

**Ricerca Corrente IZS LT 01/12 RC**

***“Utilizzo di condrociti isolati da diversi siti anatomici per la riparazione di lesioni della cartilagine articolare nella specie equina”***

**Responsabile Scientifico:**

dott.ssa *Katia Barbaro*

**Ufficio di Staff Biotecnologie**

**Substrati Cellulari e Produzione Diagnostici**

“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”



## UNITA' OPERATIVE

### **U.O. 1: IZS-LT, Ufficio Staff Biotecnologie**

**Dott.ssa Katia Barbaro:** Responsabile e Coordinatrice del Progetto

**Dott.ssa Antonella Cersini:** Studio microRNA derivanti dalla trascrizione di specifici geni attivati durante il differenziamento cellulare.

**Dott.ssa Fiorella Di Egidio:** Studio di protocolli per l'isolamento, la crescita e il differenziamento di condrociti.

**Dott.ssa Alessia Amaddeo:** Studio di protocolli per la gelificazione *in vitro* ed *in vivo* di biomateriali al fine dell'impianto di condrociti per via artroscopica.

**Dott.ssa Annalisa Altigeri:** Studio di protocolli per l'isolamento, la crescita e il differenziamento di condrociti.

**Sig.ra Alessia Zepparoni:** Studio di protocolli per l'isolamento, la crescita e il differenziamento di condrociti.

### **U.O. 2: IZS-LT, Direzione operativa Igiene degli Allevamenti delle Produzioni e del Benessere Animale**

**Dott. Antonio Fagiolo:** Prelievo tessuti in animali macellati.

**Dott.ssa Cristina Roncoroni:** Prelievo tessuti in animali macellati.

### **U.O. 3: Clinica Veterinaria Equine Practice, Campagnano di Roma**

**Dott. Fernando Canonici:** Reclutamento e gestione del caso clinico.

### **U.O. 4: Direzione Operativa Ufficio di Staff Accettazione, Refertazione e Sportello dell'Utente**

**Dott. Cristiano Cocumelli:** Valutazione istologica ed immunoistochimica delle biopsie.



# CELLULE STAMINALI E MEDICINA RIGENERATIVA

Le caratteristiche fondamentali di una cellula staminale adulta è la capacità di auto-rinnovarsi e la capacità di differenziare in tipi di cellule tipiche del tessuto di provenienza

PROLIFERAZIONE



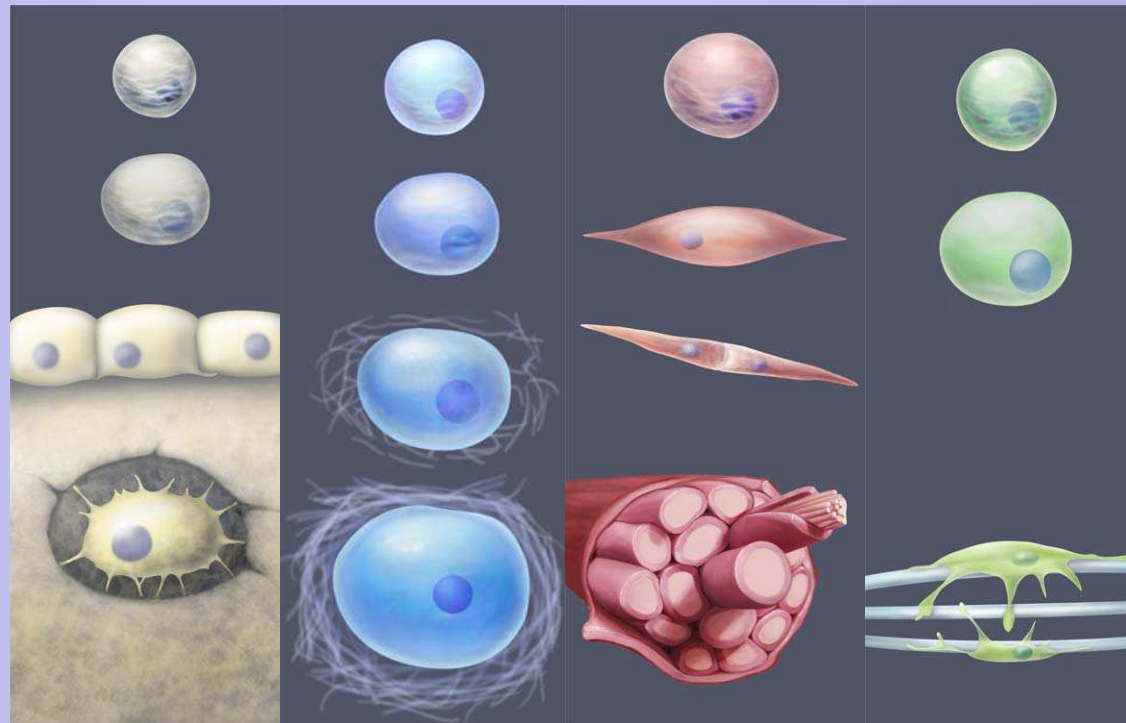
COMMISSIONAMENTO



DIFFERENZIAZIONE



MATURAZIONE



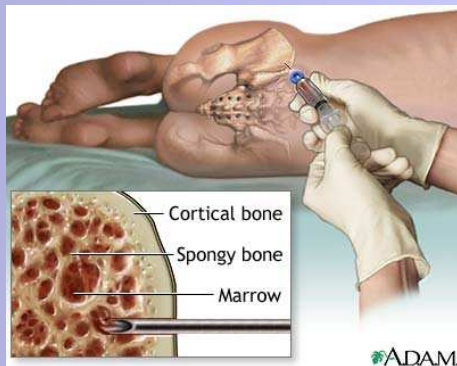
OSSO

CARTILAGINE

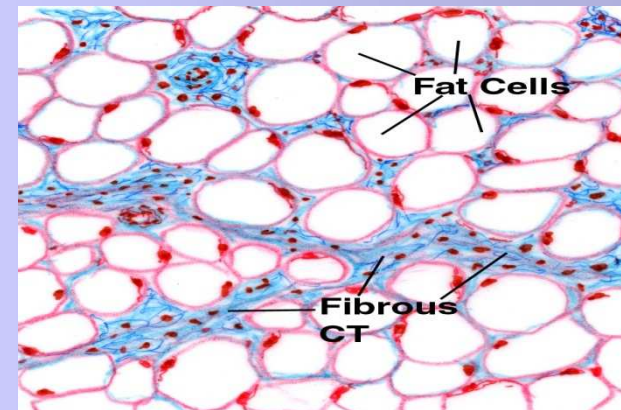
MUSCOLO

TENDINE

# FONTI PIU' COMUNI DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI



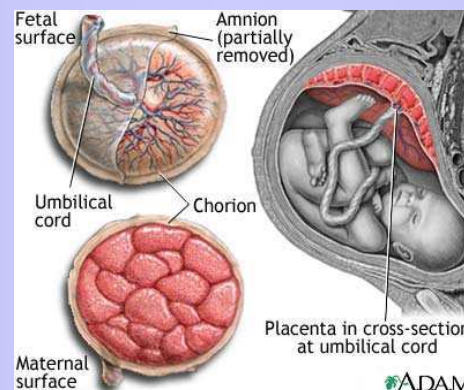
Agoaspirato midollare



Tessuto adiposo



Sangue cordonale



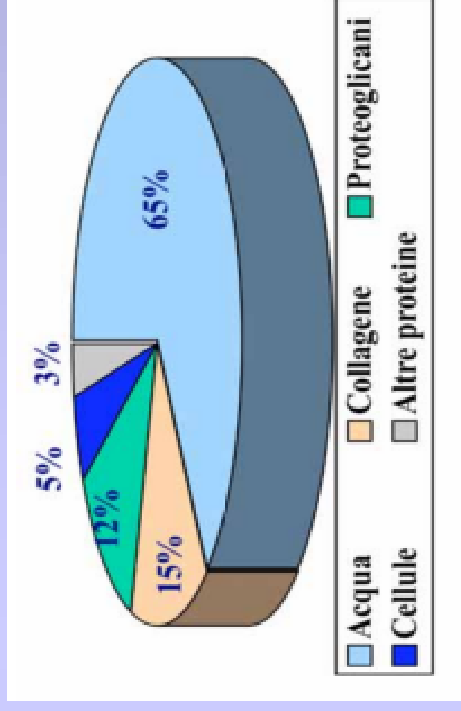
Placenta



Sangue periferico

# 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

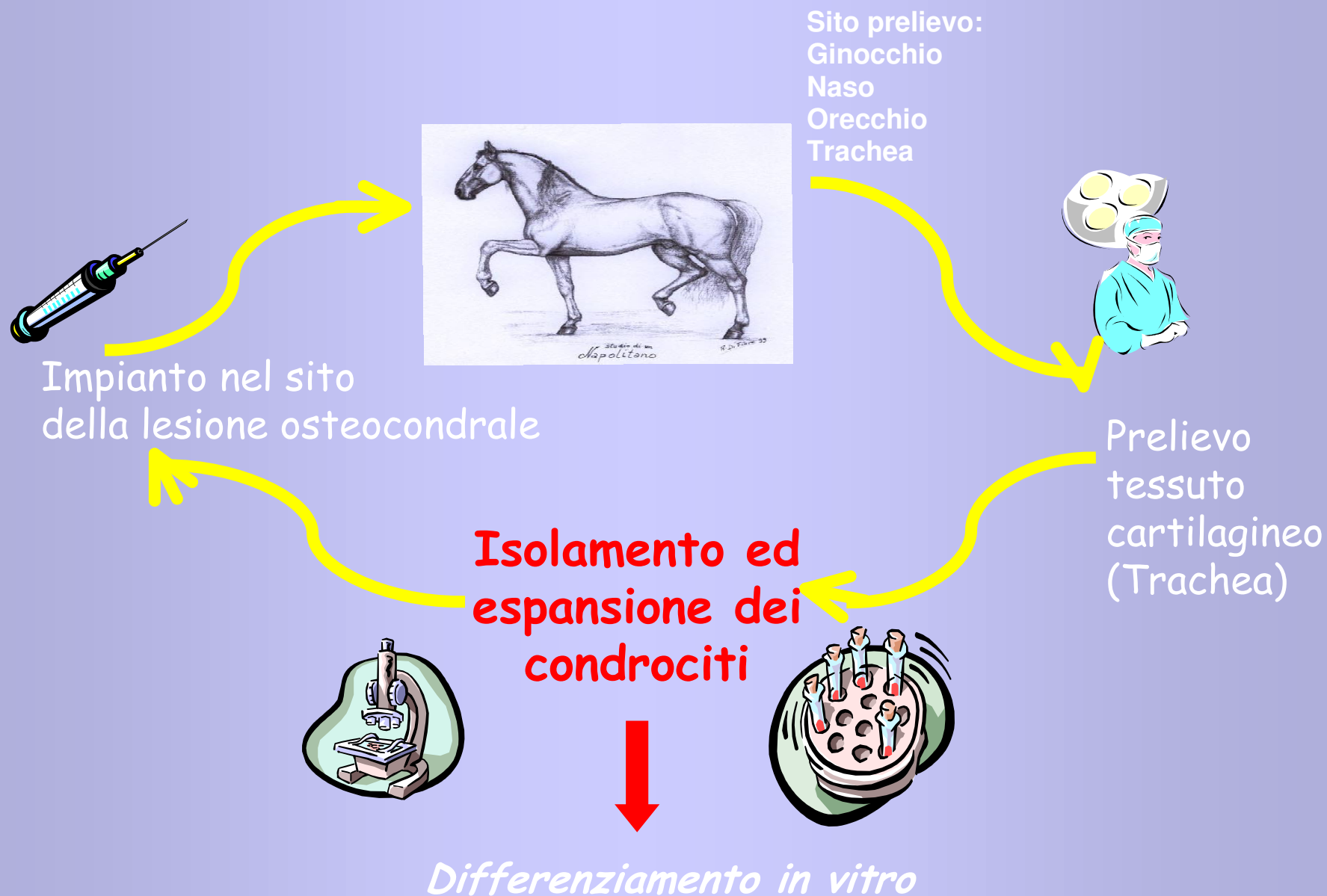
- Meccanismo naturale
- Rilascio di frammenti nel fluido sinoviale
- Degenerazione cartilagine
- Proliferazione condrociti
- Produzione di anabolizzanti
- Dedifferenziamento con perdita fenotipo
- Formazione di fibrocartilagine

# 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.

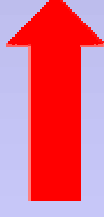


# SCHEMA SPERIMENTALE



# ISOLAMENTO CONDROCITI

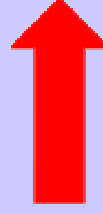
Prelievo tessuto tracheale e  
isolamento



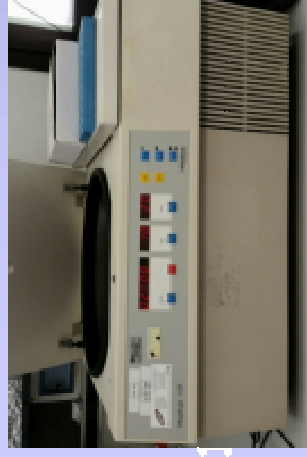
Riduzione in piccoli frammenti e  
digestione con collagenasi e tripsina



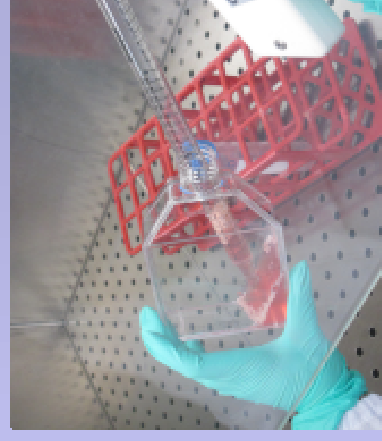
Centrifugazione 1200g 8 min



CENTRIFUGAZIONE



Lavaggi e semina in Fiaschette  
con  $\alpha$ MEM FBS 10%

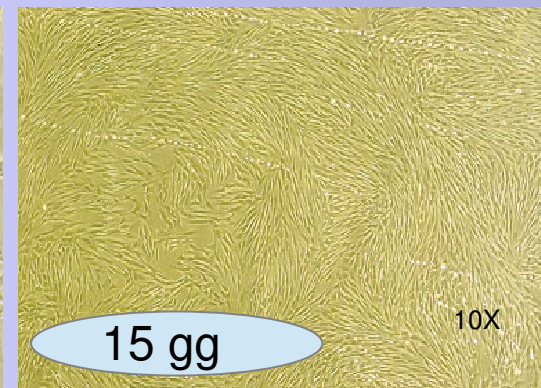
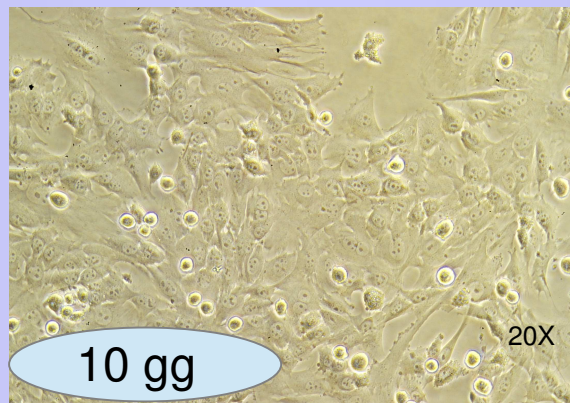
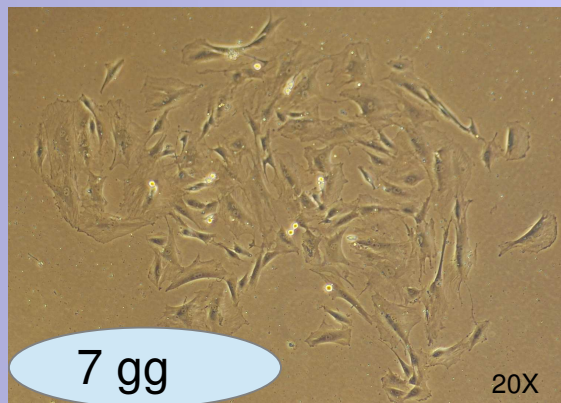
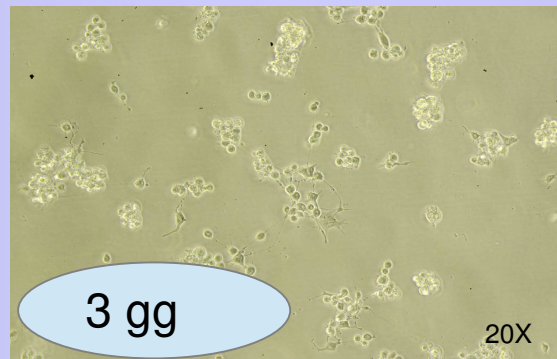
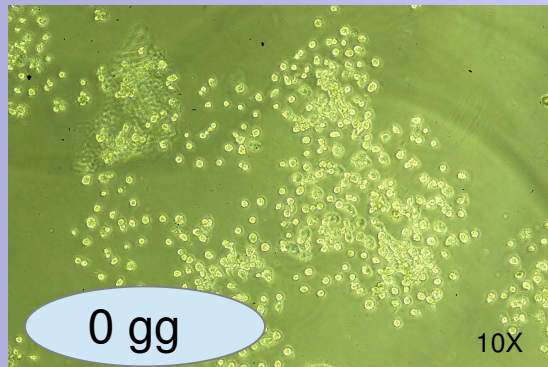


Incubazione 37°C 5% CO<sub>2</sub>





# CAMBIAMENTO MORFOLOGICO DEI CONDROCITI *IN VITRO*



Microscopio Ottico Rovesciato

# DIFFERENZIAMENTO IN VITRO

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

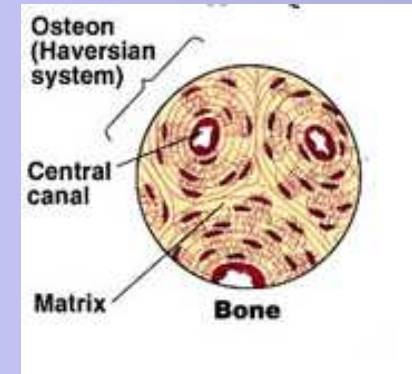


# Differenziamento Osteogenico

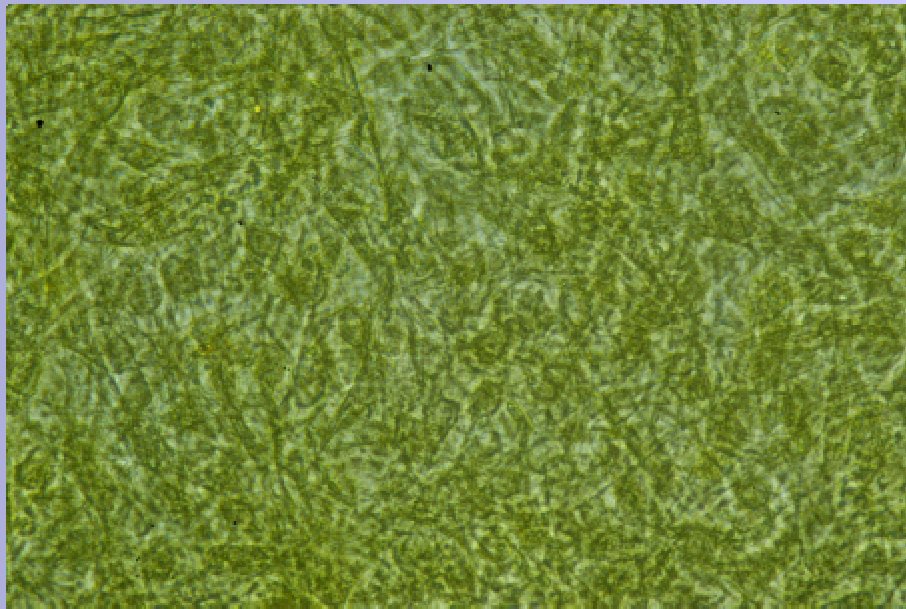


Condrociti de-differenziati

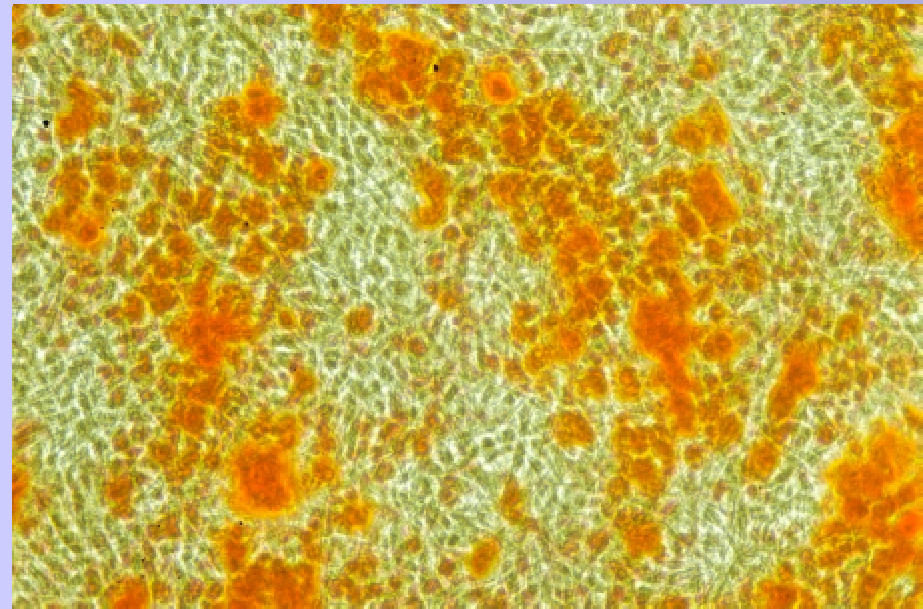
Acido ascorbico  
Desametasone  
 $\beta$ -Glicerofosfato



Osteoblasti



Controllo negativo



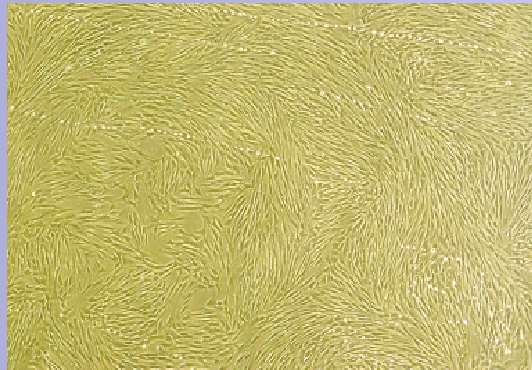
Alizarin Red



# Differenziamento osteogenico

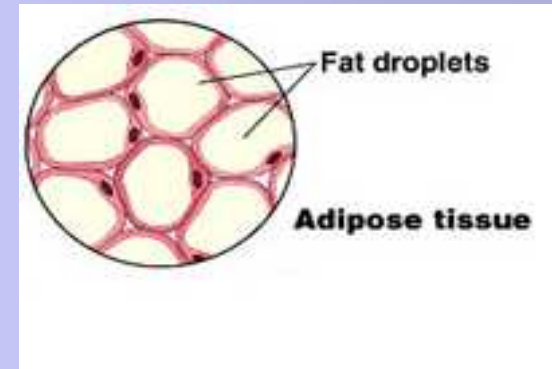
- **Acido ascorbico (vitamina C):** funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di tutti i tipi di collagene; induce l'attività della fosfatasi alcalina della membrana plasmatica degli osteoprogenitori.
- **B glicerofosfato:** I fosfati organici promuovono la mineralizzazione dal momento che il fosfato viene incorporato nei cristalli di idrossiapatite della matrice.
- **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

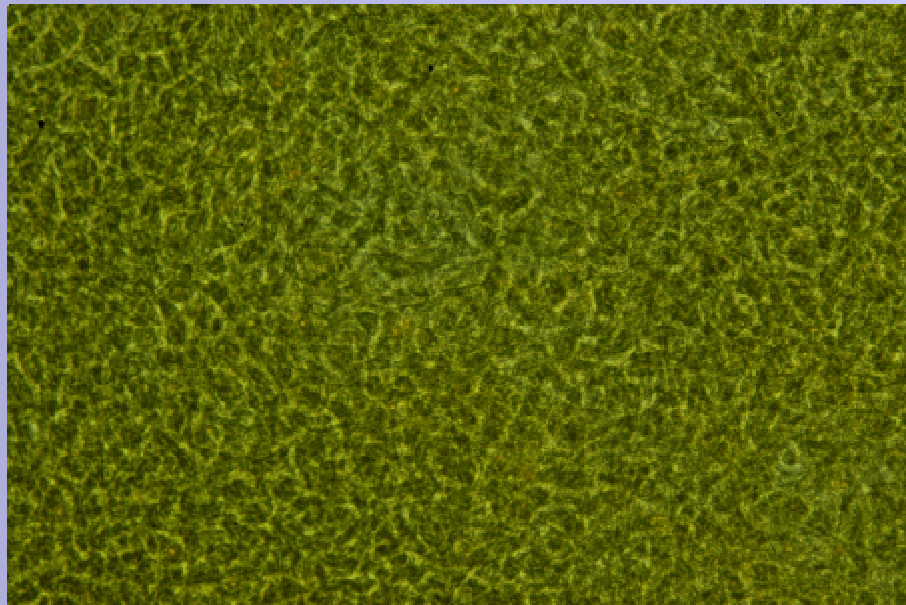


Condrociti de-differenziati

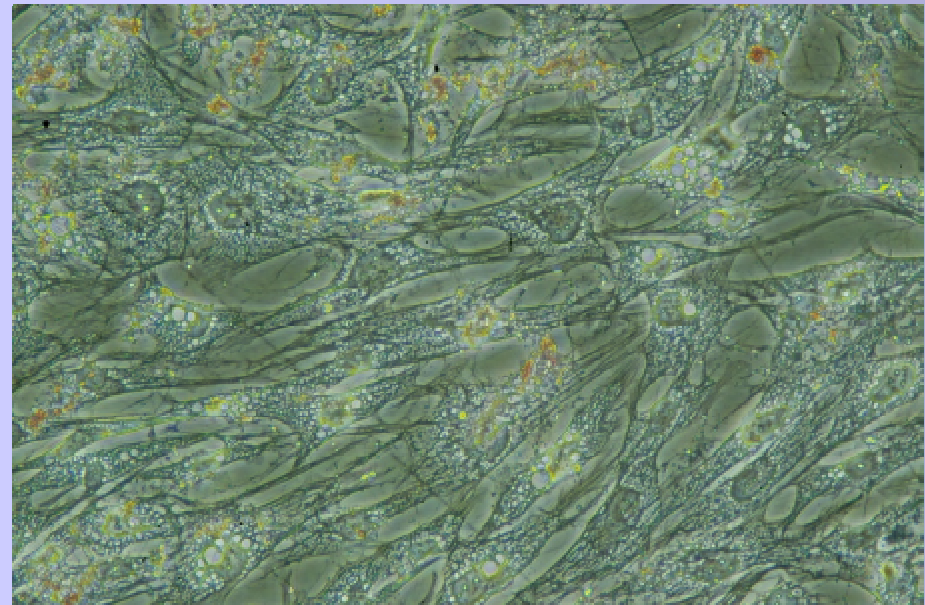
Insulina  
Desametasone  
3-isobutil metilxantina



Adipociti



Controllo negativo



Oil Red

# Differenziamento adipogenico

- **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.
- **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.
- **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.

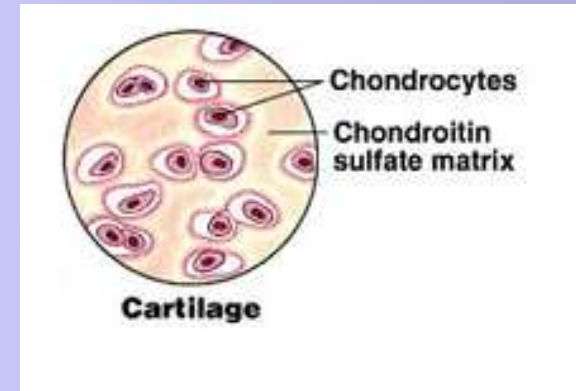


# Differenziamento Condrogenico

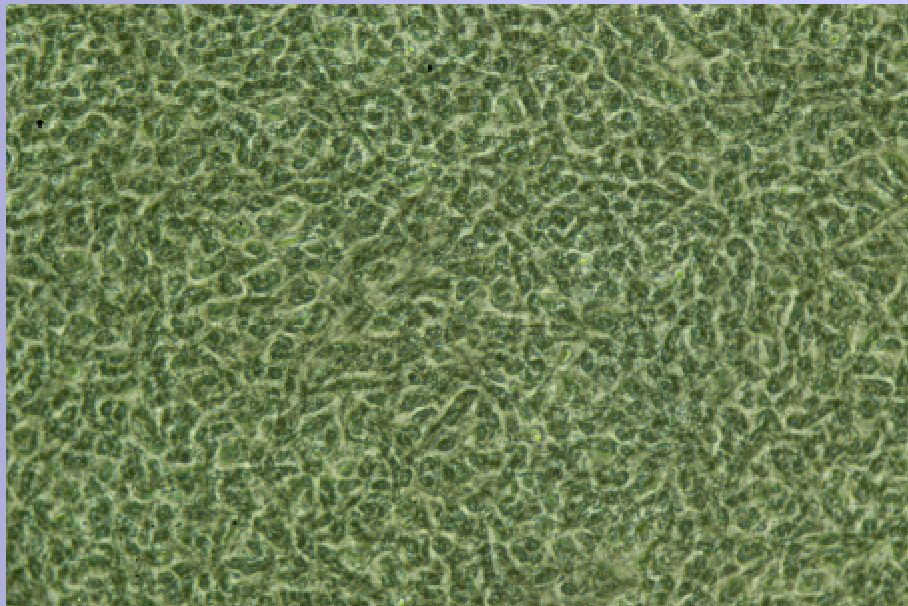


Condrociti de-differenziati

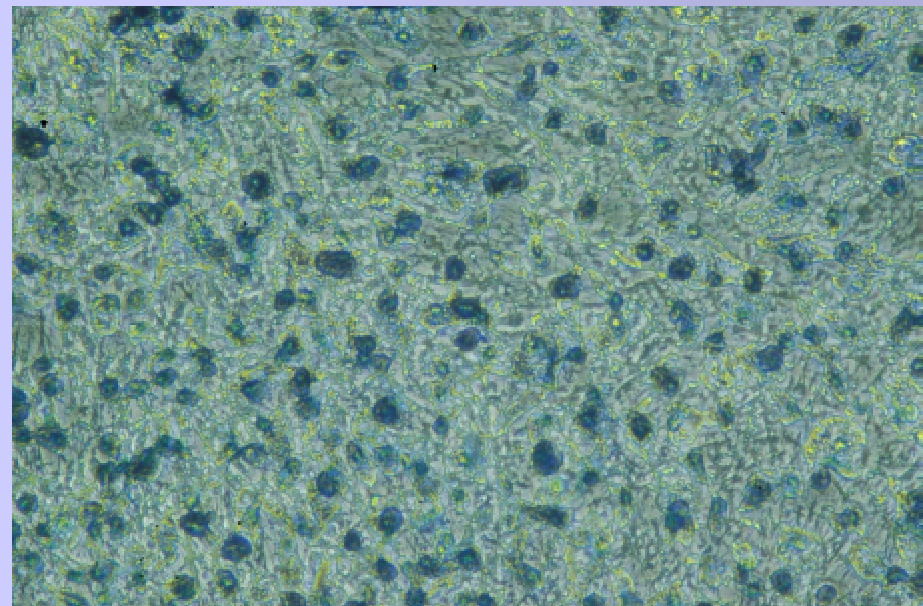
Acido ascorbico  
Insulina  
hTGF  $\beta$  1



Condrociti



Controllo negativo



Alcian Blue

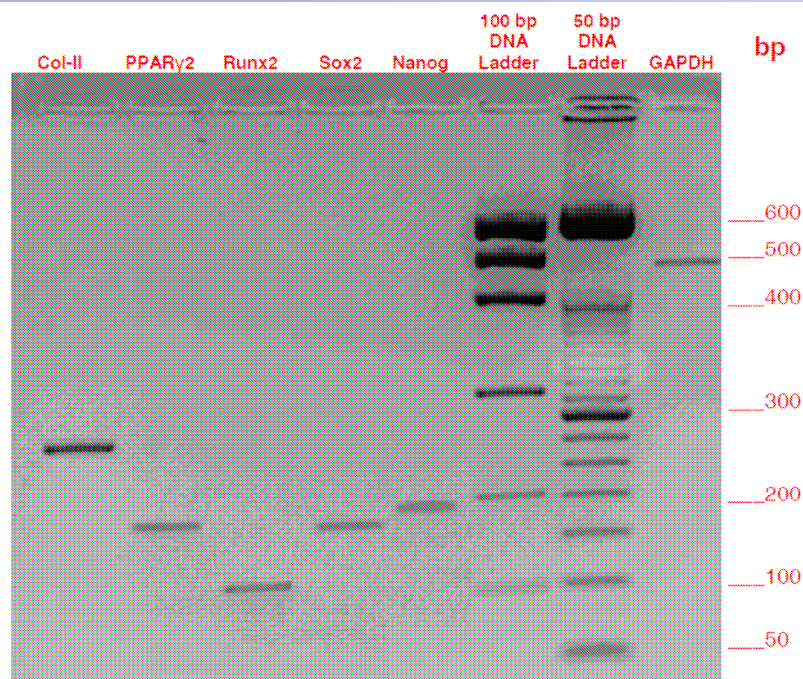
# Differenziamento condrogenico

- TGF- $\beta$ 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.
- 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.
- Insulina: Promuove il differenziamento poichè attiva l'espressione di fattori di trascrizione necessari per il commitment delle MSCs nel lineage condrogenico.
- Poli lisina è una molecola poli-cationica che promuove l'interazione tra le cellule.

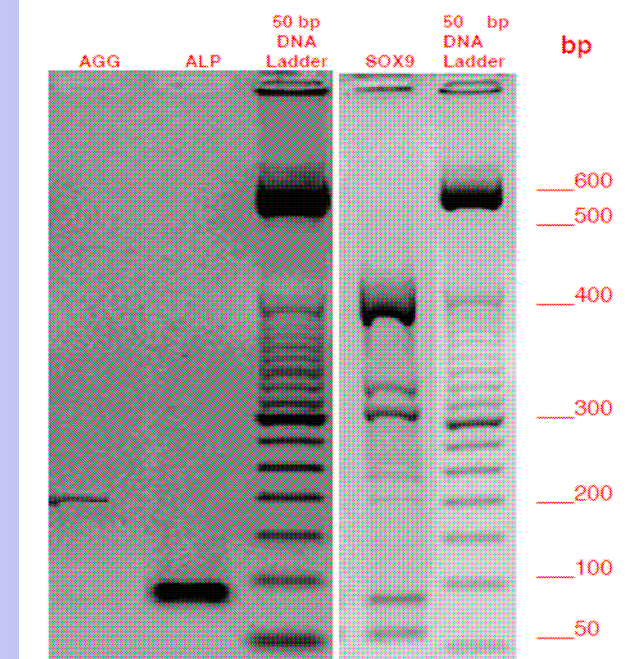


# GENI SELEZIONATI E PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE (Rivelazione di RNA specifici)

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 $\gamma$ 2	180



Prodotti di amplificazione in PCR in gel di agarosio



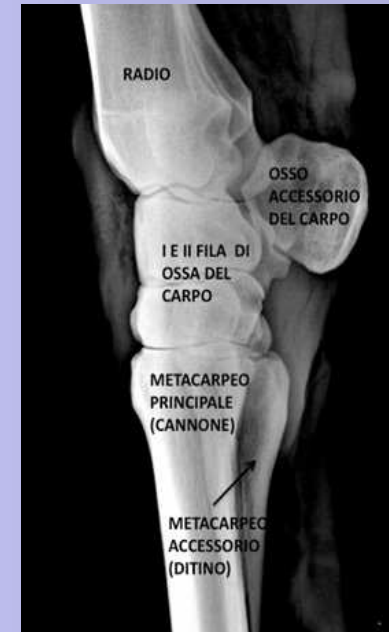
Prodotti di amplificazione in PCR in gel di agarosio

# 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 biotici
- 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 12 mesi dall'impianto

**Transizione da cartilagine fibrosa a cartilagine ialina.**

**Il collagene II è presente anche nelle porzioni di cartilagine fibrosa**



# 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.

# CONCLUSIONI

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 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.

# Produttività di Ricerca

- MODALITA' DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI:
- I risultati della ricerca sono stati resi disponibili alla comunità scientifica attraverso la realizzazione di diversi elaborati scientifici presentati (convegni/eventi formativi nazionali ed internazionali).
- L'attività di ricerca svolta in questo progetto di Ricerca Corrente è stata utilizzata per sviluppare una qualificata *attività scientifica* utilizzata nel *progetto* di tesi di **Dottorato di Ricerca in “Biotecnologie Cellulari e Molecolari”** - XXIX CICLO (Dottorato congiunto Un.Teramo – Un. L'Aquila).
- Titolo della tesi sperimentale: **Medicina Rigenerativa: utilizzo dei condrociti autologhi per la riparazione di lesioni della cartilagine articolare nella specie equina;**
- Inoltre, presso l'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana “M. Aleandri”, i metodi, sono stati utilmente adattati per la cura di altre specie animali da compagnia e da reddito, nonché, a partire da differenti matrici, per la terapia rigenerativa ossea, corneale e tendinea, costituendo un modello applicativo anche per gli studi e la terapia con cellule staminali autologhe in medicina umana.
- MEMBRO COMITATO SCIENTIFICO: 1<sup>ST</sup> Conference on: “TISSUE REGENERATION: ADVANCED CERAMICS AND COMPOSITES” DISC- Università di Genova – Italy October 19-20, 2017

# Produttività di Ricerca

“Bone regeneration loss with mesenchymal stem cells and hydroxyapatite in human and veterinarian applications”. Lupoli G, Di Egidio F, Eggenhöffner R, Altigeri A, Amaddeo A, Ghisellini P, Barraco G, Gallottini C, Eramo S, Torchia S, Roncoroni C, and Barbaro K. J Dent. Res. 95 (Spec Iss A):1104, URL,2016.

“Periodontal Tissue Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Nano-Hydroxyapatite”. Lupoli G, Di Egidio F, Eggenhöffner R, Barraco G, Eramo S, Gallottini C, Ghisellini P, Rando C, Amaddeo A, Altigeri A, Torchia S, Lai O, and Barbaro K. J Dent. Res. 95 (Spec Iss A):1105, URL,2016

“Articular Cartilage Repair: regeneration of hyaline cartilage in joints damaged”. Canonici F, Lupoli G, Barraco G, Eggenhöffner R, [Gallottini](#) C, Ghisellini P, Amaddeo A, Zepparoni A, [Cocumelli](#) C, [Torchia](#), Alfieri L, Eramo S, and Barbaro K. J Dent. Res. 95 (Spec Iss A):1106, URL,2016

“[Study of the in vitro Differentiation Capacity of Chondrocytes Isolated from Equine Trachea](#)”. Barbaro K. et al. International Science Index Vol: 08 No:09 Part V, 2014

“Effect of Nano Hydroxy Apatite on the in vitro Growth of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue of Dog”. Barbaro K. et al. Int Science Index Vol: 08 No:09 2014

“Periodontal Disease or Cement Disease? New Frontier in the Treatment of Periodontal Disease in Dogs”. C. Gallottini, W. Di Mari, A. Amaddeo, K. Barbaro et al. Life Science and Engineering Vol:8 No:6, 2014



# Produttività di Ricerca

## CON COMUNICAZIONE ORALE

- 1. [Morphological evaluation of Mesenchymal Stem Cells derived from Adipose Tissue of dog treated with different concentrations of Nanohydroxyapatite.](#) ICNCE - XII International Conference of Nanoengineering and Chemical Engineering - Roma; 09/2014
- 2. [Study of the in vitro Differentiation Capacity of Chondrocytes Isolated from Equine Trachea](#) ICNCE - XII International Conference of Nanoengineering and Chemical Engineering - Roma; 09/2014
- 3. [Effect of Nano Hydroxy Apatite on the in vitro Growth of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue of Dog](#) ICNCE - XII International Conference of Nanoengineering and Chemical Engineering - Roma; 09/2014
- 4. Isolamento e coltivazione in vitro di condrociti isolati dalla cartilagine auricolare di cavallo. XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. - Sorrento (NA), 24-26 Ottobre 2014
- 5. Effect of Nanohydroxyapatite on the in vitro growth of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue of dog. Congresso NAMABIO COST - Venezia 25-27 Marzo 2015
- 6. Cartilage Repair: study of in vitro differentiation of chondrocytes isolated from equine trachea. Congresso NAMABIO COST - Venezia 25-27 Marzo 2015
- 7. Nanotubi di TiO<sub>2</sub>: innovative applicazioni nella scienza dei materiali dentali e nella ricostruzione postendodontica. 34° Congresso Nazionale SIE Guardando al futuro – Bologna 5-7 Novembre 2015.
- 8. [Mesenchymal Stem Cells derived from dog treated with nanohydroxyapatite \(NHA\). Morphological evaluation with different concentrations of NHA.](#) 40° World Small Animal Veterinary Association Congress, Bangkok; 05/2015
- 9. Applicances of Innovative Technologies with Adult Stem Cells and Nanomaterials 1<sup>ST</sup> Biennial Conference on: Biomaterial for Tissue and Genetic Engeneering and the Role of Nanotechnology - CNR – Roma 17-20/10/2016



# Produttività di Ricerca

## CON POSTER

Regenerative Medicine: repair of articular hyaline cartilage in damaged joints IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition March 22-25, 2017, San Francisco, Calif., USA

Comparative research on the effectiveness of macro/nanofillers in dental materials IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition March 22-25, 2017, San Francisco, Calif., USA

Bone regeneration loss with mesenchymal stem cells and hydroxyapatite in human and veterinarian applications 45th Annual Meeting & Exhibition of the AADR 40th Annual Meeting of the CADR – Los Angeles, Calif., USA; March 16-19 2016

Periodontal Tissue Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Nano-Hydroxyapatite. 45th Annual Meeting & Exhibition of the AADR 40th Annual Meeting of the CADR –Los Angeles, Calif., USA; March 16-19 2016.

Articular Cartilage Repair: regeneration of hyaline cartilage in joints damaged 45th Annual Meeting & Exhibition of the AADR 40th Annual Meeting of the CADR –Los Angeles, Calif., USA; March 16-19 2016







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. A.



***Ad maiora  
semper!***





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

GRAZIE PER  
L'ATTENZIONE!!!!

