



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

L'attività di ricerca corrente presso l'IZS Lazio e Toscana 2021: innovazione e applicazione sul territorio

Roma, 16 giugno 2022

IZS LT 01/17 RC: Tecnologie Innovative nella Terapia Rigenerativa:
Cellule Staminali e Scaffold in Ortopedia Veterinaria

Katia Barbaro

*Laboratorio "Allestimento e Gestione di Substrati Cellulari
e Anticorpi Monoclonali e Medicina Rigenerativa"*

U.O.C. Virologia





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

- Introduzione**
- Obiettivi**
- Materiali & Metodi**
- Risultati**
- Impatto e Trasferibilità Operativa**
- Conclusioni**





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

-Introduzione

-Obiettivi

-Materiali & Metodi

-Risultati

-Impatto e Trasferibilità Operativa

-Conclusioni





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

MEDICINA RIGENERATIVA

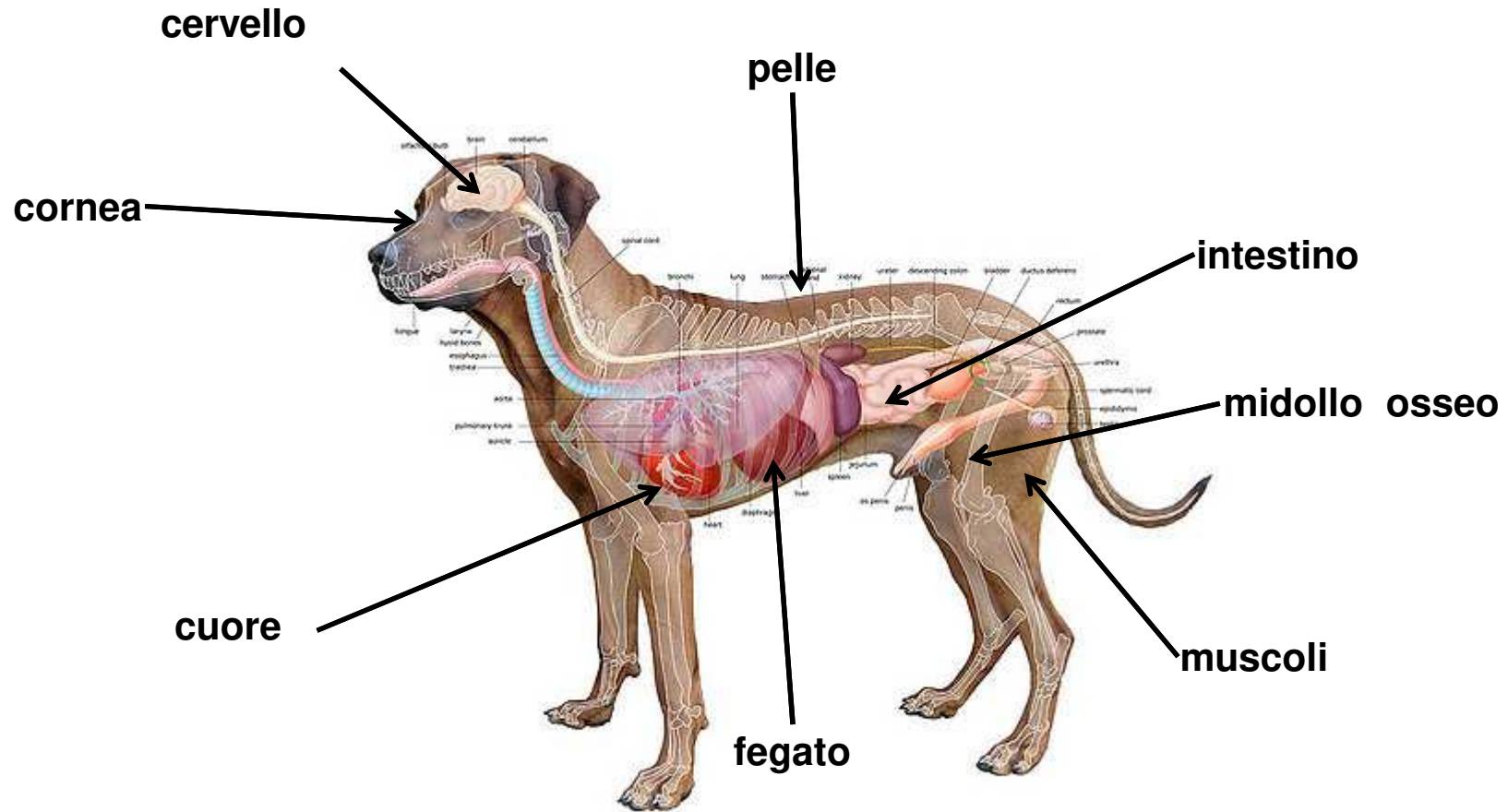
Recentemente, la medicina rigenerativa ha suscitato un crescente interesse per la capacità di riparare, sostituire e rigenerare tessuti danneggiati o organi funzionalmente compromessi da malattie, invecchiamento e traumi.

In medicina veterinaria, così come in medicina umana, tra le applicazioni cliniche più promettenti ed ampiamente utilizzate della Medicina Rigenerativa troviamo i derivati piastrinici (es. Plasma Ricco in Piastrine, Gel Piastrinico e Lisato Piastrinico), le terapie cellulari (Cellule Staminali Mesenchimali) e le terapie di immunomodulazione (es. Secretomi), da sole o in combinazione tra loro.

Le capacità riparative delle Cellule Staminali Mesenchimali (embrionali, fetali e adulte; autologhe o eterologhe) sono state valutate in numerose applicazioni cliniche come per le patologie ortopediche, cardiovascolari, neurologiche, autoimmuni, infiammatorie ecc...



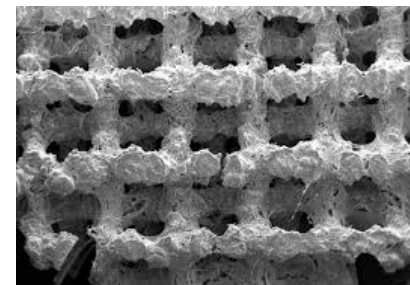
NICCHIE DI STAMINALI NELL'ANIMALE ADULTO



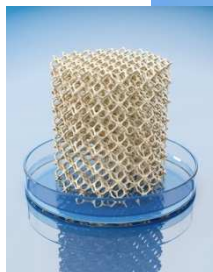


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

SCAFFOLD



supporto in cui vengono generalmente impiantate le cellule e fornisce



BIOCOMPATIBILI

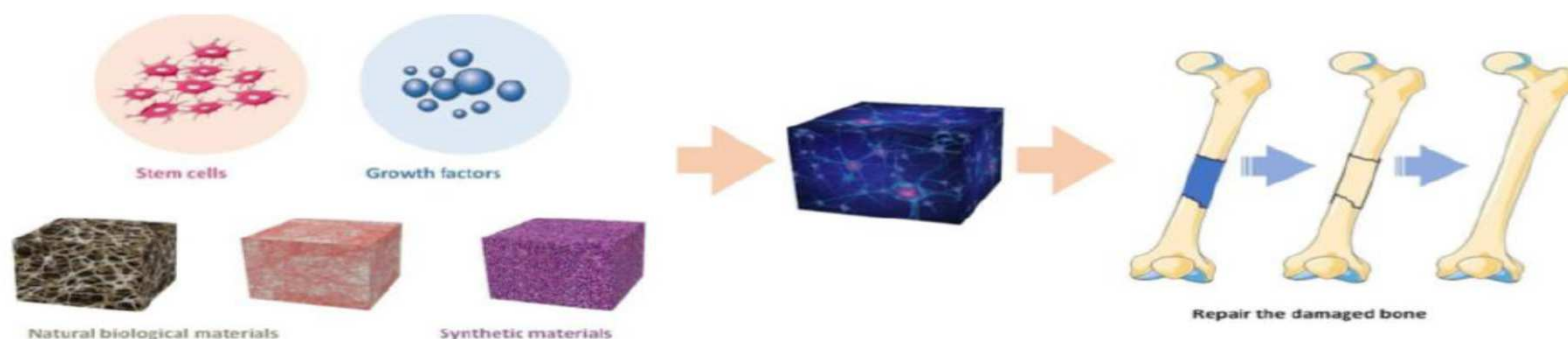




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Le cellule staminali possono essere utilizzate da sole o in combinazione con biomateriali tridimensionali altamente innovativi, come scaffold (solida, liquida e semiliquida), contenenti fattori bioattivi, in grado di determinare l'ambiente tridimensionale più adatto a favorire la rigenerazione cellulare e la differenziazione delle cellule staminali in cellule specializzate del tessuto lesionato.

Per l'ingegneria del tessuto scheletrico, sono stati sviluppati diverse piattaforme di bio-fabbricazione per la progettazione e la produzione di scaffold porosi specifici del tessuto (stampanti 3D basate su di ricostruzione 3D, CAD (Computer-Aided Design, Progettazione Assistita da Computer) e CAM (Computer-Aided Manufacturing, Fabbricazione Assistita dal Computer).





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

-Introduzione

-Obiettivi

-Materiali & Metodi

-Risultati

-Impatto e Trasferibilità Operativa

-Conclusioni





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

- Sviluppo di protocolli di isolamento ed amplificazione *in vitro* di cellule staminali isolate da vari siti di origine per valutarne la capacità rigenerativa sia *in vitro* e che *in vivo*;
- Realizzazione di scaffold con attività osteoinduttiva e antimicrobica per un loro impiego nei processi d'ingegnerizzazione del tessuto osseo;
- Valutazione della biocompatibilità degli scaffold realizzati (differenziamento, analisi di espressione per i marcatori genetici specifici ecc...);
- Conferma dell'efficacia dell'uso delle cellule staminali nell'ambito del trattamento terapeutico delle patologie ortopediche in medicina veterinaria.





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

-Introduzione

-Obiettivi

-Materiali & Metodi

-Risultati

-Impatto e Trasferibilità Operativa

-Conclusioni



ISOLAMENTO E PRODUZIONE DI CELLULE STAMINALI



Impianto nel sito
della lesione



Sito prelievo:
Tessuto adiposo
Midollo osseo
Tessuto cartilagineo
Cordone ombelicale

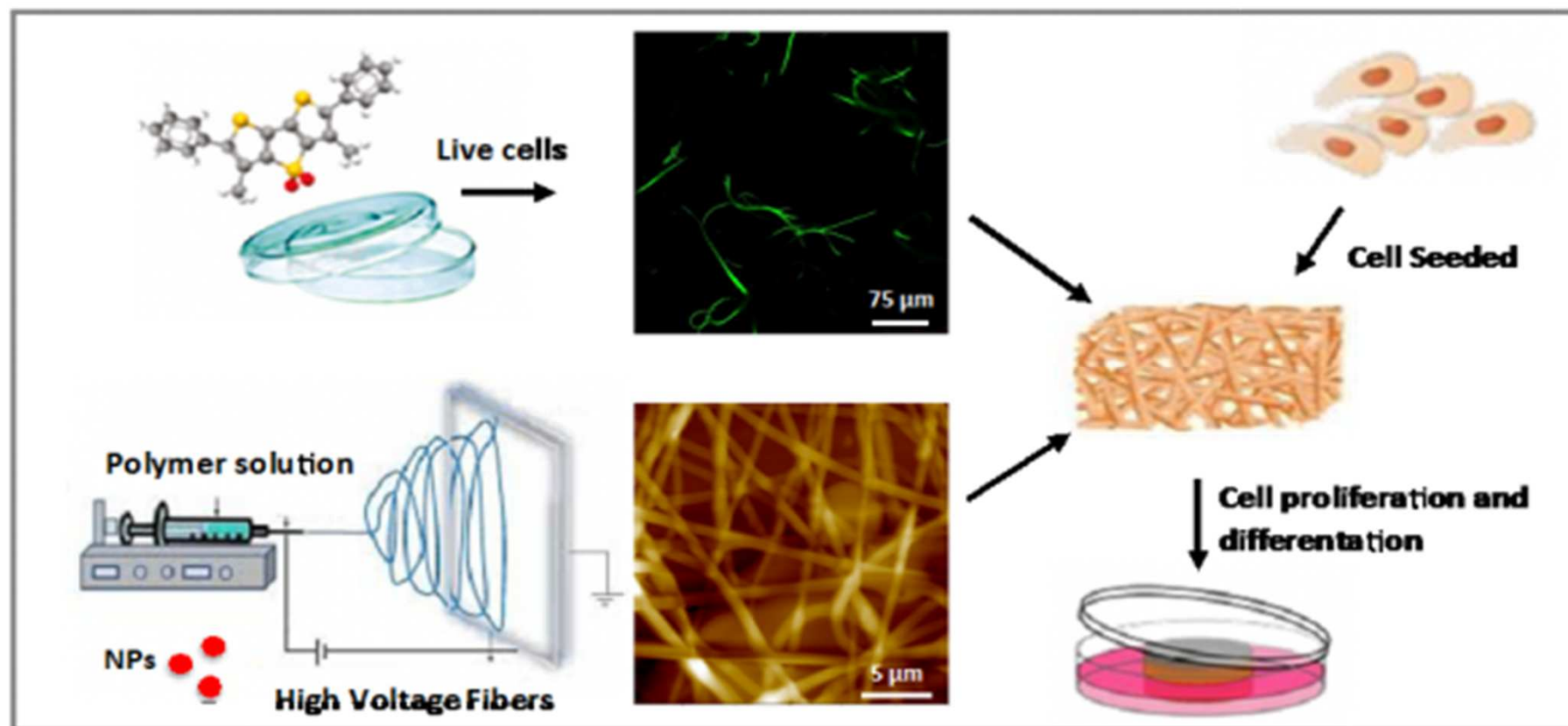


Digestione
enzimatica e
centrifugazione

Crescita delle cellule
staminali
+
DIFFERENZIAMENTO NEI
DIVERSI LINEAGE



Realizzazione di scaffold e studi di biocompatibilità





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

-Introduzione

-Obiettivi

-Materiali & Metodi

-Risultati

-Impatto e Trasferibilità Operativa

-Conclusioni





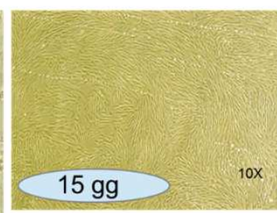
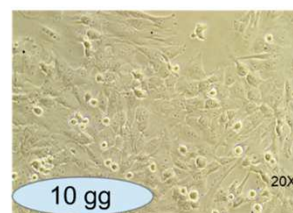
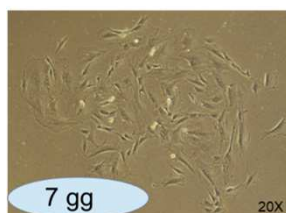
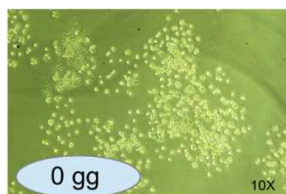
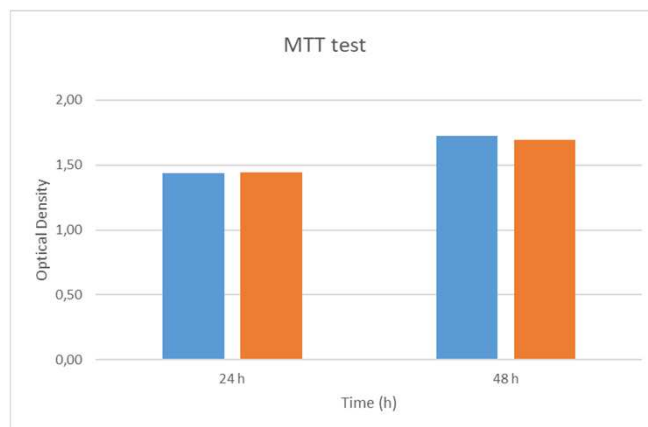
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Scaffold prodotti e caratterizzati da un punto di vista
strutturale, chimico-fisico e biologico:

a) AP40,

b) RKKP,

c) biovetro-Cu.



Differenziamento:	Osteogenico	Adipogenico	Condrogen
MMSC cane + AP40			
MMSC cane + RKKP			
MMSC cane + biovetro-Cu			
DOC + AP40			
DOC + RKKP			
DOC + biovetro-Cu			

L'effetto degli scaffold sul potenziale differenziativo delle cellule staminali isolate nei tre *lineage* (adipogenico, condrogenico e osteogenico) è stata evidenziata, dopo opportuna stimolazione, sia mediante colorazione del monostrato cellulare, sia mediante la rilevazione di RNA specifici.

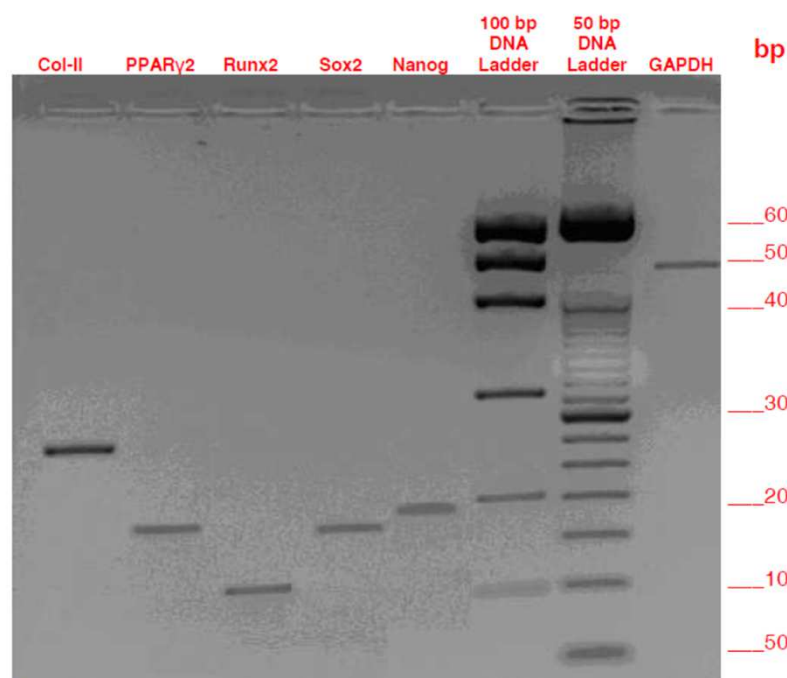




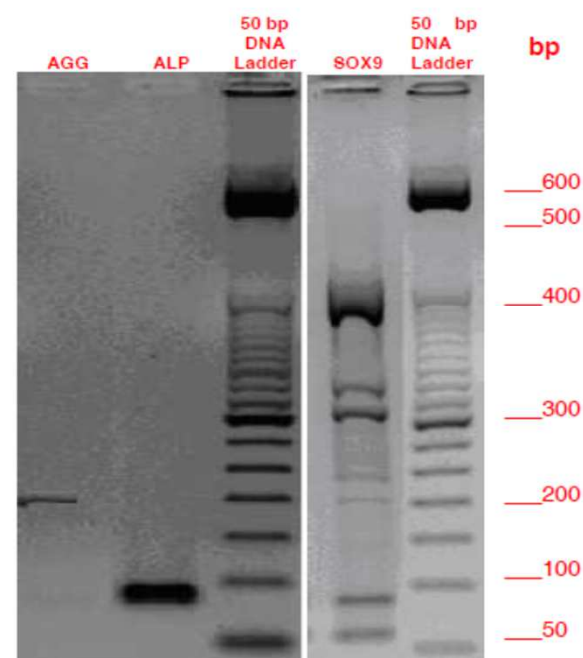
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

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

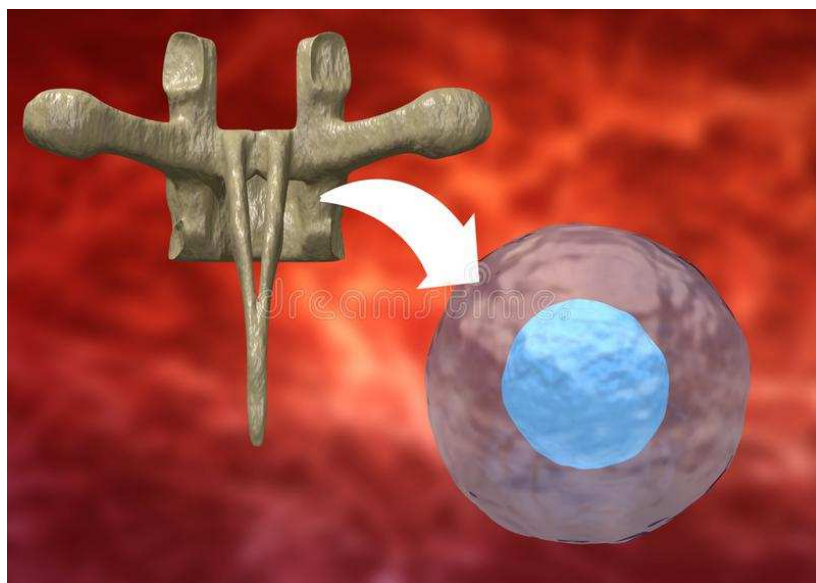


Prodotti di amplificazione in PCR in gel di agarosio

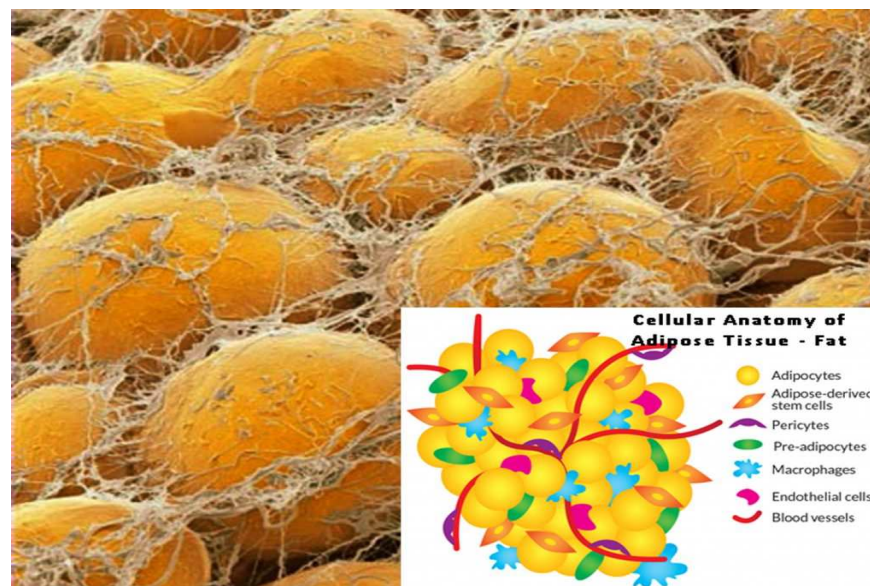


MATRICI TRATTATE.....

MIDOLLO OSSEO



TESSUTO ADIPOSO



RACCOLTA DEL MATERIALE BIOLOGICO

STERILITA'!!!!



***IDENTIFICAZIONE
UNIVOCA***

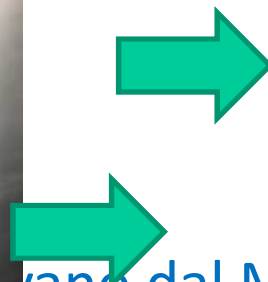
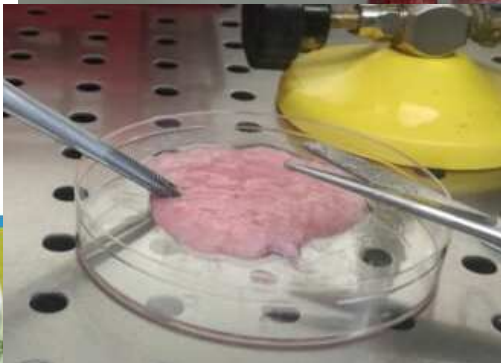
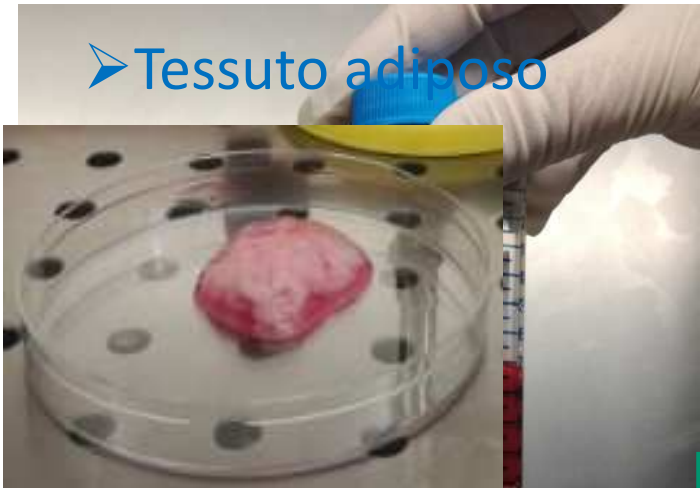
***INFORMAZIONI
DETTAGLIATE***



Possibili fonti per l'isolamento delle MSC:

➤ Midollo Osseo

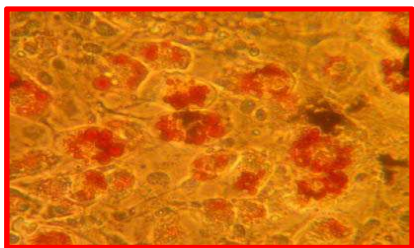
➤ Tessuto adiposo



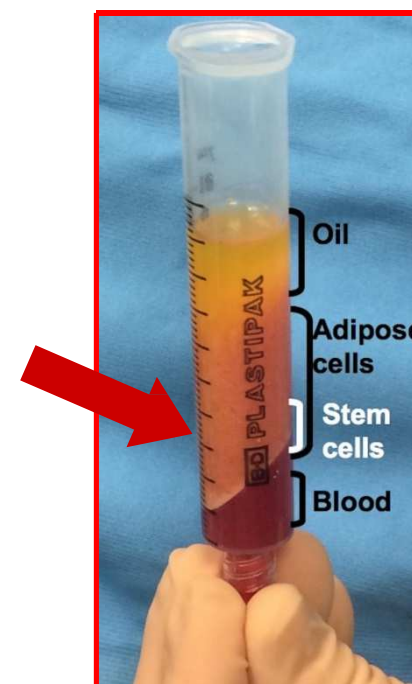
vano dal M



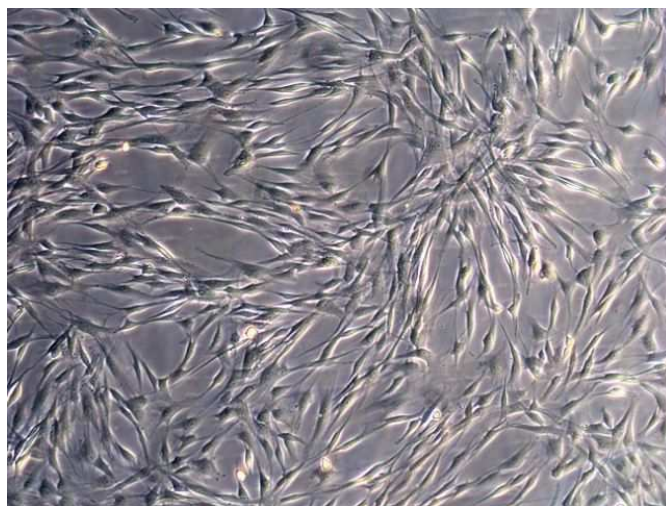
Vantaggi dell'uso del tessuto adiposo come sito di prelievo



- Accesso chirurgico semplice
- Alto rapporto numero cellule staminali/mL
- Bassa morbidità del sito di prelievo



DOSI TERAPEUTICHE





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

UTILIZZO DELLE MSC

VIE DI SOMMINISTRAZIONE:

➤ **TOPICHE:** intralesionale,
microcircolo (es. tendini)



➤ **SISTEMICHE:** endovenosa,
endoarteriosa, intraperitoneale



Sono stati ottimizzati i protocolli di isolamento, crescita e differenziamento delle cellule staminali mesenchimali isolati da diversi tessuti.

Casi clinici

Le cellule staminali mesenchimali autologhe sono state utilizzate soprattutto per la riparazione di lesioni tendino-legamentose, osteo-articolari e cartilaginee. Le specie di interesse sono state la canina, la felina e la equina.

Gli animali candidati per il trattamento con terapia cellulare sono stati accuratamente visitati e sottoposti ad esami preliminari al fine di inquadrare correttamente la patologia.

Nell'ambito di questo progetto sono stati trattati con successo 28 animali, di cui 14 cavalli, 11 cani e 3 gatti con cellule staminali mesenchimali autologhe.



Nessun paziente ha manifestato alcuna reazione avversa in seguito al trattamento, la maggioranza degli animali, oggetto dello studio, ha mostrato un netto miglioramento, già entro le 24h successive al trattamento. L'immediata efficacia, in tempi così brevi, del trattamento, è stata valutata come probabile effetto dell'intrinseca attività antinfiammatoria delle MSC utilizzate.

	Cavallo	Cane	Gatto
Osteolisi	3		
Desmopatia	4		
Cisti	1	1	
Lesione legamento	3	3	
Fratture	3	3	
Pseudoartrosi		1	
Artropatia degenerativa		1	
Osteocondrite		2	
Sublussazione			2
Artrosi			1
TOTALE	14	11	3





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

Cavalli Trattati:

Paziente LA BADIA, età 1 anno: Patologia: **osteolisi** aspetto abassiale dell'osso **sesamoideo** principale mediale anteriore; si esegue impianto di gel piastrinico e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica. Ha ricominciato a correre e vincitrice della più importante corsa per tre anni nella sua categoria.

Paziente GIANT DREAMS, età 1 anno: Patologia: **osteolisi** aspetto abassiale dell'osso sesamoideo principale mediale anteriore; si esegue impianto di gel piastinico e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica. Ha corso alcune corse di buon livello a 2 e 3 anni.

Paziente BIR BAR 16, età 1 anno: Patologia: **osteolisi** aspetto abassiale dell'osso sesamoideo principale mediale anteriore sinistro; si esegue impianto di LISATO PIASTRINICO e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica. Ha corso a 2 e 3 anni in Inghilterra. Debutto vincente a 2 anni.

Paziente ASETH, età 5 anni: Patologia: **desmopatia** della branca mediale del **legamento** sospenditore del posteriore; si esegue impianto di LISATO PIASTRINICO e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Follow up ecografico positivo e ripresa attività sportiva ma declassato.

Paziente EVOLUTION, età 10 anni: Patologia: **desmopatia** della branca laterale del legamento sospenditore dell'anteriore destro; si esegue impianto di LISATO PIASTRINICO e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica. Follow up ecografico e clinico positivo.

Paziente SWANZI, età 14 anni: Patologia: **desmopatia** della tendinopatia dell'area sub carpica del tendine flessore superficiale delle falangi di entrambi gli arti anteriori; si esegue impianto di LISATO PIASTRINICO e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica. Follow up radiografico e clinico positivo.

Paziente NOHE, età 8 anni: Patologia: **desmopatia** della branca laterale del legamento sospenditore del nodello; si esegue impianto di LISATO PIASTRINICO e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica. Follow up ecografico e clinico positivo.

Paziente EVOLUTION, età 1 anno: Patologia: **ciste subcondrale** troclea laterale dell'astragalo del posteriore sinistro; si esegue impianto di LISATO PIASTRINICO e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica. Follow up radiografico e clinico positivo.





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

Cani Trattati:

- 1) Paziente SCOTT, età 2 anni: Patologia: Lesione **legamento** crociato parziale. Trattamento: Inoculo PRP intrarticolare. Esito: assenza di reazione avversa. Miglioramento clinico e restitutio ad integrum in 2 mesi. Follow up ecografico e clinico positivo. Ottima ripresa attività fisica.
- 2) Paziente THOR, età 3 anni: Patologia: Lesione **legamento** crociato parziale con artrosinovite settica traumatica. Trattamento: Inoculo PRP intrarticolare. Esito: assenza di reazione avversa. Miglioramento clinico e restitutio ad integrum dopo 3 mesi. Follow up ecografico e clinico positivo. Ottima ripresa attività fisica.
- 3) Paziente NINA, età 3 anni: Patologia: **Lesione legamento** crociato pregressa/cronica con artrosi articolare. Trattamento: Inoculo PRP e AMSC intrarticolare. Esito: assenza di reazione avversa. Dopo 30 giorni miglioramento della sintomatologia dolorifica. Buona ripresa attività fisica.
- 4) Paziente TIMOTHY, età 5 mesi: Patologia: **Frattura** a legno verde metafisaria omero. Trattamento: Inoculo di PRP e AMSC autologhe intralesionale tramite centesi a cielo chiuso, e fasciatura immobilizzante l'arto interessato. Esito: assenza di reazione avversa. Restitutio ad integrum in meno di 2 mesi. Follow up radiografico e clinico positivo.
- 5) Paziente NEVE, età 10 mesi: Patologia: **Frattura** scomposta non esposta radio - carpo prossimale. Trattamento: Inoculo AMSC intralesionale a cielo chiuso e fasciatura rigida dell'arto. Esito: assenza di reazione avversa. Assenza di sintomatologia dolorifica e restitutio ad integrum della lesione in 2 mesi. Follow up radiografico e clinico positivo. Ottima ripresa attività fisica.
- 6) Paziente SERGIO, età 13 anni: Patologia: Recidiva di **frattura** omerale distale, sottoposto precedentemente a 2 interventi di osteosintesi senza risoluzione; Trattamento: si esegue osteosintesi con fissatore esterno di Ilizarov ed impianto di AMSC in Gel Piastrinico. Esito: assenza di reazione avversa. Progressivo miglioramento e guarigione in 3 mesi. Follow up radiografico e clinico positivo. Ottima ripresa attività fisica.





- 7) Paziente NINA, età 3 anni: Patologia: **pseudoartrosi** per mancato consolidamento frattura metafisaria di radio e di ulna. Il soggetto è stato operato in precedenza 3 volte senza risoluzione della patologia. Trattamento: Inoculazione transcutanea a cielo chiuso di PRP, AMSC autologhe ed idrossiapatite; segue fasciatura rigida. Esito: assenza di reazione avversa. Dopo un mese comincia a formarsi callo osseo.
- 8) Paziente WILD, età 6 anni: Patologia: **Artropatia degenerativa** coxo-femorale bilaterale. Trattamento: Inoculo di PRP e AMSC autologhe intrara-aticolare. Esito: assenza di reazione avversa. Zoppia clinicamente migliorata.
- 9) Paziente EL CICO, età 1 anno: Patologia: **Osteocondrite** dissecante omerale (articolazione scapolo-omerale); Trattamento: si esegue impianto di AMSC per artrocentesi. Esito: assenza di reazione avversa. Follow up radiografico e clinico positivo. Ottima ripresa attività fisica. Guarigione clinica in 2 mesi.
- 10) Paziente ROXY, età 10 mesi: Patologia: **Osteocondrite** dissecante condilo mediale femorale; Trattamento: si esegue curettage chirurgico ed impianto di CMSC in fibrina autologa, fatta coagulare in situ tramite cloruro di calcio. Esito: assenza di reazione avversa. Follow up radiografico e clinico positivo. Ottima ripresa attività fisica. A distanza di 2 anni dall'impianto il cane ha una vita regolare e non manifesta zoppie sull'arto interessato.
- 11) Paziente Cico, età 8 mesi: Patologia: **ciste subcondrale** femorale; si esegue impianto di gel piastinico, idrossiapatite e CSM. Esito: assenza di reazione avversa. Ottima ripresa attività fisica in meno di 2 mesi. Follow up radiografico e clinico positivo. Guarigione completa in 5 mesi.



Gatti Trattati:

1)Paziente WINGSTON, età 6 mesi: Patologia: **Sublussazione** traumatica carpo; Trattamento: si esegue una somministrazione di PRP per artrocentesi e fasciatura rigida dell'arto. Esito: assenza di reazione avversa. Follow up clinico positivo. Guarigione completa in 2 mesi.

2)Paziente TOBIA, età 11 anni: Patologia: **Sublussazione** traumatica carpo; Trattamento: si esegue una somministrazione di PRP per artrocentesi e fasciatura rigida dell'arto. Esito: assenza di reazione avversa. Follow up clinico positivo. Guarigione completa in 1 mese e mezzo.

3)Paziente NICOLINO, età 9 anni: Patologia: **Artrosi** carpo, zoppia anteriore altalenante cronica; Trattamento: si esegue una somministrazione di PRP per artrocentesi. Esito: assenza di reazione avversa. Follow up clinico positivo. Guarigione completa in 1 mese ed assenza di recidive cliniche a distanza di 2 anni dal trattamento



-Introduzione

-Obiettivi

-Materiali & Metodi

-Risultati

-Impatto & Trasferibilità Operativa

-Conclusioni



- Gli scaffold studiati, grazie alle proprietà bioattive, sono candidati molto promettenti per l'utilizzo in medicina rigenerativa del tessuto osseo.
- I metodi di isolamento e coltivazione delle cellule staminali mesenchimali, nonché i protocolli terapeutici, **contribuiranno a ridurre l'estemporaneità e l'empirismo** che hanno spesso caratterizzano numerosi tentativi di approccio nella pratica veterinaria di campo. Inoltre, tali protocolli potrebbero costituire un modello applicativo anche per gli studi e la terapia con cellule staminali in medicina umana.





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

-Introduzione

-Obiettivi

-Materiali & Metodi

-Risultati

-Impatto e Trasferibilità Operativa

-Conclusioni



CONCLUSIONI:

- Sviluppo di protocolli di isolamento e differenziazione di cellule staminali mesenchimali (prelevate da tessuto adiposo, midollo osseo, tessuto cartilagineo, cordone ombelicale e tessuto nervoso) nei *lineage* condrogenico, osteogenico ed adipogenico.
- Individuazione di tessuti (tessuto adiposo e midollo osseo) più ricchi di cellule staminali mesenchimali
- Sintetizzazione e studio nuovi scaffold al fine di ampliare il campo di applicazione delle cellule staminali mesenchimali, nei casi in cui la sola terapia cellulare non fosse sufficiente.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Grazie per l'attenzione...



"Of course your knees hurt, it's all that
darn jumping up and down!"





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

26-11-2013

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 277

DECRETI E DELIBERE DI ALTRE AUTORITÀ

CONFERENZA PERMANENTE PER I RAPPORTI TRA LO STATO, LE REGIONI E LE PROVINCE AUTONOME DI TRENTO E BOLZANO

ACCORDO 17 ottobre 2013.

Linee guida concernenti i requisiti sanitari minimi per
l'impiego delle cellule staminali in medicina veterinaria.
(Repertorio atti n. 147/CSR).

LA CONFERENZA PERMANENTE
PER I RAPPORTI TRA LO STATO,
LE REGIONI E LE PROVINCE AUTONOME
DI TRENTO E BOLZANO

Sancisce accordo:

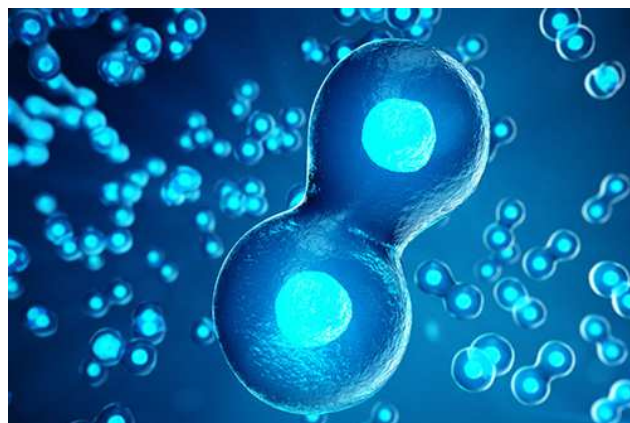
Tra il Governo, le regioni e le province autonome di
Trento e di Bolzano sulla proposta di accordo del Mini-
stro della salute recante «Linee guida concernenti i requi-
siti sanitari minimi per l'impiego delle cellule staminali
in medicina veterinaria», di cui all'allegato A, parte inte-
grante del presente atto.

Roma, 17 ottobre 2013

Il presidente
DELRIO

Il segretario
MARINO

ALLEGATO



**Cellule staminali adulte di origine
autologa (soggetto donatore e
ricevente coincidono) come
previsto dalle linee guida
Ministeriali (Reg. atti n. 147 CSR del
17.10.2013)**

