. *FEBS Letters* 2002; 531: 389-396.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2521-2529.

Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 1996; 209: 9-12.

Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, Suzuki S. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet* 2000; 45: 171-176.

Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 2003; 287: 289-300.

Sartore S, Lenzi M, Angelini A, Chiavegato A, Gasparotto L, De Coppi P, Bianco R, Gerosa G. Amniotic mesenchymal cells autotransplanted in a porcine model of cardiac ischemia do not differentiate to cardiogenic phenotypes. *Eur J Cardio-thor Surg* 2005; 28: 677-684.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005; 23: 220-229.

Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007; 25: 230-240.

Schäffler A, Büchler C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818-827.

Schneider MR, Adler H, Braun J, Kienzle B, Wolf E, Kolb HJ. Canine embryo-derived stem cells – toward clinically relevant animal models for evaluating efficacy and safety of cell therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 1850-1851.

Schuh EM, Friedman MS, Carrade DD, Li J, Heeke D, Oyserman SM, Galuppo LD, Lara DJ, Walker NJ, Ferraro GL, Owens SD, Borjesson DL. Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood. *Am J Vet Res* 2009; 70: 1526-1535.

Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264.

Seo MS, Jeong YH, Park JR, Park SB, Rho KH, Kim HS, Yu KR, Lee SH, Jung JW, Lee YS, Kang KS. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 2009; 10: 181-187.

Serrano MA, Gomez MC, Lopez M, Dumas CL, Smith KE, Leibo SP, Dresser BL, Pope CE. Derivation of cat embryonic stem-like cells from *in vitro*-produced blastocysts and their support by intraspecific vs interspecific feeder cells. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 210 (Abstract).

Shah Nm, Groves AK, Anderson DJ. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGF $\beta$  superfamily members. *Cell* 1996; 85: 331-343.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *The Annals of Thoracic Surgery* 2002; 73: 1919-1925.

Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 2005;116:1686-1696.

Sive JJ, Baird P, Jeziorski M, Watkins A, Hoyland JA, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol* 2002; 55: 91-97.

Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006; 19: 43-47.

Smith P, Adams WP Jr., Lipschitz AH, Chau B, Sorokin E, Rohrich RJ, Brown SA. Autologous human fat grafting: Effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 1836-1844.

Smith RK, Goodship AE. Tendon and ligament physiology. In: Equine sports medicine and surgery ediz Saunders 2004: 130-151.

Smith RKW, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as potential novel treatment. Eq Vet J 2003; 35: 99-102.

Smith RKW. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. Disabil Rehabil 2008; 30: 1752-1758.

Snow MH, Bennett D. Gastrulation in the mouse. Assessment of cell populations in the epiblast of tw18/tw18 embryos. J Embryol Exp Morphol 1978; 47: 39-52.

Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Cell Physiol 2005; 203: 398-409.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24: 462-471.

Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. Bone 2002; 30: 699-704.

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. Lancet 2003; 361: 45-46.

Strassburg S, Smith RK, Goodship AE. Adult and late foetal equine tendon contain cell populations with weak progenitor properties in comparison to bone marrow derived mesenchymal stem cells. Proc 52nd Orthop Res Soc Meeting 2006.

Streubel B, Martucci-Ivessa G, Fleck T, Bittner RE. *In vitro* transformation of amniotic cells to muscle cells-background and outlook. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 1996; 146: 216-217.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676a.

Takahashi K, Ichisaka T, Yamanaka S. Identification of genes involved in tumor-like properties of embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 2006; 329: 449-458b.

Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta* 1993; 14: 235-245.

Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med* 2009; 234: 1-9.

Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J* 2007; 39: 172-180.

Tecirlioglu RT, Trounson AO. Embryonic stem cells in companion animals (horse, dogs and cats): present status and future prospects. *Reprod Fert and Dev* 2007; 19:7 40-747.

Terada S, Matsuura K, Enosawa S, Miki M, Hoshika A, Suzuki S, Sakuragawa N. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplant* 2000; 9: 701-704.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA; Swiergiel JJ, Marshall VS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.

Timper K, Seboek D, Eberhardt M. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 1135-1140.

Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 2005; 23: 1105-1112.

Torricelli F, Brizzi L, Bernabei PA, Gheri G, Di Lollo S, Nutini L, Lisi E, Di Tommaso M, Cariati E. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* 1993; 98: 119-126.

Trapani JA and Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immun* 2002; 2: 735-747.

Troyer DL, Weiss ML. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. *Stem Cells* 2008; 26: 591-599.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004; 19: 1450--456.

Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 2005; 205: 194-201.

Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LDK. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol* 2002; 27: 227-232.

Vela DC, Silva GV, Assad JAR, Sousa ALS, Coulter S, Fernandes MR, Perin EC, Willerson JT, Buja LM. Histopathological study of healing after allogenic mesenchymal stem cell delivery in myocardial infarction in dogs. *J Histochem and Cytochem* 2009; 57: 167-176.

Vidal MA, Kilroy GE, Johnson JR, Lopez MJ, Moore RM, Gimble JM. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary Surgery* 2006; 35: 601-610.

Vidal MA, Kilroy GE, Lopez ME, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells *Veterinary Surgery* 2007; 36: 613-622.

Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 2010, in press.

Vojtassák J, Danisovic L, Kubes M, Bakos D, Jarábek L, Ulicná M, Blasko M. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuroendocrinol Lett* 2006; 27: 134-137

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116: 639-648.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33: 1402-1416.

Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations—comparing apples and oranges. *Stem Cell* 2007; Rev 3: 239-248.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22: 1330-1337.

Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 2006; 39: 1563-1582.



Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002; 7: 113-117.

Watt FM e Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427- 1430.

Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T.. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003; 12: 545-552.

Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: Preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; 24: 781-792.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808.

Weissman A, Jakobi P, Bronshtein M, Goldstein I. Sonographic measurements of the umbilical cord and vessels during normal pregnancies. *J Ultrasound Med* 1994; 13: 11-14.

Weissman IL. Stem Cells: Units of development, units of re generation and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168.

Wennberg L, Song Z, Bennet W, Zhang J, Nava S, Sundberg B, Zhang J, Nava S, Sundberg B, Bari S, Groth CG, Korsgren O. Diabetic rats transplanted with adult porcine islets and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunomide remain normoglycemic for up to 100 days. *Transplantation* 2001; 71: 1024-1033.

Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-374.

Wiles M e Johansson BM. Embryonic stem cell development in chemically defined medium. *Exp Cell Res* 1999; 247: 241-248.

Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res* 2007; 25: 913-925.

Wilson EB. *The cell in development and inheritance*. MacMillan, London, 1896.

Wilson AM, McGuigan MP, Su A, van Den Bogert AJ. Horses damp the spring in their step. *Nature* 2001; 414: 895-899.

Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J. Effect of transforming growth factor beta 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1003-1010.

Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 117-143.

Wright WE e Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biot* 2002; 20: 682-688.

Wu GD, Bowdish ME, Jin YS, Zhu H, Mitsuhashi N, Barsky LW, Barr ML. Contribution of mesenchymal progenitor cells to tissue repair in rat cardiac allografts undergoing chronic rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 2160-2169.

Wu GD, Nolte JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA, Cramer DV. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 2003; 75: 679-685.

Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, Liu YL. *In vitro* and *in vivo* differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* 2007; 100: 608-616.

Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25: 2648-2659

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-1830.

Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24: 2582-2591.

You Q, Cai L, Zheng J, Tong X, Zhang D, Zhang Y. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008 ; 103: 149-152.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998; 16: 406-413.

Zhang Y, Wang C, Liao W, Li Z, Guo X, Zhao Q, Duan C, Xia R. *In vitro* chondrogenic phenotype differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2004; 24: 275-278.

Zhang D, Fan GC, Zhou X, Zhao T, Pasha Z, Xu M, Zhu Y, Ashraf M, Wang Y. Over expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 281-292.

Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005; 79: 528-535.

Zhu S, Lu Y, Zhu J, Xu J, Huang H, Zhu M, Chen Y, Zhou Y, Fan X, Wang Z. Effects of Intrahepatic Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells Autotransplantation on the Diabetic Beagle Dogs. *J Surg Res.* 2009 [Epub ahead of print].

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-488.