

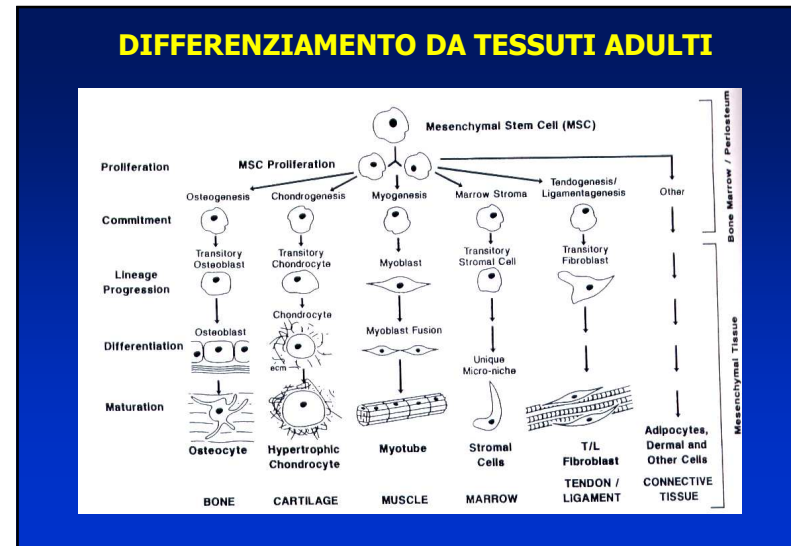
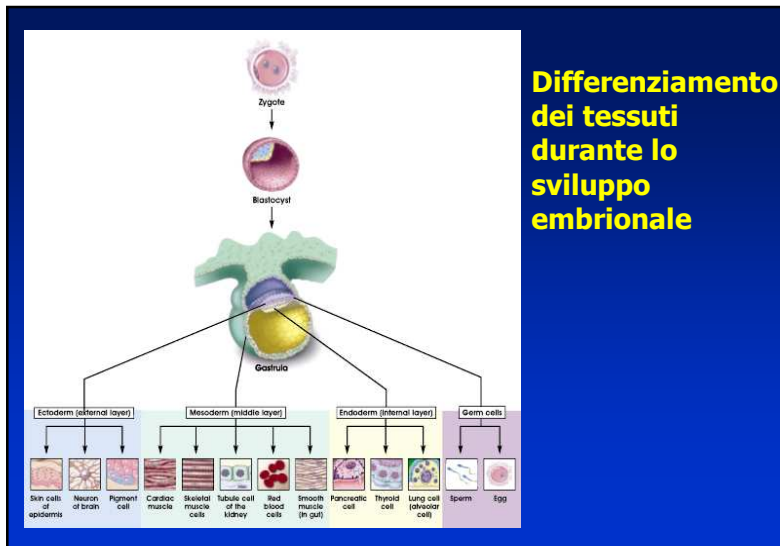
## ***CELLULE STAMINALI E POTENZIALITA' TERAPEUTICHE***

*Katia Barbaro*

## **DIFFERENZIAMENTO CELLULARE**

Gli organismi multicellulari sono costituiti da distinti tipi cellulari specializzati in determinate funzioni e con caratteristiche generalmente stabili nel tempo (alcune eccezioni sono note come transdifferenziamento)

Il processo che porta alla generazione di questi tipi cellulari specializzati va sotto il nome di *differenziamento cellulare*



## **DIFFERENZIAMENTO**



**OSSO  
CARTILAGINE  
TESSUTO ADIPOSO  
MUSCOLO**

## **CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ISOLATE DA TESSUTO ADIPOSO**

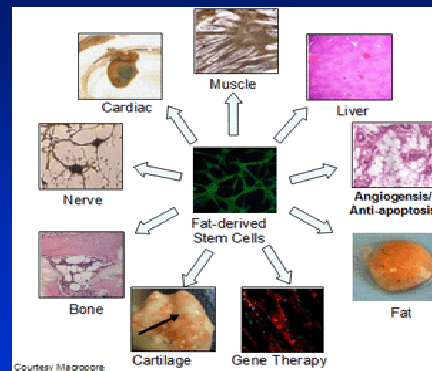
Le cellule staminali mesenchimali sono state isolate anche dal tessuto adiposo e sono in grado di differenziare *in vitro* al pari di quelle da midollo osseo.

- Vantaggi:
  - facilità di isolamento
  - rapidità di replicazione
  - multipotenzialità
  - numero di cellule presenti fino a 50 volte superiore



AMSC possono costituire un substrato alternativo a quelle del midollo osseo

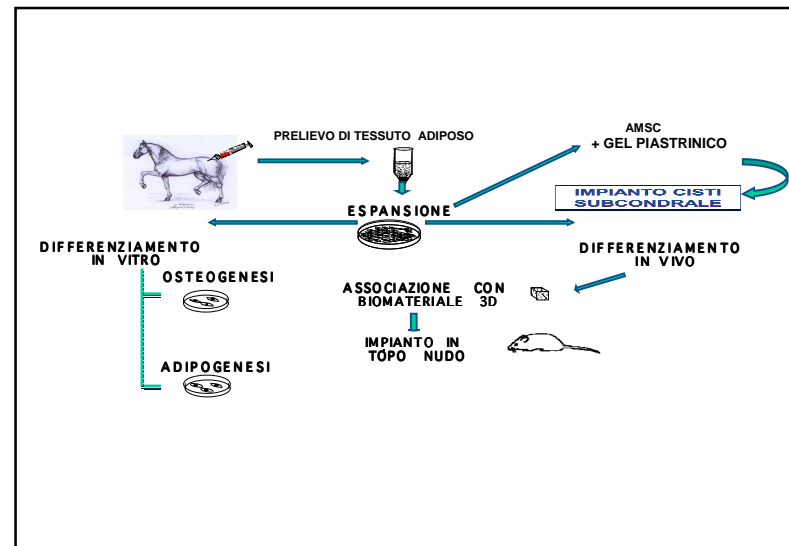
### Scelta del substrato ai fini dell'isolamento



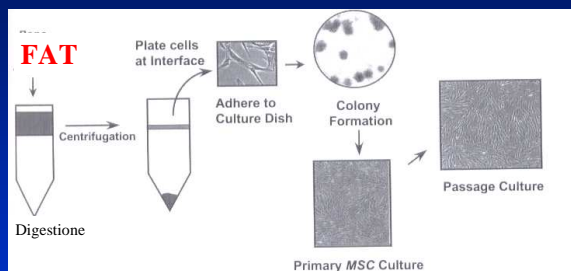
### Scopo del lavoro:

- confermare il differenziamento multi-*lineage* delle CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI EQUINE isolate da TESSUTO ADIPOSO
- definizione di un protocollo standard per il loro impiego terapeutico nel trattamento della cisti subcondrale del condilo femorale mediale del cavallo

## SCHEMA LAVORO SPERIMENTALE

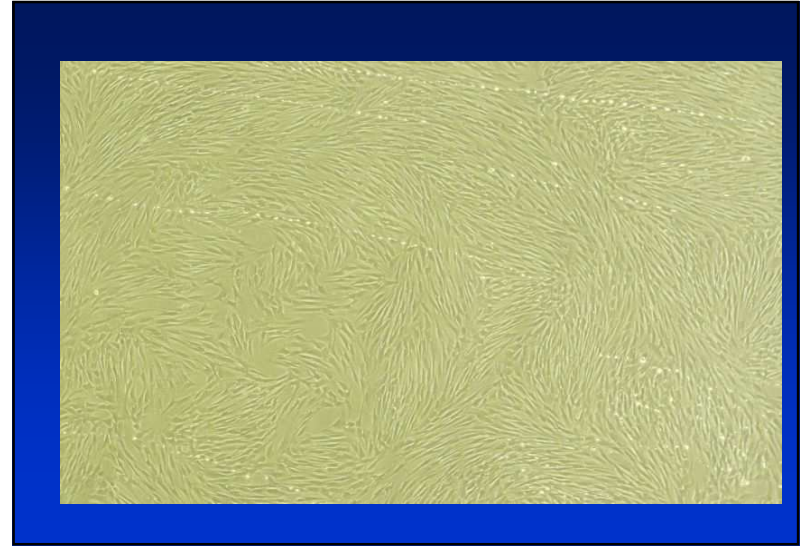
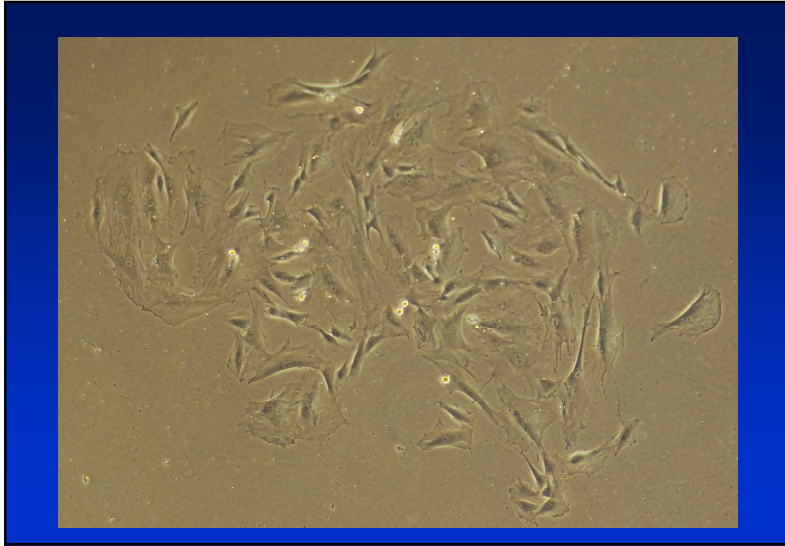


## ISOLAMENTO

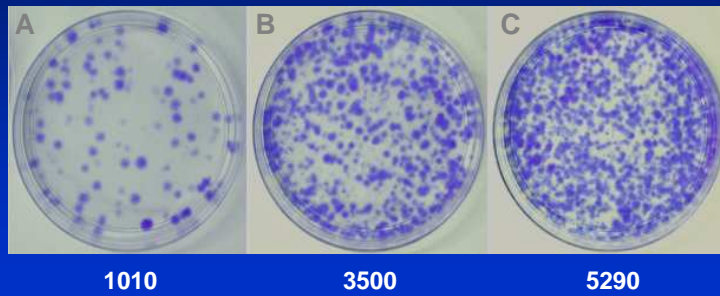


## Popolazioni di cellule presenti nel tessuto adiposo

- cellule staminali mesenchimali
- cellule progenitrici endoteliali
- periciti
- cellule immunitarie
- fibroblasti



**CFU-f/mL**



**DIFFERENZIAMENTO DELLE  
AMSC**



## DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO IN CULTURA BIDIMENSIONALE

Le cellule sono state enzimaticamente staccate e distribuite in pozzetti di piastra da 24 alla concentrazione di 30000 cellule/pozzetto.

Le colture sono state stimulate per 2 settimane in mezzo standard supplementato con:

- acido ascorbico 50µg/mL,
- β-glicerofosfato 10mM,
- desametasone 10<sup>-7</sup>M.

### COLORAZIONI:

Alizarina Red S  
Fosfatasi Alcalina



## DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO IN CULTURA BIDIMENSIONALE

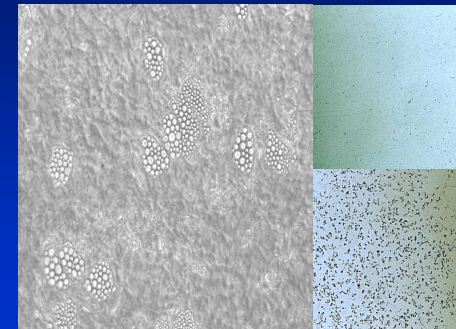
Le cellule sono state enzimaticamente staccate e distribuite in pozzetti di piastra da 24 alla concentrazione di 30000 cellule/pozzetto.

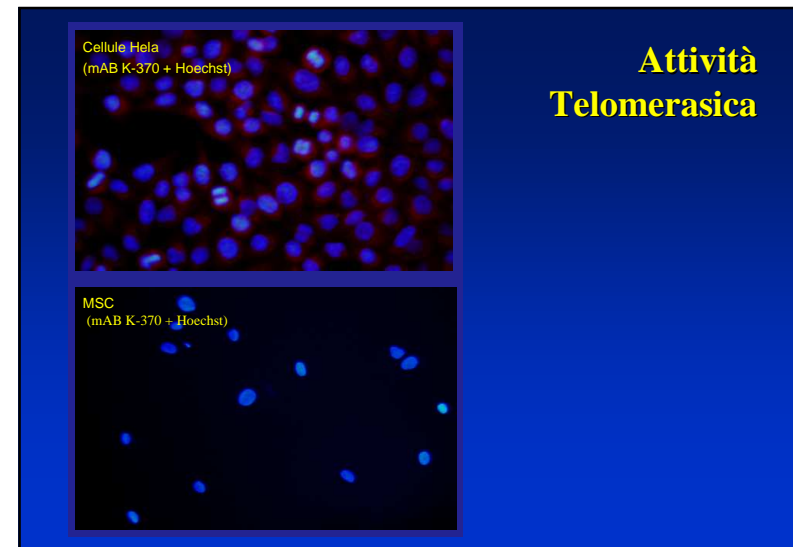
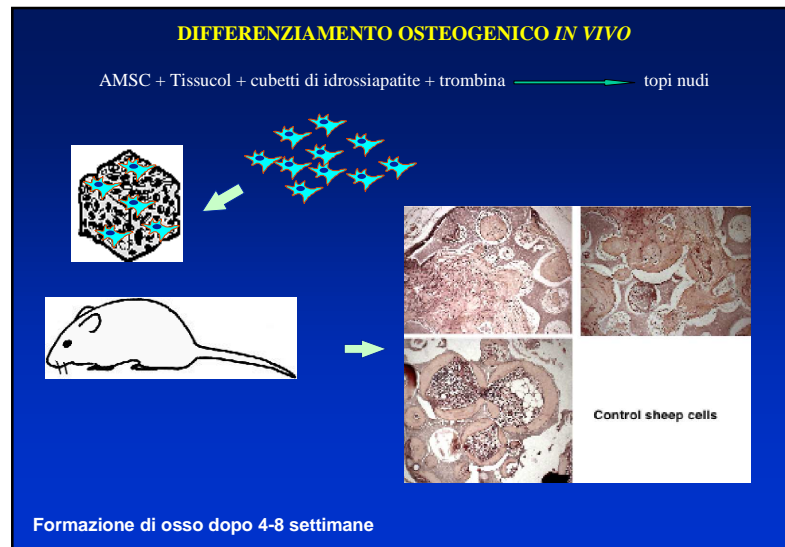
le colture sono state stimulate per 2 settimane in mezzo standard supplementato con:

- desametasone 1mM,
- insulina 10mg/mL,
- indometacina 0,2mM
- 3-isobutil-metil-xantina 0,5mM.

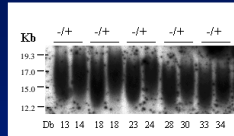
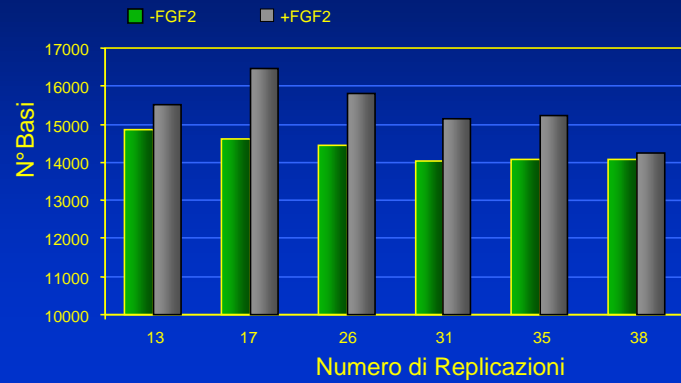
### COLORAZIONI:

Oil Red  
Sudan Black

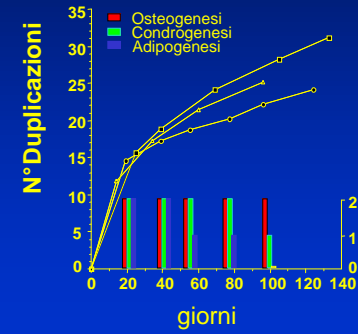




## Lunghezza dei Telomeri



## Potenziale Differenziativo



## TESSUTO OSSEO

### TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un **tessuto connettivo**.

E' formato da:

- osteoblasti (generano la matrice ossea)
- osteociti (attività metabolica)
- osteoclasti (degenerano la matrice ossea)
- cellule di rivestimento
- matrice extracellulare

La particolarità del tessuto osseo risiede proprio nella **matrice** la quale è mineralizzata o calcificata.

La **mineralizzazione** della matrice fa sì che il tessuto osseo sia il tessuto in assoluto più duro capace di resistere a forze di trazione e di compressione di circa 10Kg/mm<sup>2</sup>.

Le AMSC sono in grado di  
riparare grandi lesioni ossee?

Cisti Subcondrale del Condilo Femorale  
mediale

## CAUSE

- Osteocondrosi (Bramlage LR 1993)
- Trauma (Ray et al. 1996)
- Biochimico (von Rechemberg et al 2000)

## SINTOMATOLOGIA

- Cavalli giovani sotto i 4 anni (Howard RD et al. 1995)
- Zoppia media gravità ma anche severa nei casi acuti
- Più evidente in volta
- Lieve distensione della femoro-tibiale mediale
- Sintomi locali subdoli

## DIAGNOSI

- Anestesia intrarticolare
- RX
- Scintigrafia

## TERAPIA

- Conservativa: in box o paddock con o senza FANS o corticosteroidi
- Artroscopia: enucleazione e debridement
- Bone graft: non efficace (Jackson WA et al. 2000)
- Forage subcondrale controindicato (Howard RD et al. 1995)
- Iniezione intracistica di triancinolone acetone

## PROGNOSI

- Terapia conservativa: 50%
- Artroscopia: 70%
- Iniezione IL di triamcinolone acetone: 77%
- Iniezione IL di TA per via artroscopica: 60% successo; 80% miglioramento

## CASO CLINICO

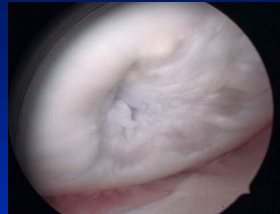
- PSI di 3 anni
- Operato da yearling per enucleazione della cisti femore destro
- 8 mesi di riposo e ripresa del training
- Ripresentata zoppia dopo un breve periodo di training
- Zoppia severa in fase acuta 4/5.
- Miglioramento consistente con anestesia femoro tibiale-mediale





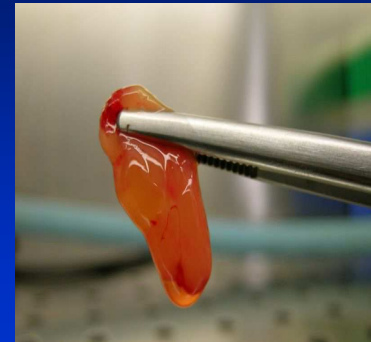
## CASO CLINICO

- Risottoposto ad artroscopia a 12 m. circa dopo il 1° intervento
- Currettaggio della cavità cistica
- Riposo per 8 mesi
- Nessun miglioramento radiografico
- Recidiva della zoppia dopo breve periodo di training

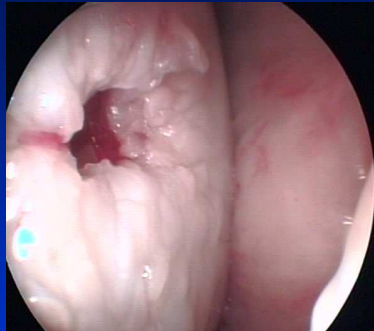


## Preparazione del gel piastrinico per l'impianto delle cellule staminali

- Preparazione del plasma autologo arricchito di piastrine (PRP) - (3-4 volte il valore basale)
- Sospensione delle cellule staminali (4.800.000) nel PRP (20mL)
- Coagulazione del plasma in forma di gel mediante addizionalmento di calcio cloruro



- Impianto in artroscopica con distensione gassosa di cellule staminali derivate da grasso in gel piastrinico a circa 12 mesi dall'intervento precedente

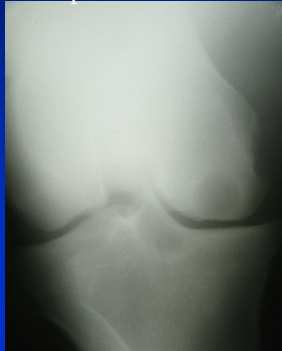


## Case Report

- Miglioramento radiografico già dopo 40 gg.: riduzione della cavità cistica ed ispessimento placca subcondrale
- 2 mesi riposo in box e 3 mesi in paddock
- Ripresa del training dopo 5 mesi
- Ulteriore riduzione della cavità cistica ed aumento della placca subcondrale
- Risoluzione della zoppia

## Evoluzione radiografica

Preoperatorio

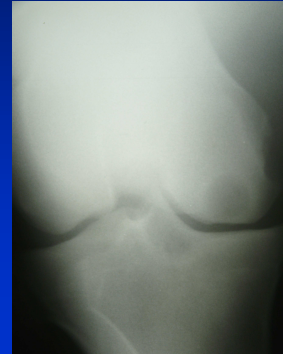


Postoperatorio 3 m.

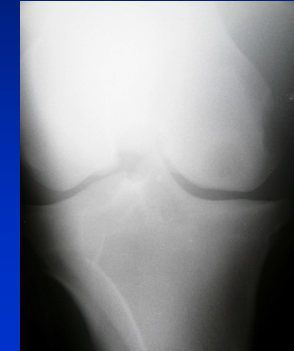


## Evoluzione radiografica

Preoperatorio



Postoperatorio 5 m.



## Evoluzione radiografica

Preoperatorio



Postoperatorio 10 m.



## Conclusioni

- Tecnica di prelievo agevole
- Tessuto contenente maggiori concentrazioni di cellule staminali rispetto ad altri
- Minore eterogeneità in termini di popolazioni cellulari presenti
- Potenzialità delle staminali derivate da grasso a differenziare in osteociti e condrociti

## Conclusioni

Possibilità di utilizzo nei casi resistenti a:

- Terapia conservativa
- Iniezione di triancinolone per via artroscopica → percentuale alta di successo con breve convalescenza
- Artroscopia ed enucleazione della ciste

## Conclusioni

- Tecnicamente non difficile
- Laboratorio adeguato per procedure biotecnologiche
- Mezzo di distensione gassoso (CO<sub>2</sub>)
- Costi
- Operatore mediamente esperto

## TISSUE ENGINEERING: NEW APPROACH

