



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Formazione interdisciplinare su attività di sanità animale presso le strutture di Biotecnologie e Diagnosi di Malattie Virali

8 novembre 2018

dott.ssa Katia Barbaro

Ufficio di Staff Biotecnologie

Substrati Cellulari e Produzione Diagnostici



Cellule Staminali: Caso Clinico

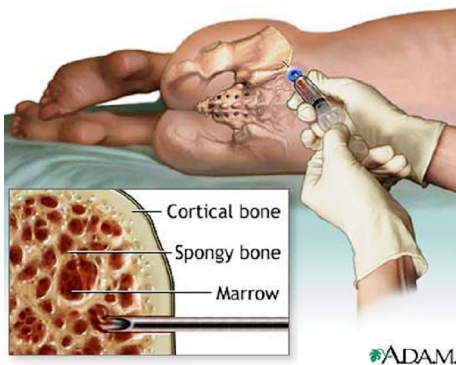
Terapia Rigenerativa della Cartilagine Articolare: Un caso studio in modello Equino



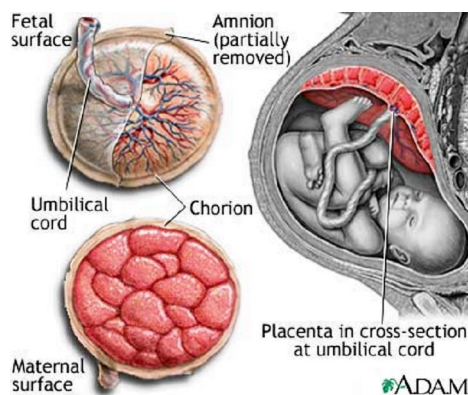


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

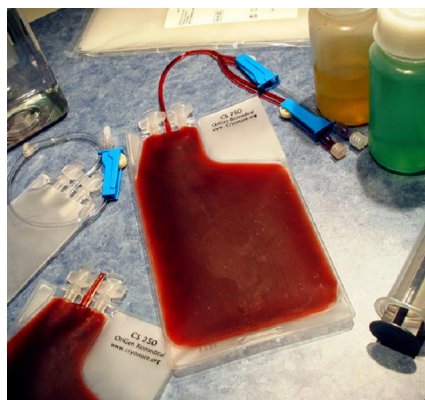
FONTI PIU' COMUNI DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI



Agoaspirato midollare



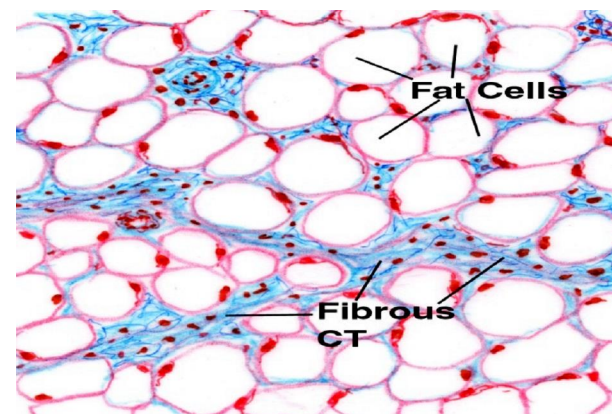
Placenta



Sangue cordonale



Sangue periferico

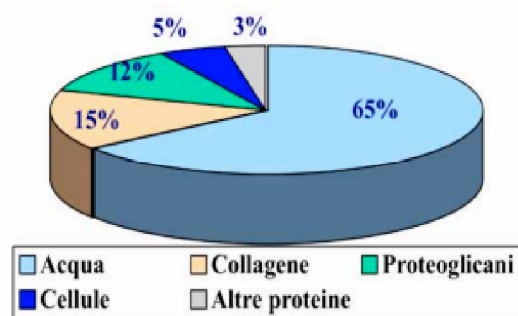


Tessuto adiposo



CARTILAGINE ARTICOLARE

- Costituita da tessuto connettivo denso e tessuto elastico
- Ricopre la superficie delle articolazioni
- Cartilagine ialina
- Tessuto avascolare
- Non innervato
- Condrociti



PATOLOGIE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

- Traumatiche (lesioni)
- Infiammatorie (artrite)
- Metaboliche (gota)
- Degenerative (artrosi)

LESIONI CARTILAGINEE

- Meccanismo naturale
- Rilascio di frammenti nel fluido sinoviale
- Degenerazione cartilagine
- Proliferazione condrociti
- Produzione di anabolizzanti
- Dedifferenziamento con perdita fenotipo
- Formazione di fibrocartilagine



SCOPO DEL LAVORO

- identificare il distretto anatomico più idoneo per il prelievo dei condrociti nell'animale in vita;
- studiare la capacità differenziative dei condrociti;
- studiare la capacità di rigenerare cartilagine ialina nelle lesioni condrali da parte della popolazione condrocitaria isolata.



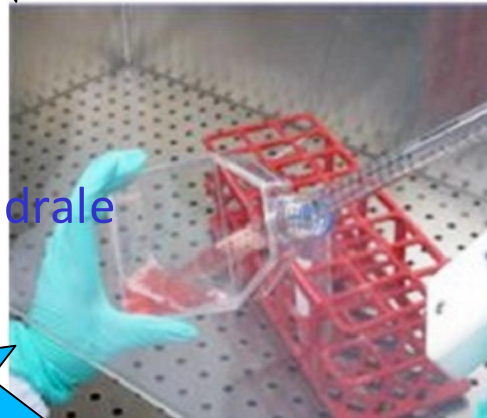
SCHEMA SPERIMENTALE



Sito prelievo:
Ginocchio
Naso
Orecchio
Trachea



Impianto nel sito
della lesione osteocondrale



Prelievo
tessuto
cartilagineo
(Trachea)



Isolamento ed espansione
dei condrociti



Differenziamento in vitro

30/04/12



ISOLAMENTO CONDROCITI

Prelievo tessuto tracheale e
isolamento

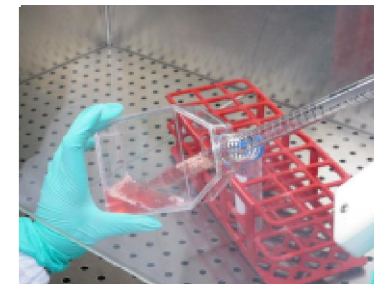


Riduzione in piccoli frammenti e
digestione con collagenasi e tripsina

Centrifugazione 1200g 8 min



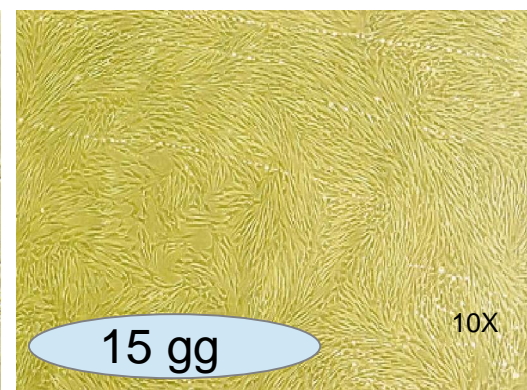
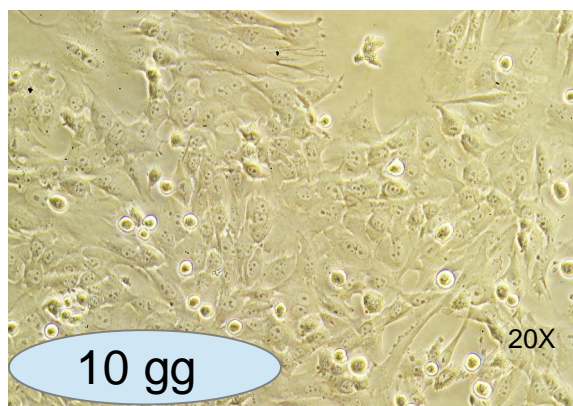
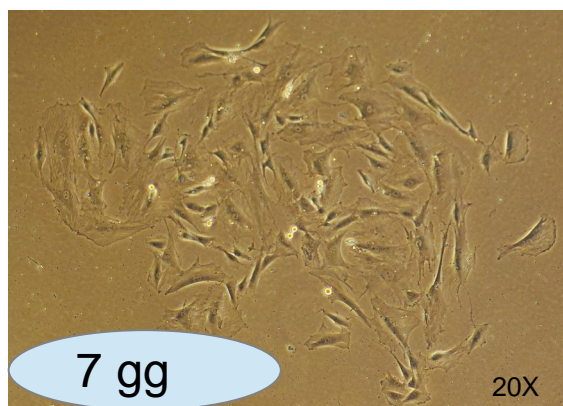
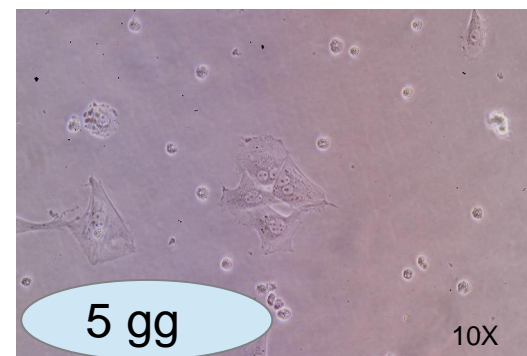
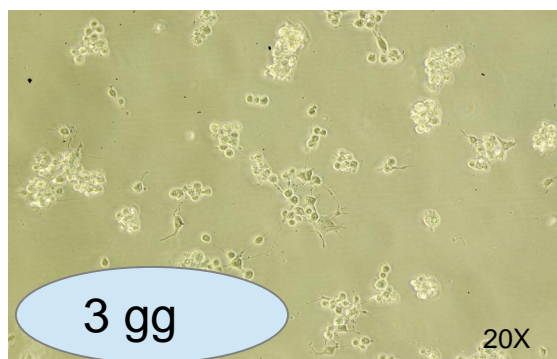
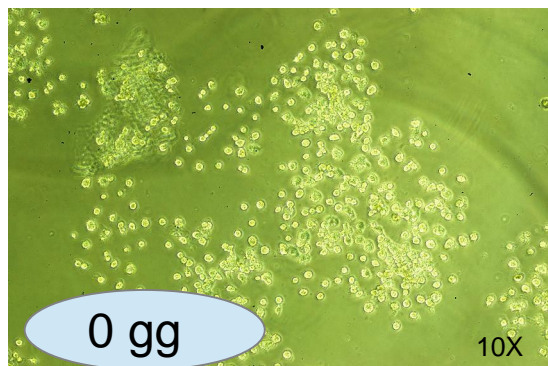
Lavaggi e semina in Fiaschette
con α MEM FBS 10%



Incubazione 37°C 5% CO₂



CAMBIAMENTO MORFOLOGICO DEI CONDROCITI *IN VITRO*

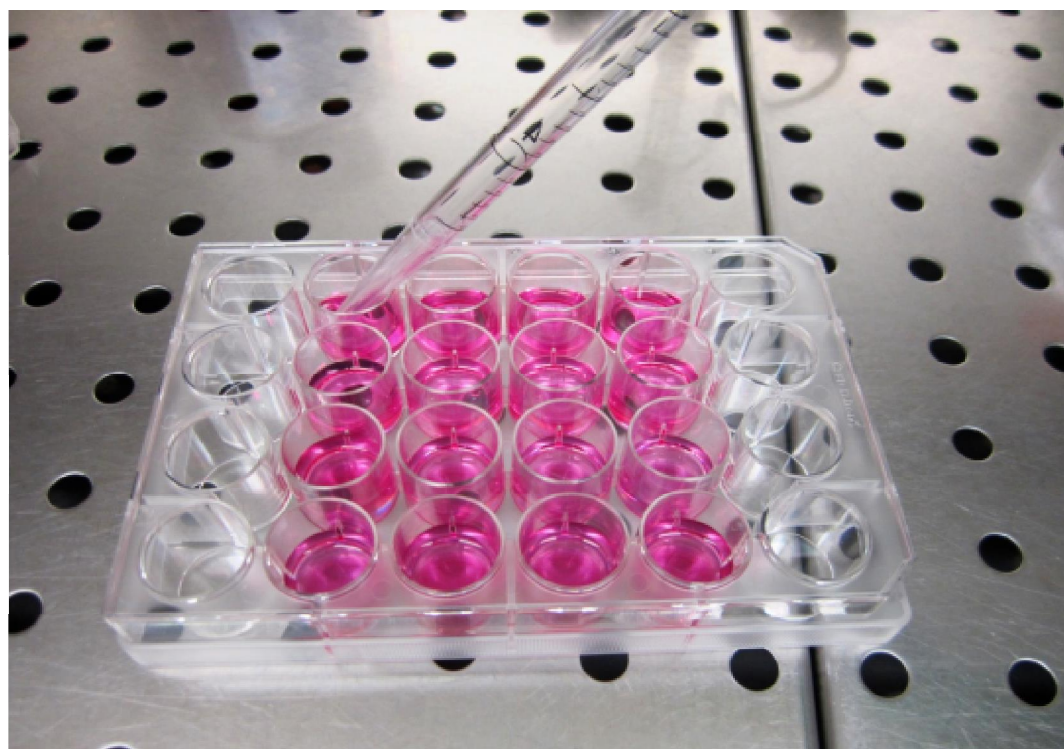


Microscopio Ottico Rovesciato



DIFFERENZIAMENTO IN VITRO

Valutazione
della capacità
differenziativa
verso *lineages*,
osteogenico,
adipogenico e
condrogenico

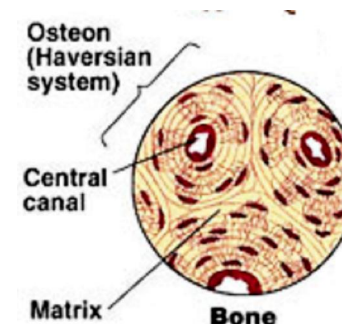


Differenziamento Osteogenico

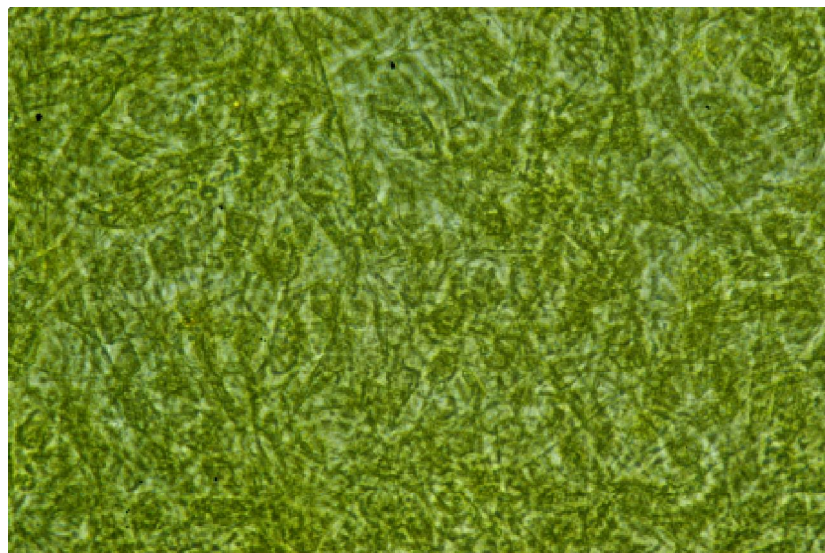


Condrociti de-differenziati

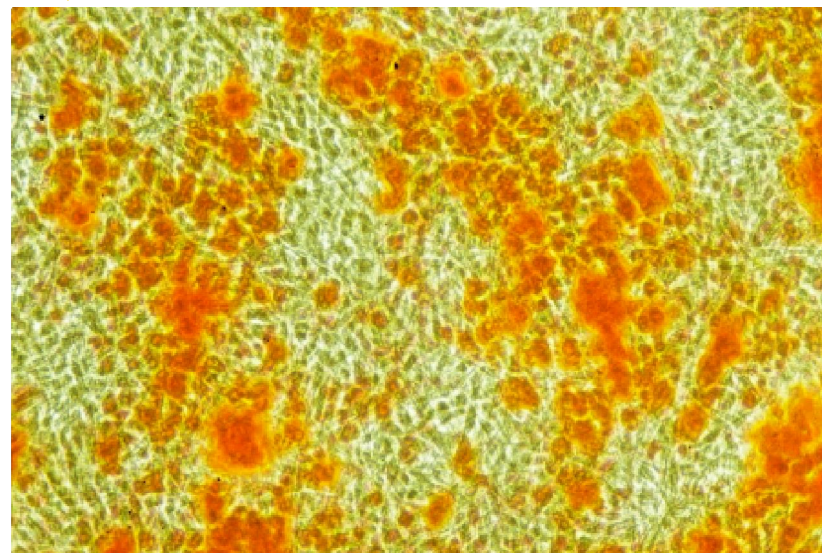
Acido ascorbico
Desametasone
 β -Glicerofosfato



Osteoblasti



Controllo negativo



Alizarin Red





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Differenziamento Osteogenico

- É **Acido ascorbico** (vitamina C): funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di tutti i tipi di collagene; induce l'attività della fosfatasi alcalina della membrana plasmatica degli osteoprogenitori.
- É **B glicerofosfato**: I fosfati organici promuovono la mineralizzazione dal momento che il fosfato viene incorporato nei cristalli di idrossiapatite della matrice.
- É **Desametasone**: promuove il differenziamento poichè è un agonista dei glucocorticoidi; esso agisce sui promotori responsivi dei fattori di trascrizione necessari per il commitment delle MSCs nel lineage osteogenico; promuove la calcificazione in vitro.

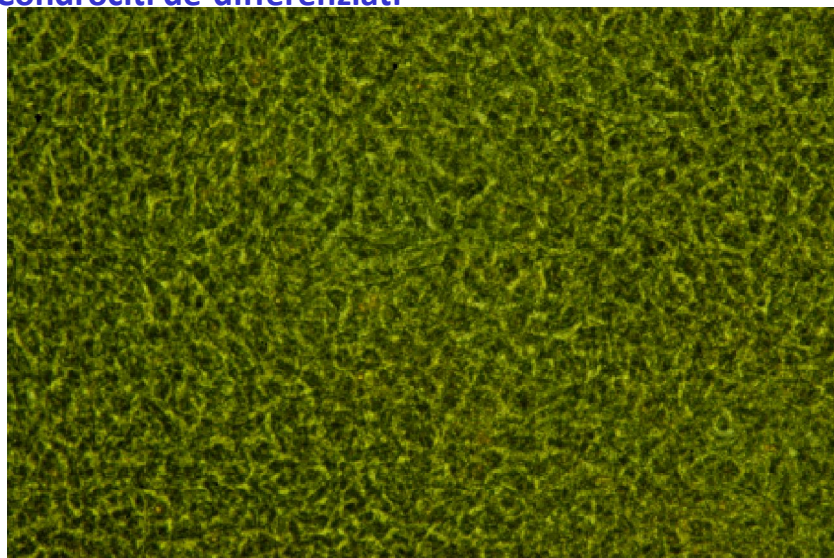
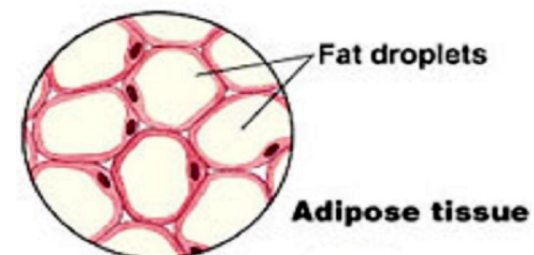


Differenziamento Adipogenico

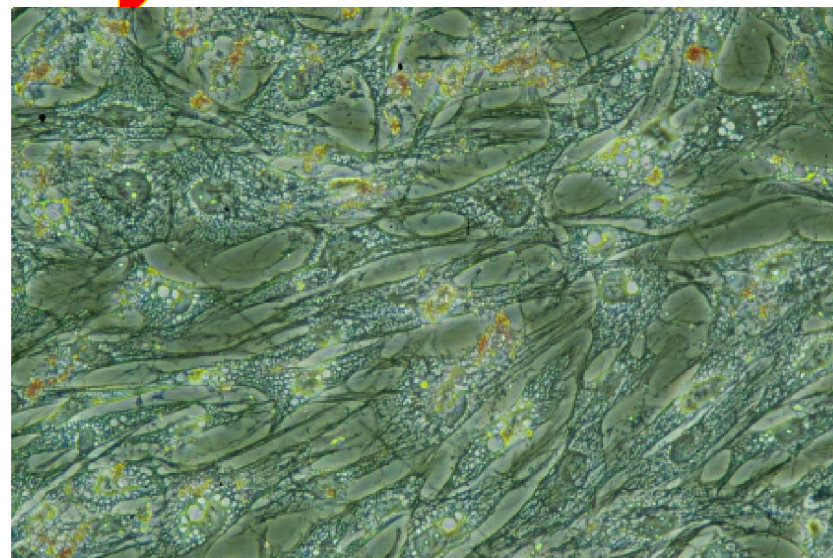


Condrociti de-differenziati

Insulina
Desametasone
3-isobutil metilxantina



Controllo negativo



Oil Red





Differenziamento adipogenico

- É **Insulina:** Promuove il differenziamento poichè attiva l'espressione di fattori di trascrizione necessari per il commitment delle MSCs nel lineage adipogenico; aumenta la percentuale di cellule che si differenziano e l'accumulo di lipidi nelle cellule.
- É **Desametasone:** promuove il differenziamento poiché è un agonista dei glucocorticoidi capace di agire su promotori responsivi dei fattori di trascrizione necessari per il commitment delle MSCs nel lineage adipogenico.
- É **IBMX:** è un inibitore non specifico delle fosfodiesterasi del cAMP e del cGMP. Il cAMP attiva la fosfochinasi PKA coinvolta in fenomeni di proliferazione, differenziamento e apoptosi.

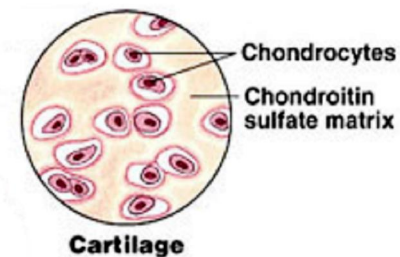


Differenziamento Condrogenico

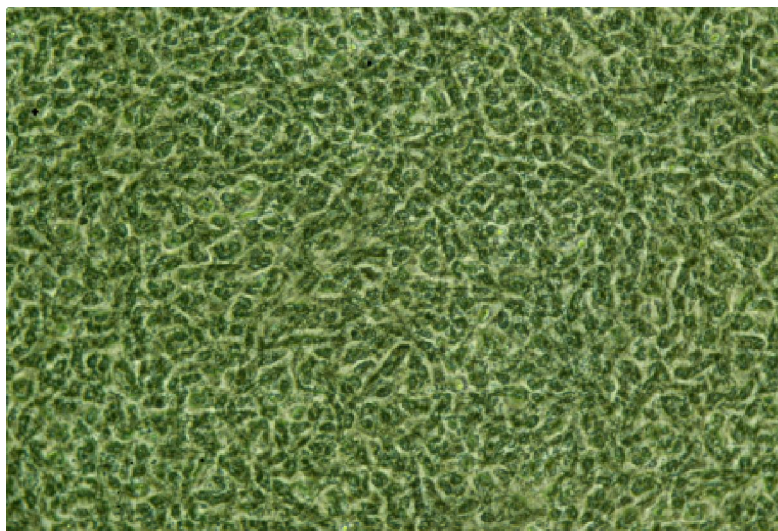


Condrociti de-differenziati

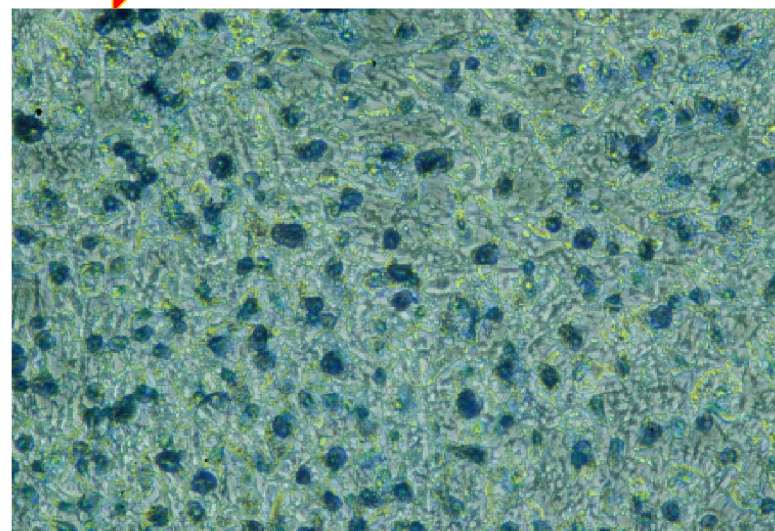
Acido ascorbico
Insulina
hTGF β 1



Condrociti



Controllo negativo



Alcian Blue





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Differenziamento condrogenico

- É TGF- β 1 è un fattore di crescita coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare e nel differenziamento ed è importante per la formazione di osso e cartilagine.
- É Acido ascorbico (vitamina C): funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di tutti i tipi di collagene.
- É Insulina: Promuove il differenziamento poichè attiva l'espressione di fattori di trascrizione necessari per il commitment delle MSCs nel lineage condrogenico.
- É Poli lisina è una molecola poli-cationica che promuove l'interazione tra le cellule.

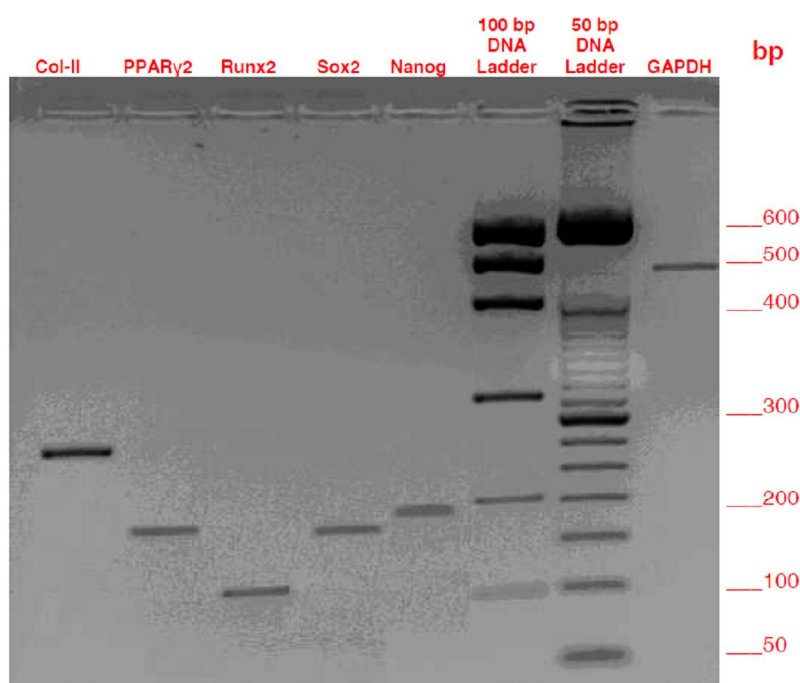




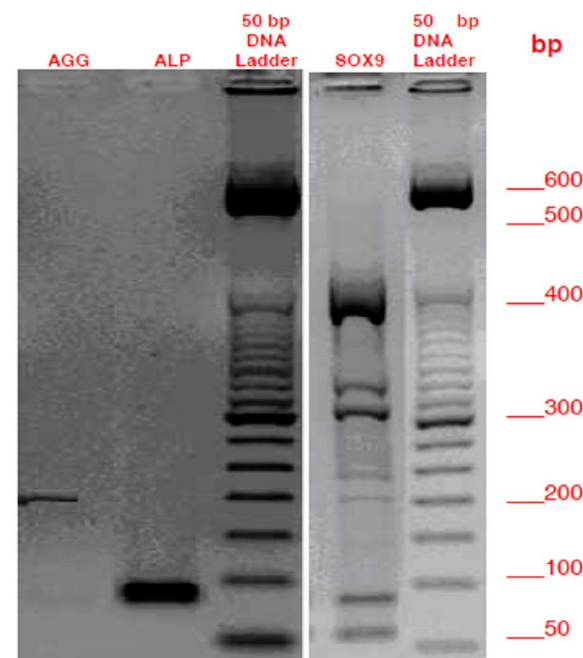
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

GENI SELEZIONATI E PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE (Rivelazione di RNA specifici)

Target	Gene	Prodotto di PCR (bp)
Multipotenza	Nanog	190
	Sox2	179
Osteogenesi	Runx2	107
	ALP	81
Chondrogenesi	Sox9	152
	Col-2	79
	AGG	256
Adipogenesi	PPAR γ 2	180



Prodotti di amplificazione in PCR in gel di agarosio



Prodotti di amplificazione in PCR in gel di agarosio

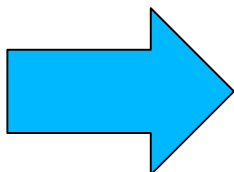
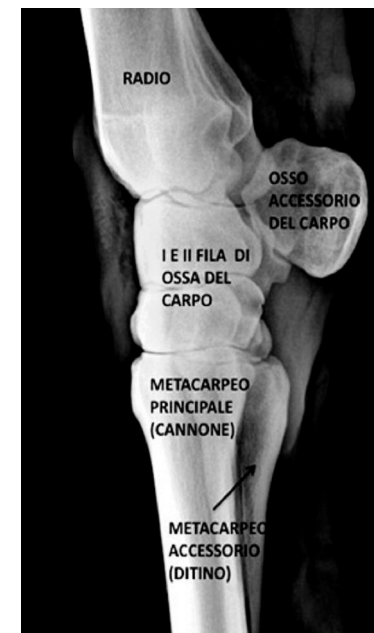


CASO CLINICO

Il cavallo oggetto dello studio è un Purosangue Inglese di 4 anni con un difetto della cartilagine articolare conseguente a lesione traumatico-funzionale spontanea dell'articolazione carpica (lesione dorso laterale del radio sinistro)

•Impianto dei condrociti:

- L'impianto della sospensione condrocitaria è stata effettuata attraverso artroscopia in anestesia generale con il cavallo in decubito dorsale.
- Nel sito della lesione condrale sono stati eseguiti 3 fori: 2 trattati con condrociti autologhe e 1 trattato mediante perforazione standard (senza aggiunta di condrociti)



Dopo 8 mesi dall'impianto

Dopo 8, 13 e 24 mesi dall'impianto di condrociti nel sito della lesione della cartilagine articolare, sono stati effettuate diversi prelievi bioptici

Colorazione con ematossilina-eosina

Prova immunoistochimica con un anticorpo policlonale specifico per il Collagene di tipo II (componente preponderante nella composizione della cartilagine ialina).

Parte più esterna cartilagine fibrosa e assenza di collagene II, mentre nella parte più interna cartilagine ialina e collagene II.



Dopo 13 mesi dall'impianto

Transizione da cartilagine fibrosa a cartilagine ialina.

Il collagene II è presente anche nelle porzioni di cartilagine fibrosa





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Dopo 24 mesi dall'impianto

Cartilagine ialina presente in tutta la superficie della biopsia del sito trattato, mentre risulta evidente la cartilagine fibrosa nella biopsia del sito non trattato con condrociti autologhi.



Il distretto ottimale è quello tracheale

La popolazione condrocitaria è in grado di differenziare *in vitro* nei 3 lineages e di attivare specifici geni ➡ CARATTERISTICA DI STAMINALITA'

L'idea innovativa di ricorrere alla cartilagine tracheale di tipo ialino, come fonte di condrociti da de-differenziare *in vitro* in cellule progenitrici con caratteristiche di staminalità, ha permesso la riparazione della lesione articolare del cavallo attraverso la neosintesi di cartilagine ialina con caratteristiche identiche alla cartilagine articolare della zona perilesionale.

Pertanto, tale metodica caratterizzata da facilità di prelievo del tessuto fonte di condrociti, la messa a punto della tecnica di replicazione *in vitro* e di quella di impianto, costituisce ad oggi sicuramente la modalità più promettente per la riparazione ottimale con *restitutio ad integrum* delle lesioni cartilaginee articolari. Nel prossimo futuro, potrebbe rappresentare la soluzione più efficace nel trattamento anche nell'uomo.

I risultati ottenuti a 2 anni di follow-up nell'ambito dello studio da noi condotto sono estremamente soddisfacenti sia dal punto di vista clinico, che da quello anatomico come dimostrato dall'analisi istologica ed immunoistochimica delle biopsie effettuate sulla cartilagine rigenerata.

Un maggior numero di casi clinici da trattare appare comunque necessario per rafforzare la validità di questa tecnica, oltre a permettere di ottimizzare e standardizzare il protocollo terapeutico.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

STRATEGIE TERAPEUTICHE



LE CELLULE STAMINALI DA DOVE SI PRELEVANO?

Sia in campo umano che veterinario i tessuti donatori sono numerosi: dal sangue circolante, al cordone ombelicale, alla placenta, ecc, ma i principali sono:

- **Il tessuto adiposo, dal quale si ottengono le Cellule Staminali Mesenchimali Adipose;**
- **il midollo osseo, dal quale si ottengono le Cellule Staminali Mesenchimali del Midollo.**

In molti tessuti sono presenti cellule staminali capaci di dare origine solo a cellule del tessuto da cui provengono:

- **Tessuto corneo**
- **Tessuto cartilagineo**



TIPI DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI CHE SI POSSONO UTILIZZARE

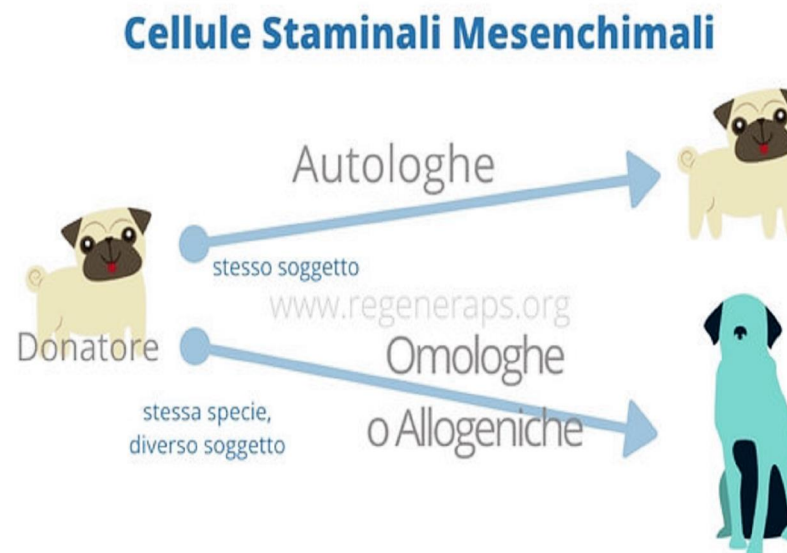
Attualmente, in medicina veterinaria non esiste una regolamentazione specifica per queste terapie e questo rende particolarmente difficile orientarsi verso centri con competenze specifiche.

Oggi le staminali impiegate sugli animali, sia in Italia che all'estero, derivano soprattutto da tessuto adiposo o da midollo osseo e possono essere:

- **eterologhe**, cioè derivanti da un altro animale della stessa specie (**utilizzate nel trattamento di malattie genetiche**)
- **autologhe**, cioè derivanti dallo stesso animale

Inoltre, possono essere:

- fresche, utilizzabili entro poche ore congelate, conservate in azoto liquido ed utilizzabili alle bisogno



LE TERAPIE RIGENERATIVE CON LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI, COSA CURANO?

In base alle esperienze maturate e alla letteratura scientifica, le patologie sulle quali ad oggi è possibile ottenere risultati terapeutici sugli animali sono:

- grandi perdite di sostanza cutanea (ustioni, piaghe di grande estensione)
- lesioni tendinee / legamentose (ferite da taglio a livello dell'estremità degli arti, stiramenti, distensioni, distrazioni)
- lesioni muscolari
- lesioni corneali (ulcere)
- artropatie degenerative (artriti, artrosi)
- fratture (scheggie, comminute, esposte)
- pseudoartrosi/ritardi di consolidamento in seguito a fratture
- piodermiti
- patologie osteolitiche (necrosi cefalica)
- osteomieliti endogene e esogene

Elenchi completi ed esaustivi non è possibile fornirli, in quanto le potenzialità terapeutiche delle MSC sono moltissime e c'è una costante evoluzione dei campi applicativi, che vanno dalle malattie autoimmuni, alle patologie degenerative e traumatiche del sistema nervoso, alle cardiomiopatie e a numerose altre malattie per le quali ci sono i presupposti per la loro efficacia che tuttavia necessitano ancora di tempo per potere essere validati definitivamente.



Esercitazione

- Tessuto di origine (es. grasso, midollo osseo, cartilagine, cornea)
- Autologo/Eterologo (es. malattie genetiche)
- Impianto (cellule staminali con o senza scaffold)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

GRAZIE PER
L'ATTENZIONE!!!!

