

RICERCA CORRENTE 2007

REPORT FINALE Progetto IZSLT 02/07 RC

Verifica dell'efficacia del trattamento delle tendino/desmopatie del cavallo mediante l'impianto di cellule staminali omologhe derivate dal grasso

Area tematica: **Benessere animale**

linea di ricerca: Ricerche mirate allo studio di terapie innovative ed alternative all'uso dei farmaci, volte a migliorare le condizioni di benessere animale, a ridurre la sofferenza degli animali e le condizioni invalidanti. Studi clinici applicabili come modelli per il trasferimento delle esperienze in campo umano

Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino

Struttura di appartenenza: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma

e-mail gianluca.autorino@izslt.it

Data scadenza del progetto: 31.03.2011

“ Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti”

Roma li, 30 novembre 2012

INDICE GENERALE ED ELENCO DEGLI ALLEGATI

ELENCO DEI COLLABORATORI	3
SINTESI IN ITALIANO	4
SUMMARY	10
MATERIALI E METODI	12
RISULTATI	17
CONCLUSIONI	20
BIBLIOGRAFIA	21
MODALITA' DI DIVULGAZIONE DEI RISLULATI	24

ELENCO DEI COLLABORATORI

Unità operativa n. 1, Gian Luca Autorino e Teresa Scicluna, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini – Roma

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Ricerca letteratura internazionale su materie inerenti il progetto
- Studio preliminare delle sedi anatomiche ai fini della determinazione delle migliori condizioni di prelievo
- Messa a punto di protocolli per la conservazione ed il trasporto delle cellule ai fini dell'impianto
- Definizione delle condizioni d'impianto di inoculo
- Individuazione di un sistema di scoring per la valutazione casuale delle immagini
- Invio delle immagini a referee internazionali per la verifica dei risultati

Unità operativa n. 2, Demetrio Amaddeo, Katia Barbaro e Pamela Bonini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – Dipartimento di Biotecnologie - Roma

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Studio e messa a punto in laboratorio delle condizioni culturali di cellule staminali di origine mesenchimale
- Messa a punto di protocolli per la digestione della matrice di origine, l'isolamento, la crescita, il controllo della sterilità delle colture, la conservazione ed il trasporto delle cellule ai fini dell'impianto
- Caratterizzazione delle cellule staminali isolate
- Verifica delle migliori condizioni per la conservazione ed il trasporto

Unità operativa n. 3, Fernando Canonici, Clinica Veterinaria Equine Practice - Campagnano di Roma

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Definizione delle condizioni d'impianto di inoculo
- Individuazione di cavalli affetti da tendino/desmopatie
- Espianto di grasso sottocutaneo
- Reimpianto intralesionale ecoguidato
- follow up clinico sui soggetti sottoposti ad impianto

Unità operativa n. 4, Marcello Sala, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – Osservatorio epidemiologico - Roma

- Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:
- Studio ed individuazione di un modello sperimentale da impiegare per la valutazione statistica dei risultati
- Realizzazione di un sistema per la valutazione casuale delle immagini
- Analisi dei risultati attraverso l'utilizzo di test statistici per la valutazione della concordanza depurata dell'effetto del caso

SINTESI IN ITALIANO

Verifica dell'efficacia del trattamento delle tendino/desmopatie del cavallo mediante l'impianto di cellule staminali omologhe derivate dal grasso

*Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti*

Parole chiave: adipose mesenchymal stem cells, equine tendon-desmopathy, multi-rater agreement beyond chance

Autore: Gian Luca Autorino

N. identificativo progetto: IZSLT 02/07 RC

Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino

e-mail: gianluca.@izslt.it

INTRODUZIONE

Le tendino-desmopatie rappresentano una delle condizioni patologiche più frequenti dell'apparato muscolo-scheletrico del cavallo ed in particolare dei cavalli atleti impiegati nelle varie discipline sportive senza esclusione delle varie specialità. Queste patologie spesso rappresentano la fine della carriera atletica del soggetto nonché un grado di sofferenza cronica per l'impossibilità di una guarigione completa dovuta alla incapacità implicita del soggetto adulto nel riformare fibre tendinee normali che possano garantire un buon grado di riparazione anatomico-funzionale. Le varie metodiche sia mediche che chirurgiche danno scarsi risultati per ciò che riguarda la guarigione della struttura interessata per l'incapacità da parte dei tenociti di riprodurre le normali fibre tendinee costituite da collagene di tipo I. Il parziale successo delle metodiche terapeutiche proposte negli ultimi decenni non hanno portato comunque ad un buon grado di risoluzione e quindi di recupero dei soggetti colpiti da patologie dei tendini e legamenti. Tuttavia, l'ausilio della diagnostica collaterale ecografica ha permesso una più precisa e oggettiva valutazione diagnostica e, al tempo stesso, ha confermato lo scarso successo dei trattamenti.

Per questi motivi si stanno cercando delle vie alternative che possano garantire una restituito del tessuto interessato.

Negli ultimi anni, la ricerca è orientata a verificare se, attraverso l'impiego di cellule staminali, si possa individuare una via alternativa alla terapia classica di tali patologie. Viene da diversi autori ipotizzata la possibilità di ottenere, sotto l'influenza degli stimoli locali, la trasformazione delle cellule impiantate presso la sede della lesione in tenociti ai quali spetterebbe la produzione di collagene di tipo I e II.

Allo stato attuale, per l'ottenimento delle cellule staminali omologhe, si stanno principalmente due matrici biologiche: il midollo osseo ed il grasso, metodiche che comportano tempi differenti per l'impianto con relativa diversità nelle cellule utilizzate con possibili riflessi sull'efficacia dei trattamenti. Tuttavia non esistono ancora degli studi clinici retrospettivi su grandi numeri che possano testimoniare la reale efficacia di questo trattamento anche se le valutazioni ecografiche di controllo post-impianto testimoniano una riparazione qualitativamente superiore per la precoce rigenerazione di fibre tendinee altrimenti difficilmente apprezzabili in condizioni di riparazione tradizionale.

La considerevole incidenza delle patologie tendineo-legamentose dei cavalli, assieme alla disponibilità di efficienti strumenti diagnostici, funzionali ad una più obbiettiva valutazione dei processi riparativi, richiedono uno studio più approfondito che si avvalga anche di approcci metodologici in grado di poter certificare i risultati, attraverso l'impiego di criteri di valutazione oggettivi per superare le esperienze relative ai singoli casi clinici.

OBIETTIVI

Il progetto aveva come obiettivi:

- la definizione delle condizioni di crescita, moltiplicazione e di protocolli per l'estrazione, la coltivazione, la conservazione ed il trasporto di cellule staminali derivate da grasso
- la caratterizzazione in vitro e la definizione di un protocollo per il loro impiego terapeutico nel trattamento delle tendino/desmopatie
- la ricerca di un sistema di valutazione dei trattamenti per controllare nel tempo il processo di crescita delle fibre tendinee
- la definizione di un metodo di lavoro finalizzato all'ottenimento di letture oggettive delle immagini ecografiche da parte di esperti chiamati a valutare i risultati in maniera casuale

METODOLOGIA DI LAVORO

Per la realizzazione del progetto sono state definite le fasi e la metodologia di seguito riportata:

- **verifica preliminare al mattatoio delle regioni anatomiche** con maggiori quantità di grasso mobile sottocutaneo, del relativo contenuto in cellule staminali e delle caratteristiche biochimiche per i processi di digestione e scelta della più agevole sede di prelievo nell'animale in vita
- **comparazione fra potenzialità fra cellule staminali mesenchimali** di derivazione da midollo osseo e da grasso, in termini di concentrazione, capacità replicativa e multipotenzialità
- **messa a punto di metodi** per la digestione del grasso, l'isolamento, la crescita, la conservazione ed il trasporto delle cellule ai fini dell'impianto
- **definite le condizioni d'impianto di inoculo** ai fini dello studio si è proceduto all'espianto di grasso sottocutaneo in stazione e anestesia locale, all'isolamento e coltivazione delle cellule secondo i metodi predefiniti ed al successivo reimpianto intralesionale ecoguidato di quantità di cellule staminali definite
- **individuazione di soggetti da arruolare per lo studio:** Lo studio clinico è stato condotto su oltre 120 cavalli affetti da tendino/desmopatie di recente manifestazione o riacutizzazione di casi cronici. Ai fini delle valutazioni comparative, fra i casi trattati, sono stati selezionati 17 soggetti con tipologia e localizzazione delle lesioni tendinee assimilabili su cui sono stati effettuati esami ecografici di controllo a 30, 60 e 120 gg. dalla data d'impianto per la valutazione del grado di riempimento delle lesioni e dell'allineamento delle fibre tendinee di nuova generazione.
- **Individuato un sistema di scoring per la valutazione casuale delle immagini** di cui al punto precedente che prevede l'assegnazione alle immagini ecografiche di valori sulla base di due tipologie di valutazione, entrambe suddivise in quattro categorie di giudizio. Per la tipologia di valutazione qualitativa, è stato richiesto di esprimere un giudizio in base al grado di ecogenicità categorizzato in 4 livelli: completely anechoic, mostly anechoic, hypoechoic, isoechoic. Per la tipologia di valutazione quantitativa un giudizio in base alla percentuale di fibre rilevabili al punto di inoculo, categorizzato in 4 livelli: 0-25%, 26%-50%, 51%-70%, 76%-100%. L'analisi dei risultati mediante lettura delle immagini da parte di esperti, effettuando una diagnosi relativa allo status delle lesioni ed al grado di restituito anatomica della parte, basate sullo scoring. Per avere un giudizio quanto più oggettivo rispetto ai risultati attesi sono stati selezionati 4 Referee di riconosciuta esperienza internazionale cui sono stati distribuiti tre panels ciascuno contenente 51 immagini

ecografiche relative a tre differenti stadi di lesione, corrispondenti a 17 cavalli arruolati nello studio. Per ciascun cavallo erano presenti tre repliche delle immagini ecografiche rilevate al tempo 0 (A), al tempo 0+60gg (B) ed al tempo 0+120gg (C), per un totale di 3 immagini al tempo A, 3 immagini al tempo B e tre immagini al tempo C per ciascuno dei 17 cavalli arruolati. Ad ognuna di tali immagini è stato attribuito un codice univoco casuale in modo che i singoli osservatori non potessero risalire alla codifica originaria.

RISULTATI

Le valutazioni espresse dai 4 esperti sottolineano una propensione ad attribuire giudizi di maggiore ecogenicità e di maggiore percentuale di fibre alle immagini ecografiche eseguite a 60 giorni (stadio B) e 120 giorni (stadio C) post-inoculo rispetto alle immagini relative allo stadio A (tempo 0 pre-inoculo) (Tabella 1- esempio per ecogenicità). I giudizi espressi da ogni singolo esperto, sia qualitativo che quantitativo, per le 3 repliche della stessa immagine sono risultati ripetibili (K di Randolph > 0,61). I 4 esperti, si sono inoltre dimostrati coerenti tra loro nell'esprimere lo stesso giudizio per la stessa immagine, dimostrando elevata riproducibilità delle valutazioni espresse (K di randolph > 0,61). Ogni esperto è risultato coerente con se stesso nell'esprimere lo stesso giudizio in funzione dello stadio (A, B e C) al quale appartenevano le immagini (tabelle 2 e 3). La riproducibilità viene mantenuta per le immagini di stadio B e C mentre è risultata inferiore (moderata) per le Immagini di stadio A (tabella 4). La regressione logistica ha confermato probabilità significativamente maggiori che immagini di stadio B e C venissero valutate ad alta ecogenicità ed alta % di fibre rispetto alle immagini relative allo stadio A della lesione. In particolare le immagini di stadio C hanno mostrato una probabilità 95 volte maggiore di essere classificate ad elevata ecogenicità (O.R. 95, 8; 41,8 < O.R. <219,5) e 50 volte maggiore di essere classificate ad alta % di fibre rispetto alle immagini di stadio A (O.R. 49,5; 26,3 < O.R. <93,1). L'analisi multivariata ha escluso qualsiasi effetto dell'esperto o della replica sull'outcome osservato (Tabelle 5 e 6).

CONCLUSIONI

In base ai risultati descritti, lo studio è stato in grado di dimostrare, in condizioni di campo ed attraverso un circuito di valutazione indipendente basato sulla diagnostica per immagini, il recupero anatomico di lesioni del tendine flessore superficiale delle falangi del cavallo in seguito all'intervento di inoculo di cellule staminali. Anche se i giudizi espressi dai singoli esperti sulle stesse immagini ecografiche possa risultare influenzata dalla soggettività, nonché dipendere dalla strumentazione utilizzata per la visualizzazione delle immagini su schermi PC diversi, le analisi condotte hanno consentito di accertare la ripetibilità e la riproducibilità di tali giudizi. Inoltre, sebbene non sia stato reclutato un gruppo di cavalli omogeneo per età, sesso e razza, nel complesso è risultata una chiara associazione tra ecografie effettuate a 60 e 120 giorni post inoculo e l'elevata ecogenicità e % di fibre, ad ulteriore supporto del successo della terapia adottata.

La procedura di prelievo del grasso dalla regione paracaudale si è dimostrata semplice, sicura ed in grado di fornire una quantità appropriata di cellule staminali mesenchimali. Successivamente al reimpianto non è stata osservata nessuna reazione secondaria. Questo progetto ha dimostrato che il disegno di valutazione risulta valido ai fini della valutazione della ricostituzione di tessuto tendineo in caso di rottura del tendine flessore superficiale digitale. I risultati clinici appaiono migliori rispetto ai trattamenti tradizionali proposti negli ultimi decenni. Il follow up condotto sui 17 cavalli arruolati ai fini delle valutazioni, ha dimostrato infatti una buona guarigione funzionale, in linea con la guarigione morfologica dei tendini danneggiati, con il ritorno a competere del 71% e del 75% rispettivamente per i cavalli da corsa e dei cavalli da competizione (sport equestri).

Tabella 1. Distribuzione dei giudizi espressi dagli esperti sul grado di ecogenicità per stadio dell'immagine (51 immagini per stadio per ogni esperto)

Stadio dell'immagine	esperto1		esperto 2		esperto 4		esperto 5	
	bassa	alta	bassa	alta	bassa	alta	bassa	alta
A (t. 0)	41	10	34	17	42	9	38	13
B (t+60gg)	8	43	7	44	8	43	10	41
C (t+120 gg)	0	51	2	49	5	46	0	51
Totale	49	104	43	110	55	98	48	105

Tabella 2. Ripetibilità (Valori statistica K di Randolph) dei giudizi espressi sul grado di ecogenicità per stadio dell'immagine ecografica (N=51x3 osservazioni / esperto)

Referee	Stadio A (t=0)	Stadio B (t+60gg)	Stadio C (t+120 gg)
Esperto 1	0,92	0,92	1
Esperto 2	0,76	0,76	0,92
Esperto 4	0,69	0,84	0,76
Esperto 5	0,88	0,84	1

Tabella 3. Ripetibilità (Valori statistica K di Randolph) dei giudizi espressi sulla % di fibre iper per stadio dell'immagine ecografica (N=51x3 osservazioni /esperto)

Referee	Stadio A (t=0)	Stadio B (t+60gg)	Stadio C (t+120 gg)
Esperto 1	0,92	0,92	1
Esperto 2	0,84	0,69	0,69
Esperto 4	0,69	0,84	0,76
Esperto 5	0,84	0,84	0,92

Tabella 4. Riproducibilità (K di Randolph) dei giudizi espressi per stadio dell'immagine ecografica (N=51x3 osservazioni /esperto)

Tipo valutazione	Stadio A (t=0)	Stadio B (t+60gg)	Stadio C (t+120 gg)
Grado di ecogenicità	0,44	0,81	0,88
% di fibre osservate	0,42	0,64	0,84

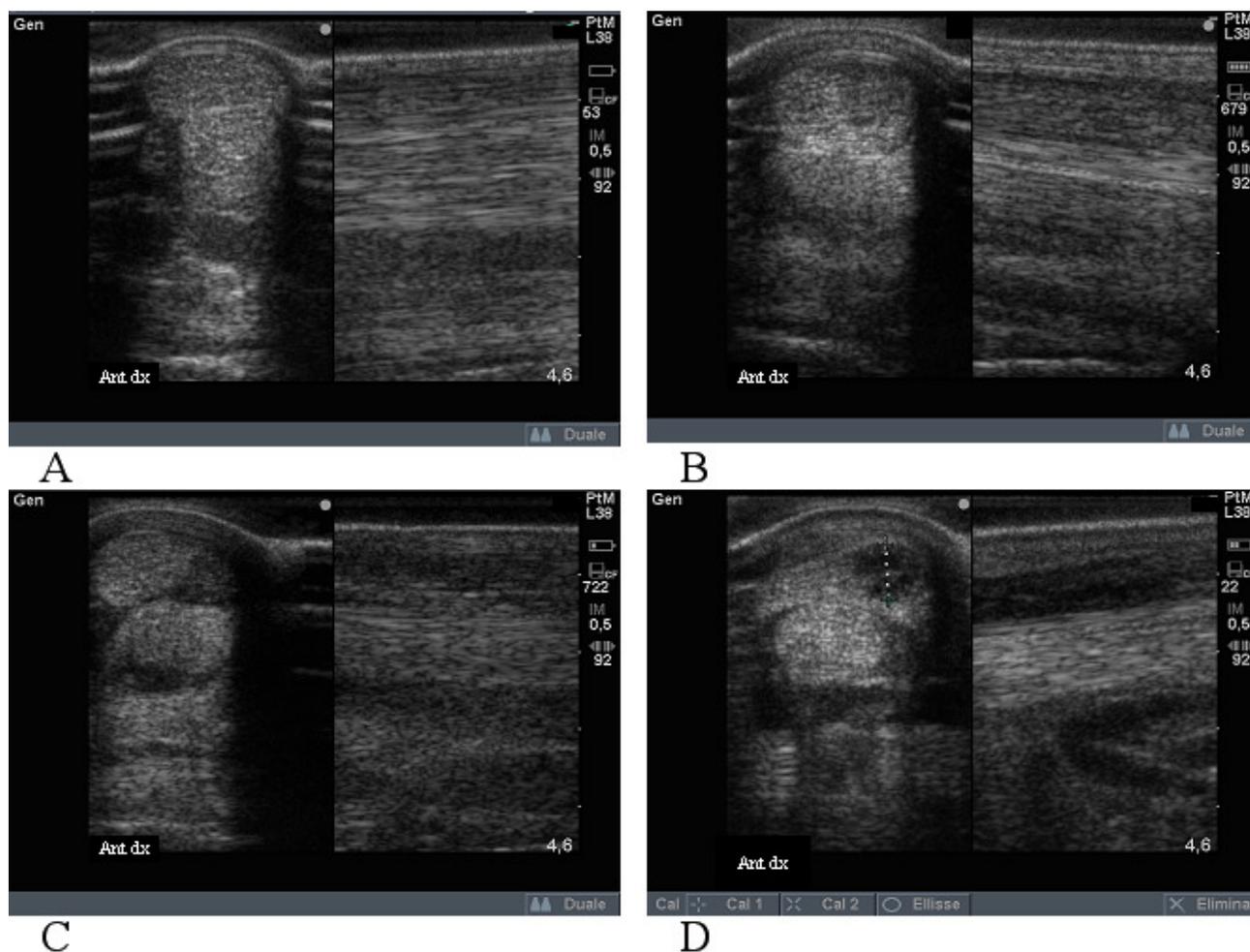
Tabella 5. Regressione Logistica – grado di ecogenicità (alta vs bassa)

<i>Stadio</i>	OR	SE	Z	P> z 	[95% IC]	
stadio A baseline	1	-	-	-	-	-
stadio B	17.423	44.789	11.12	0.000	10.527	28.836
stadio C	95.846	405.306	0,4715	0.000	41.843	219.545

Tabella 6. Regressione Logistica – % di fibre (alta vs bassa)

<i>Stadio</i>	OR	SE	Z	P> z 	[95% IC]	
stadio A baseline	1	-	-	-	-	-
stadio B	19.722	52.534	11.19	0.000	11.700	33.242
stadio C	49.461	155.451	0,5063	0.000	26.284	93.075

Figura 1 – esempi di ecogenicità



BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Barbaro K, Bonini P, Gentili C, Cancedda R, Canonici F, Autorino GL, Amaddeo D. (2008), Cellule staminali da grasso di equino: loro applicazione nella rigenerazione ossea. Atti X Congresso nazionale SIDiLV Alghero ottobre 2008
- Cohen, J. (1968). Weighted kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychological Bulletin* 70, 213-220.
- Fleiss, J. L., Cohen, J. and Everitt, B. S. (1969). Large sample standard errors of kappa and weighted kappa. *Psychological Bulletin* 72, 323-327.
- Fleiss, J. L. (1971). Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin* 76, 378-382.
- Fleiss, J. L. (2003). *Statistical methods for rates and proportions*. 3rd ed. New York: John Wiley, 598-626.
- Landis, J. R. and Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Nakagami H., Morishita R., Maeda K. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy (2006). *J Atheroscler Thromb* 13(2): 77-81.
- Quatto, P. (2004). Un test di concordanza tra più esaminatori. *Statistica* 64, 145-161.
- Randolph, J. (2007). Free-marginal multirater kappa: An alternative to Fleiss's fixed-marginal multirater kappa. Manuscript submitted for publication.

SUMMARY

Introduction: Myo-tendinopathies are common pathological conditions affecting the musculoskeletal system of the horse. The competitive career of sport horses may be shortened as a consequence of tendon injuries, especially because full recovery is extremely difficult or impossible and in addition, they can be a cause of chronic pain. Although several medical and surgical treatments have been proposed over the past years, results have so far not been satisfactory. Nowadays, there is a growing interest in the use of stem cells for the recovery of injured tendons as an alternative to the traditional approach. Many papers report the treatment of equine tendinopathies with bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMDSC) which are identifiable by specific expression markers, and their healing is reported by histological, immuno-histochemical findings and clinical observations. Follow-up studies confirm the success of this treatment and the functional recovery of racehorses with injuries of the Superficial Digital Flexor Tendon (SDFT), following treatment with BMDSC. Furthermore, when comparing different approaches, a significant reduction in reinjury rates is reported when BMDSCs inoculation is performed as opposed to other traditional therapies.

Currently, even if Authors report the inoculation of a high number of cells, there is limited knowledge about the correlation between their number and the animal's healing capacity. However, in a recent paper it was ascertained that it is difficult to establish a significant difference between reinjury rate and amount of cells inoculated.

In addition, in the last decade, the presence of mesenchymal multilineage stem cells in adipose tissue has been widely documented, as well as the multipotency characteristic of the Adipose Mesenchymal Stem Cells (AMSC). Other Authors suggest that the adipose tissue could be a more suitable substrate in terms of isolation, expansion rate and number of cells available for the implant when compared to BMDSC because of the higher amount of stromal cells present. In 2008 Nixon et al. confirmed the potential of adipose-derived nucleated cell fractions in improving tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. However, despite the more frequent use of AMSC in USA, there are limited follow-up studies in the horse for the assessment of the efficacy of tendon injuries regenerative therapy when using these cells.

Relative to the monitoring of the recovery following stem cell implantation, ultrasound imaging has proved useful, especially from a qualitative point of view, because of the early detection of tendon fibres regeneration. However, clinical trials based on the use of ultrasound imaging for the evaluation of the efficacy of such approach have not so far been conducted with samples sufficiently large to make inference feasible.

Objective: The aim of this project is to assess, through a field study, the response of horses with damage of the Superficial Digital Flexor Tendon (SDFT), to a treatment based on the inoculation of autologous stem cells. The efficacy of the treatment was evaluated using the inter-rater agreement of judgements given by ultrasound imaging experts on scans taken in later stages of recovery.

Design: Treatment efficacy was evaluated using inter-rater agreement of judgements, for degree of echogenicity (TS) and percentage of fibres alignment (FAS) at site of lesion, given by four ultrasound imaging experts on scans taken in later stages of recovery after AMSCs inoculation.

Animals: The study included 15 horses recruited, between 2008 and 2009, following SDFT diagnosis at an equine hospital, in the course of routine clinical practice

Procedures: All patients were implanted with AMSCs surgically collected from the paracaudal region of each horse. The Randolph-kappa coefficient (k-value) was used for the intra- and inter-rater agreement evaluation beyond chance. The probability that a judgement of high degree of echogenicity and sizeable percentage of fibres observed was given to ultrasound scans taken at later

stages of recovery was measured using multivariate logistic regression. Clinical findings were also used for the evaluation of treatment efficacy.

Results: The intra-rater agreement resulted “good”, all k-values > 0.61, for both parameters, while the inter-rater agreement was “good” for TS (k-value=0.71), but “moderate” for FAS (k-value=0.58). The multivariate logistic regression demonstrated that scans judged as being at higher echogenicity showed 95 times greater chance of belonging to last recovery stage than the first, while for FAS, a 50 times greater chance was observed.

Conclusions and Clinical Relevance: Collection of the fat from paracaudal region has itself been demonstrated in being an easy and safe procedure in obtaining an appropriate sample for AMSCs culture. Any adverse reaction was observed after inoculation. This study has demonstrated the evaluation design to be objective and valid for the assessment of recovery of injured SDFT. The clinical results were apparently superior to the different treatments proposed during the last decades for SDF tendonopathies. The follow-up revealed a good functional recovery, in line with the morphological recovery of damaged tendons, with 71% and 75% recovery for race and performance horses, respectively.

MATERIALE E METODI

Isolamento di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è stato prelevato in zona caudale da animali reclutati al macello. Il grasso è stato sminuzzato e digerito con collagenasi I (0,075%) per 1 ora a 37°C. Al termine della digestione le cellule sono state risospese in α MEM contenente FCS 10% e seminate in fiaschette di plastica da 75 cm². Le cellule sono state fatte crescere incubando a 37°C al 5% di CO₂ ed osservate al microscopio ogni giorno. Quando le cellule in coltura raggiungono una confluenza dell'80% circa, sono state espanse: si effettua un lavaggio con PBS, al fine di allontanare il siero fetale e così da poter effettuare un distacco enzimatico mediante l'aggiunta di una soluzione di tripsina-EDTA (0,25%). L'interruzione dell'azione enzimatica della tripsina è stata effettuata mediante l'aggiunta di terreno di coltura addizionato del 10% di FCS e incubata alle condizioni di coltura suddette. I successivi passaggi sono stati effettuati con lo stesso procedimento; prima del raggiungimento del monostrato a confluenza del 75-80% sono stati effettuati cambi di terreno di coltura ogni 2 giorni.

La conta cellulare è stata effettuata, in tutti i casi, utilizzando un emocitometro (Camera di Burker) su un' aliquota di sospensione cellulare (15 μ L) diluita 1:1 con il colorante vitale Trypan Blue.

Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali

Questo tipo di studio è stato fatto all'inizio dell'attività solo su alcuni cavalli e con lo scopo di studiare le caratteristiche delle popolazioni cellulari isolate.

Efficienza di formazione delle colonie: calcolo della CFU-f

Per quantificare la formazione delle colonie (espressa come rapporto del numero di colonie ottenute e numero di cellule piastrate) di un determinato campione, dopo avere contato le cellule nucleate, 100 μ L di campione sono state piastrate in ciascuna capsula da coltura in α MEM addizionato di 10% FCS. Il mezzo è cambiato due volte alla settimana ed eliminato dopo 15 giorni. Quindi, le piastre sono lavate abbondantemente con PBS, e le colonie formatesi sono state fissate con una soluzione di formalina al 4% per 10 minuti. Dopo un ulteriore lavaggio con H₂O, le colonie sono state colorate con blu di metilene per 45'; le capsule sono state quindi abbondantemente lavate con acqua distillata. Infine, le colonie sono state contate.

Differenziamento di cellule staminali mesenchimali in vitro

Le potenzialità differenziative delle AMSC verso i *lineages*, osteogenico ed adipogenico sono state valutate al 2° e al 10° passaggio. Le cellule, dopo lavaggio con PBS, sono state sottoposte a tripsinizzazione e successiva centrifugazione a 800g per 10 minuti, distribuite in piastra da 24 pozzetti alla concentrazione di 3X10⁴ cellule/pozzetto e poste in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ per 24 ore al fine di ottenere l'adesione cellulare. Le colture sono state poi stimulate con l'appropriato mezzo di differenziamento secondo le seguenti condizioni:

a) differenziamento osteogenico:

le colture sono state stimulate per 2 settimane in α MEM contenente FCS 10% supplementato con acido ascorbico 50 μ g/mL, β -glicerofosfato 10mM, desametasone 10⁻⁷M.

b) differenziamento adipogenico:

le colture sono state stimulate per 2 settimane in α MEM contenente FCS 10% supplementato con desametasone 1 μ M, insulina 10 μ g/mL, indometacina 0,2mM e 3-isobutil-metil-xantina 0,5mM.

Valutazione del differenziamento

L'avvenuto differenziamento delle MSC *in vitro* è stato evidenziato mediante opportune colorazioni citochimiche:

a) differenziamento osteogenico:

La presenza di depositi di calcio è stata rilevata tramite la colorazione Alizarina Red S. E' stata eseguita anche la colorazione per la Fosfatasi Alcalina per mettere in evidenza questo marcatore precoce del differenziamento osteogenico. Per effettuare la colorazione Alizarin Red, le cellule sono state fissate per un'ora a temperatura ambiente in una soluzione di etanolo al 70%; successivamente sono state lavate con acqua grado laboratorio quindi ricoperte con una soluzione al 2% di Alizarin Red per 30 minuti. Dopo 4 lavaggi con acqua grado laboratorio, i depositi di calcio si colorano di arancione-rosso. Per questa colorazione citochimica, il campione cellulare è stato fissato per 10 minuti a temperatura ambiente con formalina 10%, incubato per 20 minuti con la soluzione acquosa contenente substrato naftolo-AS MX fosfato alla concentrazione di 0,1mg/mL in 0,5% N,Ndimetilformammide e MgCl 2mM, e diluito 200 volte con la soluzione di sale di diazonio Fast Blue BB alla concentrazione 0,6mg/mL in tampone TRIS/HCl 0,1M pH8,5.

b) differenziamento adipogenico:

I lipidi sono stati evidenziati tramite colorazione istologica con Oil Red. 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 grado laboratorio 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 grado laboratorio.

Differenziamento osteogenico di cellule staminali mesenchimali in vivo

La valutazione della capacità osteogenica *in vivo* delle AMSC è stata fatta presso il laboratori della struttura complessa Medicina Rigenerativa dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (Università degli Studi di Genova).

Le AMSC una volta raggiunta la confluenza sono state tripsinizzate e risospese in numero di $2,5 \times 10^5$ di cellule in 100 μ L di Tissucol, contenente il fibrinogeno ed il fattore XIII della coagulazione, e fatte adsorbire su cubetti (3mm³) di idrossiapatite. In seguito sono stati aggiunti 20 μ L di trombina per ottenere la formazione del coagulo di fibrina. Il biomateriale (idrossiapatite) contenente le cellule, così preparato, è stato poi impiantato sottocute in topi immunodepressi (topi nudi, ceppo Cd1 Nu/Nu) in grado di tollerare cellule provenienti da altre specie animali. I topi sono stati utilizzati tra la sesta e l'ottava settimana di vita. Essi sono stati allevati e mantenuti secondo le normative istituzionali. Prima dell'impianto, gli animali sono stati anestetizzati mediante iniezione di 100 μ L di xylazina/ketamina 1:1 (1mg/50mL e 3mg/50mL). Gli impianti sono quindi stati inseriti nello spazio sottocutaneo. Dopo otto settimane, gli animali sono stati sacrificati e gli impianti prelevati.

Valutazione del differenziamento

L'avvenuto differenziamento *in vivo* è stato evidenziato mediante analisi istochimica, utilizzando la colorazione ematossilina-eosina.

I campioni sono stati prima decalcificati, poi inclusi in paraffina ed infine tagliati al microtomo. La matrice ossea depositata e' stata evidenziata, mediante colorazione con ematossilina-eosina.

PREPARAZIONE DELL'INOCULO

Il tessuto adiposo prelevato è stato quindi posto in una provetta sterile da 50 mL contenente PBS addizionato con antibiotici (100 UI/mL penicillina, 100 µg/mL streptomina) e mantenuto in condizioni refrigerate per un tempo massimo di 48 ore durante il trasporto.

Una volta che il campione giunge in laboratorio, insieme alla scheda di accompagnamento, gli è stato attribuito un numero progressivo seguito dal nome del cavallo. Il campione è stato sottoposto immediatamente a digestione enzimatica al fine dell'isolamento ed alla crescita delle cellule staminali in esso presenti secondo i protocolli prima riportati.

Identificazione del campione I campioni pervenuti in laboratorio sono stati identificati assegnandovi un numero progressivo seguito dal nome dell'animale. È stata archiviata la scheda di accompagnamento compilata dal veterinario richiedente e tutte le notizie riguardanti il campione (compreso la segnalazione di eventuale rischio microbiologico). Tutti i dati sono stati riportati in un file (registro in formato excell) al fine di garantire completa tracciabilità del prodotto ed i dati relativi ad esso.

Controlli di qualità Il Laboratorio di adibito alla produzione di cellule staminali è mantenuto pulito e in ordine e non è accessibile a personale non autorizzato. E' separato dalle zone nelle quali si svolgono attività o procedure non inerenti al trattamento di cellule usate a scopo di terapia cellulare ed è dotato di spazi ed apparecchiature dedicate.

Pur operando in condizioni di sterilità, lavorando con le colture cellulari c'è sempre rischio di contaminazione da parte di batteri, funghi, micoplasmi e virus.

Le cellule staminali mesenchimali prima di essere inoculate nell'animale e/o prima di essere criopreservate sono state sottoposte ad esame microbiologico. In di contaminazione le cellule devono essere eliminate e viene richiesta la ripetizione del prelievo.

Almeno 5 giorni prima dell'impianto, è stato prelevato il terreno di coltura contenuto nella fiaschetta contenente le cellule staminali da inoculare e sottoposto ai seguenti test microbiologici:

Terreno	TEMPERATURA	TEMPO	ATMOSFERA
	Incubazione	(giorni)	CONTROLLATA
SB	32°C	3-5	AEROBIOSI
Agar Sangue	37°C	3-5	AEROBIOSI
Agar Sangue	37°C	3-5	ANAEROBIOSI
Agar Sangue	37°C	3-5	MICROAEROFILIA
BHI	37°C	3-5	AEROBIOSI
BHI	37°C	3-5	ANAEROBIOSI
BHI	37°C	3-5	MICROAEROFILIA
FREY BROTH	37°C	3-5	AEROBIOSI
FREY BROTH	37°C	3-5	ANAEROBIOSI
FREY BROTH	37°C	3-5	MICROAEROFILIA
FREY AGAR	37°C	3-5	AEROBIOSI
FREY AGAR	37°C	3-5	ANAEROBIOSI
FREY AGAR	37°C	3-5	MICROAEROFILIA
GC MEDIUM	37°C	3-5	AEROBIOSI
GC MEDIUM	37°C	3-5	ANAEROBIOSI
GC MEDIUM	37°C	3-5	MICROAEROFILIA

Per la ricerca dei micoplasmi viene effettuata sia una PCR direttamente dal sovranatante cellulare sia dopo arricchimento.

Preparazione dell'inoculo Il giorno prima o il giorno stesso dell'impianto, sono state prelevati circa 20 mL di sangue venoso con anticoagulante e è stato recapitato immediatamente in laboratorio a temperatura ambiente. Il sangue è stato centrifugato a 800 g per 15 minuti a 20°C per separare la fase superiore, costituita dal plasma ricco in piastrine, da quella sottostante rappresentata dalle cellule rosse sedimentate. Il plasma è stato prelevato in modo da aspirare anche l'interfaccia contenete le piastrine e nuovamente centrifugato a 1200 g per 10 minuti per far sedimentare le piastrine. Il sedimento è stato risospeso in circa 3 mL di plasma.

Le AMSC sono state raccolte, contate e risospese in plasma ricco di piastrine e mantenute in una siringa e quindi trasportate a temperatura refrigerata nella struttura dell'intervento. Le AMSC equine sono state inoculate 7-10 giorni circa dopo la raccolta del tessuto adiposo, in numero variabile di $0.5-3 \times 10^6$ cellule/mL.

Trasporto Sulle provette contenenti le cellule staminali risospese nel plasma ricco di piastrine sono state riportati il numero identificativo del campione, il nome dell'animale, il nome del proprietario, il volume, la data di consegna e l'acronimo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Roma (IZS-RM) come identificativo del centro di raccolta, produzione e fornitura di cellule staminali. Il tutto è stato consegnato direttamente al veterinario richiedente o ad un suo incaricato. Il trasporto delle provette contenenti le cellule staminali avveniva a temperatura refrigerata. L'inoculo di cellule staminali è stato effettuato entro 60 minuti dalla consegna.

Congelamento delle cellule staminali mesenchimali Da ogni soggetto sottoposto ad impianto sono state conservate tre criovials contenente 0,5 mL di sospensione cellulare. Il protocollo per il congelamento seguito è quello standard utilizzato per le altre linee cellulari. Dopo aver staccato le cellule con Tripsina-EDTA, esse sono state raccolte in una provetta e centrifugate, il pellet ottenuto è stato risospeso in 1,5 mL di FCS 90% + DMSO 10% ed aliquotato in tre criovials. Prima del passaggio in azoto liquido, le criovials sono state poste a -80°C per almeno 24 ore in appositi contenitori per la diminuzione controllata della temperatura (-1°C/min).

La conservazione delle cellule congelate viene effettuata adottando una procedura che consenta inequivocabilmente l'identificazione all'interno dei contenitori criogenici. I dati relativi al congelamento sono state riportati in una scheda. I dati indicati sono: Numero identificativo del campione, specie, nome animale, volume, concentrazione cellulare, numero del passaggio, numero di aliquote, numero e data congelamento, esiti del controllo di sterilità, dati relativi alla prova di congelamento, dati relativi alla prova di scongelamento, posizione nel contenitore di azoto liquido.

STUDIO CLINICO RETROSPETTIVO PER LA VERIFICA DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO DELLE TENDINOPATIE DEL CAVALLO MEDIANTE IMPIANTO DI CELLULE STAMINALI OMOLOGHE DERIVATE DAL GRASSO

Selezione dei casi. Lo studio clinico è stato condotto su oltre 120 cavalli affetti da tendino/desmopatie di recente manifestazione o riacutizzazione di casi cronici. Ai fini delle valutazioni comparative, fra i casi trattati, sono stati selezionati 17 soggetti con tipologia e localizzazione delle lesioni tendinee assimilabili su cui sono stati effettuati esami ecografici di controllo a 30, 60 e 120 gg. dalla data d'impianto per la valutazione del grado di riempimento delle lesioni e dell'allineamento delle fibre tendinee di nuova generazione. I 17 cavalli arruolati avevano una diagnosi di tendinopatia caratterizzata dalla rottura parziale delle fibre del tendine flessore superficiale delle falangi, effettuata presso la Clinica Veterinaria Equine Practice, Campagnano di Roma tra il 2008 ed il 2009. Le AMSC sono state ottenute da grasso sottocutaneo

prelevato in zona caudale, estratte, isolate ed espanse in coltura come descritto in precedenza. Le colture, raccolte e risospese in ragione minima di n° 500.000/ml cellule nel plasma degli stessi soggetti, sono state quindi introdotte nelle rispettive sedi di lesione mediante inoculazione ecoguidata.

Diagnostica per immagini (ecografia). I cavalli selezionati sono stati sottoposti a diagnosi ecografica delle lesioni allo stadio A (pre-inoculo), nonché dopo 60 giorni (tempo stadio B post-inoculo) ed a 120 giorni (stadio C post-inoculo). L'inoculo di cellule staminali è avvenuto mediamente 7-10 giorni dopo il rilievo delle immagini al tempo A.

Il circuito per la valutazione del recupero anatomico. La verifica oggettiva del recupero anatomico post-inoculo delle lesioni è stata condotta attraverso la valutazione della concordanza dei giudizi espressi da 4 medici veterinari di riconosciuta esperienza internazionale nella diagnostica per immagini dell'apparato muscolo-scheletrico del cavallo.

A tale scopo, è stato allestito un panel di 51 immagini costituito dalle ecografie originali condotte al tempo A, B e C su ognuno dei 17 cavalli arruolati. Ad ogni esperto, sono quindi state inviate per via postale 3 repliche dello stesso panel (51 x 3 = 153 immagini) su supporto digitale (DVD). Ogni immagine è stata codificata univocamente per la lettura in cieco da parte degli esperti. Per ciascuna di esse, il singolo esperto ha espresso due tipi di valutazione, una qualitativa in base al grado di ecogenicità dell'immagine (completely anechoic, mostly anechoic, hypoechoic, isoechoic) ed una quantitativa, in base alla percentuale di fibre osservate (0-25%, 26-50%, 51-75% 76%-100%).

Analisi dei dati. Ai fini delle analisi le 4 categorie di giudizio relative all'ecogenicità ed alla % di fibre sono state ridotte a variabile dicotomica alta/bassa ecogenicità; alta/bassa % di fibre). Mediante la statistica Kappa di Randolf, è stata condotta una valutazione della ripetibilità e della riproducibilità dei giudizi espressi rispettivamente dal singolo esperto e dall'insieme dei 4 esperti, per ciascuna immagine. E' stato quindi possibile valutare il grado di accordo intra ed inter-esperto, depurato dall'effetto del caso. Con la medesima statistica sono state calcolate la ripetibilità e la riproducibilità dei giudizi in relazione allo stadio della lesione (A, B, C). Per la valutazione del valore restituito dalla statistica Kappa è stata utilizzata la scala di valutazione proposta da Landis e Kock, ponendo valori > 0,61 come soddisfacenti.

Al fine di verificare l'oggettivo recupero anatomico delle lesioni a distanza dall'inoculo è stata utilizzata una regressione logistica multivariata considerando come variabili di outcome il livello di ecogenicità (alta/bassa) e la percentuale di fibre (alta/bassa) ponendo lo stadio della lesione, (A,B,C), l'esperto (1,2,4,5) e la replica (1°,2°,3°) come variabili indipendenti (Explanatory variables).

Per la descrizione dettagliata relativa allo studio longitudinale si rimanda all'allegato 1

RISULTATI

Isolamento di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo

Le cellule isolate, da tutti i 120 campioni di tessuto adiposo trattati, mostrano la capacità di aderire al substrato plastico e presentano la classica morfologia allungata fibroblastoide delle MSC; si osservano, infatti, cellule fusiformi e stellate. A 24 ore dall'isolamento il terreno di coltura è popolato da una popolazione mista di cellule non adese che sono state eliminate al primo cambio di terreno; nella prima fase di crescita si osserva, quindi, una progressiva perdita di elementi non staminali ed una selezione delle cellule staminali mesenchimali. Gli elementi cellulari adesi presentano la capacità di dar luogo a cloni, visibili, cioè a popolazioni omogenee di cellule generate da un'unica capostipite, caratteristica definita clonogenicità, tipica delle cellule staminali.

Il monostrato cellulare isolato tende ad apparire progressivamente più omogeneo e presenta la capacità di moltiplicarsi in modo rapido ed intenso. L'intenso proliferare e la capacità di persistere *in vitro* per tempi superiori a quelli di una comune coltura di cellule differenziate, sono caratteristiche attribuibili alle cellule staminali. In nessun campione si sono sviluppate contaminazioni di muffe o batteri.

L'amplificazione *in vitro* delle cellule isolate dai 120 campioni di tessuto adiposo reclutati, ha fornito già dal primo passaggio popolazioni cellulari con una morfologia decisamente più omogenea di quella ottenuta dopo l'isolamento.

Differenziamento di cellule staminali mesenchimali in vitro

Le AMSC equine sono state analizzate per la loro capacità di andare incontro a differenziamento osteogenico e adipogenico al 2° e al 10° passaggio in coltura, dopo appropriata stimolazione, secondo le metodiche già descritte.

Differenziamento osteogenico

Nel *differenziamento osteogenico* è stato osservata una rapida mineralizzazione della matrice con formazione di noduli ossei, che appaiono di colore rosso con la colorazione Alizarin Red, associati ad un accumulo di cellule fibroblastoidi in stretto contatto l'una con l'altra. Durante la coltura, si osservano cambiamenti dal punto di vista morfologico delle cellule, che si orientano a formare noduli. L'attività della Fosfatasi alcalina, marcatore del differenziamento osteoblastico, è risulta significativamente maggiore nelle AMSC coltivate con mezzo di differenziamento osteogenico, rispetto alle colture di AMSC coltivate con mezzo standard.

Per quanto riguarda il differenziamento osteogenico, si è osservato che all'aumentare del numero di passaggi della coltura sembra esserci un aumento del potenziale differenziativo. La colorazione Alizarin red per i depositi di calcio risulta più intensa al 10° passaggio in coltura rispetto al 2°; questo risultato è confermato anche dal progressivo aumento, con l'aumentare dei passaggi in coltura, dell'attività della Fosfatasi Alcalina, dimostrando la progressiva differenziazione in senso osteoblastico.

Differenziamento adipogenico

Nel *differenziamento adipogenico* sono state osservate cellule rotondeggianti che presentavano nel citoplasma vescicole lipidiche positive alla colorazione con Oil Red O. I vacuoli lipidici sono state colorati in rosso. Nelle colture di controllo, coltivate in terreno di coltura standard, le cellule hanno mantenuto morfologia fibroblastoide, risultando negative alla stessa colorazione.

Differenziamento osteogenico di cellule staminali mesenchimali in vivo

La capacità di differenziare *in vivo* verso la linea osteogenica è stata evidenziata impiantando, in topi nudi le AMSC associate ad un biomateriale quale l'idrossiapatite. In tale impianto le AMSC danno origine a tessuto osseo grazie all'invasione dell'impianto da parte dei vasi sanguigni

dell'ospite. Già dopo otto settimane è evidente la formazione ectopica di osso, nelle sezioni ottenute dall'impianto prelevato e colorate con ematossilina-eosina. La formazione di osso era evidente in tutti gli scaffold di idrossiapatite campioni caricati con AMSC.

STUDIO CLINICO RETROSPETTIVO PER LA VERIFICA DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO DELLE TENDINOPATIE DEL CAVALLO MEDIANTE IMPIANTO DI CELLULE STAMINALI OMOLOGHE DERIVATE DAL GRASSO

Le valutazioni espresse dai 4 esperti sottolineano una propensione ad attribuire giudizi di maggiore ecogenicità e di maggiore percentuale di fibre alle immagini ecografiche eseguite a 60 giorni (stadio B) e 120 giorni (stadio C) post-inoculo rispetto alle immagini relative allo stadio A (tempo 0 pre-inoculo) (Figura 1 - esempio per ecogenicità). I giudizi espressi da ogni singolo esperto, sia qualitativo che quantitativo, per le 3 repliche della stessa immagine sono risultati ripetibili (K di Randolph > 0,61). I 4 esperti, si sono inoltre dimostrati coerenti tra loro nell'esprimere lo stesso giudizio per la stessa immagine, dimostrando elevata riproducibilità delle valutazioni espresse (K di Randolph > 0,61). Ogni esperto è risultato coerente con se stesso nell'esprimere lo stesso giudizio in funzione dello stadio (A, B e C) al quale appartenevano le immagini (tabelle 2 e 3). La riproducibilità viene mantenuta per le immagini di stadio B e C mentre è risultata inferiore (moderata) per le Immagini di stadio A (tabella 4). La regressione logistica ha confermato probabilità significativamente maggiori che immagini di stadio B e C venissero valutate ad alta ecogenicità ed alta % di fibre rispetto alle immagini relative allo stadio A della lesione. In particolare le immagini di stadio C hanno mostrato una probabilità 95 volte maggiore di essere classificate ad elevata ecogenicità (O.R. 95,8; 41,8 < O.R. <219,5) e 50 volte maggiore di essere classificate ad alta % di fibre rispetto alle immagini di stadio A (O.R. 49,5; 26,3 < O.R. <93,1). L'analisi multivariata ha escluso qualsiasi effetto dell'esperto o della replica sull'outcome osservato (Tabelle 5 e 6).

Per il dettaglio relativo ai risultati dello studio longitudinale si rimanda all'allegato 1

Tabella 1. Distribuzione dei giudizi espressi dagli esperti sul grado di ecogenicità per stadio dell'immagine (51 immagini per stadio per ogni esperto)

Stadio dell'immagine	esperto1		esperto 2		esperto 4		esperto 5	
	bassa	alta	bassa	alta	bassa	alta	bassa	alta
A (t. 0)	41	10	34	17	42	9	38	13
B (t+60gg)	8	43	7	44	8	43	10	41
C (t+120 gg)	0	51	2	49	5	46	0	51
Totale	49	104	43	110	55	98	48	105

Tabella 2. Ripetibilità (Valori statistica K di Randolph) dei giudizi espressi sul grado di ecogenicità per stadio dell'immagine ecografica (N=51x3 osservazioni / esperto)

Referee	Stadio A (t=0)	Stadio B (t+60gg)	Stadio C (t+120 gg)
Esperto 1	0,92	0,92	1
Esperto 2	0,76	0,76	0,92
Esperto 4	0,69	0,84	0,76
Esperto 5	0,88	0,84	1

Tabella 3. Ripetibilità (Valori statistica K di Randolph) dei giudizi espressi sulla % di fibre iper per stadio dell'immagine ecografica (N=51x3 osservazioni /esperto)

Referee	Stadio A (t=0)	Stadio B (t+60gg)	Stadio C (t+120 gg)
Esperto 1	0,92	0,92	1
Esperto 2	0,84	0,69	0,69
Esperto 4	0,69	0,84	0,76
Esperto 5	0,84	0,84	0,92

Tabella 4. Riproducibilità (K di Randolph) dei giudizi espressi per stadio dell'immagine ecografica (N=51x3 osservazioni /esperto)

Tipo valutazione	Stadio A (t=0)	Stadio B (t+60gg)	Stadio C (t+120 gg)
Grado di ecogenicità	0,44	0,81	0,88
% di fibre osservate	0,42	0,64	0,84

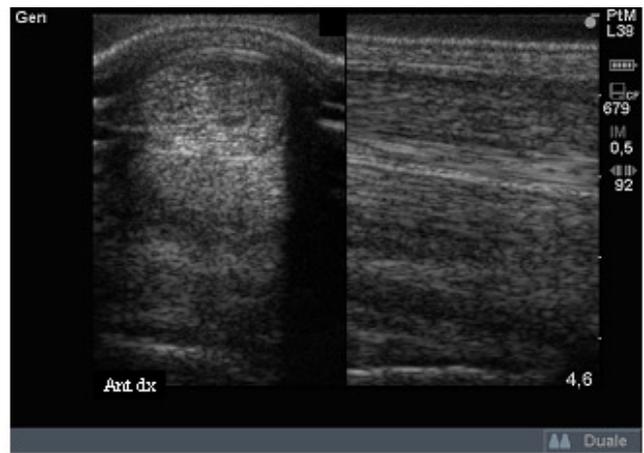
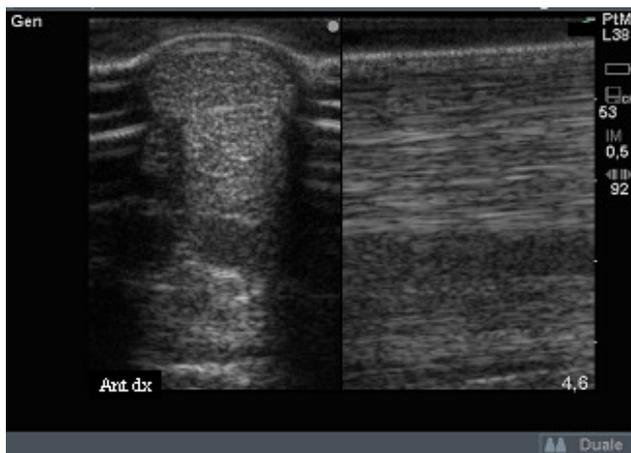
Tabella 5. Regressione Logistica – grado di ecogenicità (alta vs bassa)

<i>Stadio</i>	OR	SE	Z	P> z 	[95% IC]	
stadio A baseline	1	-	-	-	-	-
stadio B	17.423	44.789	11.12	0.000	10.527	28.836
stadio C	95.846	405.306	0,4715	0.000	41.843	219.545

Tabella 6. Regressione Logistica – % di fibre (alta vs bassa)

<i>Stadio</i>	OR	SE	Z	P> z 	[95% IC]	
stadio A baseline	1	-	-	-	-	-
stadio B	19.722	52.534	11.19	0.000	11.700	33.242
stadio C	49.461	155.451	0,5063	0.000	26.284	93.075

Figura 1 – esempi di ecogenicità



A

B

C

D

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Per la discussione integrale e le conclusioni relative allo studio longitudinale si rimanda all'allegato 1

In base ai risultati descritti, lo studio è stato in grado di dimostrare, in condizioni di campo ed attraverso un circuito di valutazione indipendente basato sulla diagnostica per immagini, il recupero anatomico di lesioni del tendine flessore superficiale delle falangi del cavallo in seguito all'intervento di inoculo di cellule staminali.

Anche se i giudizi espressi dai singoli esperti sulle stesse immagini ecografiche possa risultare influenzata dalla soggettività, nonché dipendere dalla strumentazione utilizzata per la visualizzazione delle immagini su schermi PC diversi, le analisi condotte hanno consentito di accertare la ripetibilità e la riproducibilità di tali giudizi.

Inoltre, sebbene non sia stato reclutato un gruppo di cavalli omogeneo per età, sesso e razza, nel complesso è risultata una chiara associazione tra ecografie effettuate a 60 e 120 giorni post inoculo e l'elevata ecogenicità e % di fibre, ad ulteriore supporto del successo della terapia adottata.

La procedura di prelievo del grasso dalla regione paracaudale si è dimostrata semplice, sicura ed in grado di fornire una quantità appropriata di cellule staminali mesenchimali.

Successivamente al reimpianto non è stata osservata nessuna reazione secondaria.

Questo progetto ha dimostrato che il disegno di valutazione risulta valido ai fini della valutazione della ricostituzione di tessuto tendineo in caso di rottura del tendine flessore superficiale digitale.

I risultati clinici appaiono migliori rispetto ai trattamenti tradizionali proposti negli ultimi decenni. Il follow up condotto sui 17 cavalli arruolati ai fini delle valutazioni, ha dimostrato infatti una buona guarigione funzionale, in linea con la guarigione morfologica dei tendini danneggiati, con il ritorno a competere del 71% e del 75% rispettivamente per i cavalli da corsa e dei cavalli da competizione (sport equestri).

Per la discussione integrale e le conclusioni relative allo studio longitudinale si rimanda all'allegato 1

BIBLIOGRAFIA

1. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, et al. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* 2009;22:10-29.
2. Schnabel LV, Lynch ME, van der Meulen MC, et al. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2009;27:1392-1398.
3. Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, et al. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Vet Med Int* 2010; 2010:250978.
4. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, et al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue En.* 2007;13:2949-2955.
5. Smith RK. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil* 2008;30:1752-1758.
6. Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, et al. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* 2011;26:1-9.
7. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-228.
8. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:1922-1931.
9. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:199-209.
10. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ. Res* 2004;94:223-229.
11. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109:656-653.
12. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:371-379.
13. Kisiday JD, Kopesky PW, Evans CH, et al. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose – derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J of Orthop Res* 2008;322-331.
14. Helder M, Knippenberg M, Klein-Nulend J, et al. Stem cells from adipose tissue challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng* 2007;13:1799-1808.
15. Nakagami H, Morishita R, Maeda K. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 2006;13:77-81.
16. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, et al. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis . *Am J Vet Res* 69:928–937.

17. Chong AK, Chang J, Go JC. Mesenchymal stem cells and tendon healing. *Front Biosci* 2009;1:4598-4605.
18. Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, et al. Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol* 2007;25:409-416.
19. Yingling GL, Nobert KM. Regulatory considerations related to stem cell treatment in horses. *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:1657-1661.
20. Norbert KM. The regulation of veterinary regenerative medicine and the potential impact of such regulation on clinicians and firms commercializing these treatments. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2001;27:383-391.
21. Del Bue M, Riccò S, Ramoni R, et al. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet Res Commun* 2008;32:S51-S55.
22. Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Monitoring the fate of autologous and allogenic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J* 2008;40:178-181.
23. Amaddeo D, Canononici F, Barbaro K, et al. Fat derived stem cells platelet gel associated in arthroscopy treatment of a subchondral cyst of the medial femoral condyle of a horse, in *Proceedings. 14th SIVE/FEEVA CONGRESS 2008*;353-354.
24. Cohen, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol Meas.* 1960;20:37-46.
25. Cohen J. Weighted kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled dis-agreement or partial credit. *Psychol Bull* 1968;70:213-220.
26. Fleiss JL, Levin B, Paik MC. The measurement of interrater agreement. In *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2003;18:598-626.
27. Randolph JJ. Free-marginal multi-rater kappa: An alternative to Fleiss's fixed-marginal multi-rater kappa, in *Proceedings. Joensuu University Learning and Instruction Symposium, Joensuu, Finland, 2005*;14-15.
28. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-174.
29. Stata ® user's guide. StataCorp 2012; vol.1 pag.47
30. Smith RK. Results of treatment of bone marrow derived mesenchymal stem cell therapy, in *Proceedings. 3rd World Veterinary Orthopaedic Congress, Bologna, 2010*.
31. Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J* 2004;36:415-419. comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* , 36, 415-419.

MODALITA' DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI

I risultati della ricerca sono stati resi disponibili alla comunità scientifica attraverso la realizzazione di 5 presentazioni nel corso di convegni/eventi formativi a carattere nazionale ed internazionale che sono di seguito riportati in elenco diretti sia da laboratoristi coinvolti nell'attività di ricerca nel settore della terapia rigenerativa sia da veterinari ippisti specialisti chirurgici ed ortopedici. L' articolo in esteso dei risultati del progetto (Allegato 1) è in corso di valutazione per la pubblicazione dal Journal of the American Veterinary Medical Association.

La pubblicazione di metodi standardizzati di isolamento e coltivazione delle cellule staminali mesenchimali derivate da grasso, nonché dei protocolli terapeutici, sono stati quindi utilmente adottati da altri operatori di laboratorio e clinici ed hanno contribuito a ridurre l'estemporaneità e l'empirismo che ha spesso caratterizzato numerosi tentativi di approccio nella pratica veterinaria di campo.

Inoltre, presso l'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana, i metodi, sono stati utilmente adattati per la cura di tendino/desmopatie di altre specie animali da compagnia e da reddito, nonché, a partire da differenti matrici, per la terapia rigenerativa ossea, corneale e cartilaginea, costituendo un modello applicativo anche per gli studi e la terapia con cellule staminali autologhe in medicina umana.

- FAT DERIVED STEM CELLS PLATELET GEL ASSOCIATED IN ARTHROSCOPY TREATMENT OF A SUBCHONDRAL CYST OF THE MEDIAL FEMORAL CONDYLE OF A HORSE Amaddeo D., Canonici F., Barbaro K., Serata V., Bonini P., Scholl F., Autorino G.L. Proceedings Veterinary European Equine Meeting of the Year 2008 pag. 353-354, XIV SIVE/FEEVA CONGRESS, Lido di Venezia, January, 25th – 27th 2008. (presentazione orale)
- CELLULE STAMINALI DA GRASSO DI EQUINO: LORO APPLICAZIONE NELLA RIGENERAZIONE OSSEA Barbaro K., Autorino G.L., Bonini P., Gentili C., Cancedda R., Scholl F., Canonici F., Amaddeo D. Atti X Convegno nazionale Società Italiana Diagnostici di Laboratorio Veterinari, Alghero 22-24 Ottobre 2008, pag. 95-96 (presentazione orale)
- STUDIO CLINICO RETROSPETTIVO PER LA VERIFICA DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO DELLE TENDINOPATIE DEL CAVALLO MEDIANTE IMPIANTO DI CELLULE STAMINALI OMOLOGHE DERIVATE DAL GRASSO Sala M., Canonici F., Barbaro K., Bonini P., Caminiti A., Spalluci V., Aquilini E., Amaddeo D. 1, Autorino G.L.. Atti XII Convegno nazionale Società Italiana Diagnostici di Laboratorio Veterinari Genova, 27-29 Ottobre 2010 (presentazione orale)
- STUDIO RETROSPETTIVO SULL'USO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI GRASSO DERIVATE NEL TRATTAMENTO DELLA TENDINOPATIA DEL FLESSORE SUPERFICIALE DEL CAVALLO ATLETA. Canonici F., Sala M., Barbaro K., Bonini P., Caminiti A., Spalluci V., Aquilini E., Amaddeo D., Autorino G.L.. Congresso Nazionale Società Italiana Veterinari per Equini, Montesilvano, 2011.

- SUPERFICIAL DIGITAL FLEXOR TENDINITIS IN THE ATHLETIC HORSE: HOW TO MANAGE IT. 12th World Congress World Equine Veterinary Association, Hyderabad, India 2011.
- A CLINICAL STUDY FOR THE ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF TREATMENT OF INJURIES OF SUPERFICIAL DIGITAL FLEXOR TENDON BY THE INOCULATION OF AUTOLOGOUS EQUINE ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN HORSES Marcello G. Sala (DMV), Fernando Canonici (DMV), Katia Barbaro (BSc), Pamela Bonini (MSC), Antonino Caminiti (DMV), Valentina Spallucci (MSC), Elisabetta Aquilini (MSC), Alessia Zepparoni (MSC), Demetrio Amadeo (BSc), Gian L. Autorino (DMV). Article Submitted for publication to Journal of the American Veterinary Medical Association.