



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Medico Veterinarie

CICLO XXXVI

**ISOLAMENTO DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DA TESSUTO
ADIPOSO
DI TARTARUGA PALUSTRE AMERICANA (*Trachemys scripta*) PRELEVATO
DURANTE INTERVENTO DI ORCHIECTOMIA ED OVARIOSALPINGECTOMIA
LAPAROSCOPICA**

**ISOLATION, IN VITRO EXPANSION AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF
MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM ADIPOSE TISSUE OF POND SLIDERS
(*Trachemys scripta*) OBTAINED DURING ROUTINE NEUTERING**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Gaetano Donofrio

Tutore:

Chiar.mo Prof. Di Ianni Francesco

Dottorando:

Alessandro Vetere

Anni Accademici 2020/2021 – 2022/2023

Sommario

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	6
MSC E MEDICINA RIGENERATIVA	6
MSC: CELLULE STROMALI MESENCHIMALI	7
Potenziale di differenziazione	7
Cellule staminali totipotenti	7
Cellule staminali pluripotenti	7
Cellule staminali multipotenti	8
Cellule staminali unipotenti	8
Origine	8
LE CELLULE STAMINALI MM M A g m , m) mZ m ...M)..M).....,.....).G.M..9 , I	9
CRITERI MINIMI DI DEFINIZIONE DELLE MSC	12
CITOFUORIMETRIA A FLUSSO	14
MSC: SITI DI PRELIEVO NELLE VARIE SPECIE	15
m M , m M) G M M) A) A) Z ,.....m.....).M)..... 21 M m,	21
Homing e Migrazione	22
Effetto paracrino	24
Trasferimento mitocondriale	25
Interazione tra sistema immunitario e MSC (Immunomodulazione)	25
Secretoma	28
Vescicole extracellulari	29
APPLICAZIONE CLINICA DELLE MSC: RUOLO NELLA MEDICINA RIGENERATIVA	31
VIE DI SOMMINISTRAZIONE	31
Somministrazione topica	31
Somministrazione sistemica	32
CELLULE ALLOGENICHE VS CELLULE AUTOLOGHE: PRO E CONTRO	35
SICUREZZA E ASPETTI REGOLATORI DELLE TERAPIE A BASE DI CELLULE STAMINALI IN MEDICINA	
VETERINARIA	36
USO DELLE MSC IN MEDICINA VETERINARIA	37
Patologie del sistema muscolo-scheletrico	38
Patologie a carico.....d.e.l.l.'a.p.p.a.r.a.t.o.....d.i.g.e.r.e.n.t.e.....	40

Epatopatie	41
Nefropatie	42
Patologie cardiache	43
Patologie respiratorie.....	43
Patologie spinali e disordini neuromuscolari	44
Rigenerazione tissutale in corso di patologie cutanee.....	45
Apparato riproduttore	47
TRACHEMYS SCRIPTA	47
Attuazione del piano	49
<i>MATERIALI E METODI</i>.....	50
SCELTA E PREPARAZIONE DEI SOGGETTI DONATORI.....	50
Procedura chirurgica	53
GESTIONE POST-OPERATORIA DEI SOGGETTI	58
VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEL CAMPIONE DI TESSUTO ADIPOSO.....	58
PREPARAZIONE DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO.....	59
Attrezzatura e strumenti utilizzati.....	59
Reagenti per colture cellulari (GIBCO)	60
Soluzioni di lavoro	60
PROCESSAZIONE DEL TESSUTO ADIPOSO	61
Digestione enzimatica	61
Isolamento di MSC da frammenti di tessuto adiposo	64
CRESCITA DELLE COLONIE CELLULARI	65
TRIPSINIZZAZIONE E CONTA DELLE COLONIE	65
CONGELAMENTO DEI CAMPIONI	68
PREPARAZIONE DEL PLASMA ARRICCHITO DI TROMBOCITI E LEUCOCITI	68
PROVE IN VITRO.....	69
Adesione al substrato e crescita in vitro	69
CONTA DELLE UNITA' FORMANTI COLONIA (CFU)	70
ANALISI DELLA CAPACITA' DI DIFFERENZIAMENTO DELLE MSC.....	71
EFFETTI DELLA CRIOCONSERVAZIONE DELLE MSC.....	72
VALUTAZIONE DELLA ESPRESSIONE GENICA.....	73
ESTRAZIONE RNA	73

RETRO TRASCRIZIONE	75
Primers utilizzati per la PCR:	76
PREPARAZIONE GEL AGAROSIO E CORSA ELETTROFORETICA	79
Preparazione del gel.....	79
Sequenziamento	80
DATI E ANALISI STATISTICA.....	81
<i>RISULTATI</i>	<i>81</i>
CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE	81
CURVE DI CRESCITA.....	86
CFU	91
Sopravvivenza al congelamento.....	92
DIFFERENZIAZIONI	93
Differenziazione in senso adipocitico.....	93
Differenziazione in senso condrogenico	95
Differenziazione in senso osteogenico.....	97
ESPRESSIONE GENICA.....	99
<i>DISCUSSIONE.....</i>	<i>103</i>
<i>CONCLUSIONE.....</i>	<i>110</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>111</i>

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are of strong clinical interest in veterinary regenerative medicine. Currently, there are no published studies about their isolation and characterization in reptiles. The aim of this work was to evaluate the feasibility of the isolation of adipose tissue-MSCs obtained from male and female pond sliders (*Trachemis scripta*) during a routine neutering. Five fat tissue samples (obtained from five animals) were collected during elective neutering. Fat fragments were processed, and the cell suspension was harvested and incubated at 28°C in a professional humidified incubator. Cell growth rate was characterized by direct cell counting. The cells were successfully differentiated into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. Cell phenotype was characterized by RT-PCR and amplicon sequencing of a panel of markers routinely used for mammalian MSCs characterization. Blood cells were used to validate primers for genes not expressed in MSCs. CFU forming ability was evaluated in low density cell cultures.

Cells exhibited the capacity to undergo differentiation into adipocytic, chondrogenic, and osteogenic lineages. The cells exhibited the expression of CD105, CD73, CD44, and CD90, while lacking the expression of CD34 and HLADRA. The sequence homology exceeded 98% with sequences reported for the *Trachemys scripta* genome. This is the first study regarding the isolation, in vitro expansion and characterization of reptile MSCs obtained from fat tissue. These preliminary data strongly suggest that the isolation of MSCs-like cells from chelonian fat tissue is feasible, opening new perspectives for their potential application in the field of regenerative medicine, for both pet and wild endangered reptile species.

INTRODUZIONE

MSC E MEDICINA RIGENERATIVA

La medicina rigenerativa è branca della medicina umana o animale che si occupa dei processi di rigenerazione cellulare e riparazione tissutale al fine di ripristinarne la normale funzione (Mason C and Dunnill P., 2008). Essa indaga inoltre su potenziali trattamenti atti a guarire o sostituire i tessuti e gli organi danneggiati dall'età, da malattie croniche o da patologie traumatiche, nonché per normalizzare i difetti congeniti. Esistono ad oggi promettenti dati preclinici e clinici a supporto della possibilità di trattare sia malattie acute che croniche in una vasta gamma di sistemi di organi e contesti, comprese le ferite cutanee, malattie cardiovascolari e traumi (Mason C and Dunnill P., 2008) (Vacanti JP et al., 2014). Possiamo distinguere tre principali rami facenti parte della medicina rigenerativa:

1. **Terapia cellulare:** Questa tecnologia basata sull'utilizzo di cellule (ad esempio, cellule staminali) o loro derivati come il plasma arricchito di piastrine (PRP) o plasma arricchito di piastrine e leucociti (TLRP) al fine di adjuvare il processo di rigenerazione dei tessuti danneggiati, ad esempio nel trattamento delle lesioni del midollo spinale, delle malattie cardiache e di altre condizioni patologiche.
2. **Ingegneria tissutale:** Questo ramo della medicina rigenerativa si concentra sulla creazione di tessuti artificiali o organi in laboratorio per sostituire quelli danneggiati o malati nel corpo umano. L'ingegneria dei tessuti coinvolge la coltivazione di cellule in vitro su strutture tridimensionali chiamate "scaffolds", che fungono da supporto per la crescita e la differenziazione delle cellule.
3. **Terapia genica:** Questo approccio coinvolge la modifica genetica delle cellule per correggere difetti genetici o promuovere la guarigione. Nel loro utilizzo possono essere p

utilizzato per trattare malattie genetiche ereditarie, come la fibrosi cistica, così come per indurre la produzione di fattori di crescita per la rigenerazione dei tessuti.

In questo lavoro di tesi verrà discusso l'isolamento di cellule staminali da tessuto adiposo di tartaruga palustre americana (*Trachemys scripta*) prelevato durante intervento routinario di ovariosalpingectomia laparoscopica. Possibili applicazioni future come terapia cellulare nel campo della medicina rigenerativa verranno analizzate e trattate.

MSC: CELLULE STROMALI MESENCHIMALI

Le cellule staminali sono descritte come entità cellulari multipotenti, capaci di autorinnovarsi o differenziarsi in una vasta gamma di tipi cellulari presenti nei diversi tessuti del corpo. A differenza delle linee cellulari progenitrici, di natura transitoria (Van Der Kooy and Weiss 2000), le cellule staminali conserveranno queste caratteristiche per tutta la vita dell'individuo.

Le cellule staminali possono essere classificate in due categorie: la prima riguarda il loro potenziale di differenziazione, la seconda considera la loro origine.

Potenziale di differenziazione

Can, nel 2008 ha proposto una classificazione delle cellule staminali che considera il potenziale differenziativo, ovvero in base alla loro capacità di diventare totipotenti, pluripotenti, multipotenti o unipotenti (Can 2008).

Cellule staminali totipotenti

Si definisce totipotente una cellula transiente, non espandibile come tale, che possiede inoltre la capacità di generare ogni tipo di elemento cellulare che costituisce i tessuti extraembrionali. Le cellule totipotenti includono quelle presenti nella morula.

Cellule staminali pluripotenti

Un esempio di cellule pluripotenti sono le cellule del bottone embrionario, in quanto hanno la capacità di dare origine a tutte e tre i foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma) da cui si sviluppano tutti i diversi tipi cellulari nell'organismo.

Cellule staminali multipotenti

Sono considerate multipotenti le cellule staminali in grado di differenziarsi in diversi tipi cellulari sia in vivo che in vitro. Riconosciamo:

1. Cellule staminali ematopoietiche (HSCs)
2. Cellule staminali neurali (NSCs)
3. Cellule stromali mesenchimali (MSCs)

Cellule staminali unipotenti

Cellule che possono differenziarsi esclusivamente in un solo tipo cellulare. Riconosciamo:

1. Cellule epiteliali corneali
2. Cellule progenitrici corneali

Origine

Il secondo metodo di classificazione delle cellule staminali ne prende in considerazione l'origine. In base a tale criterio, riconosciamo:

1. Cellule staminali embrionali (ESC)
2. Cellule staminali provenienti da un feto o da un individuo adulto, nominate anche cellule staminali tessuto-specifiche (TSSCs)

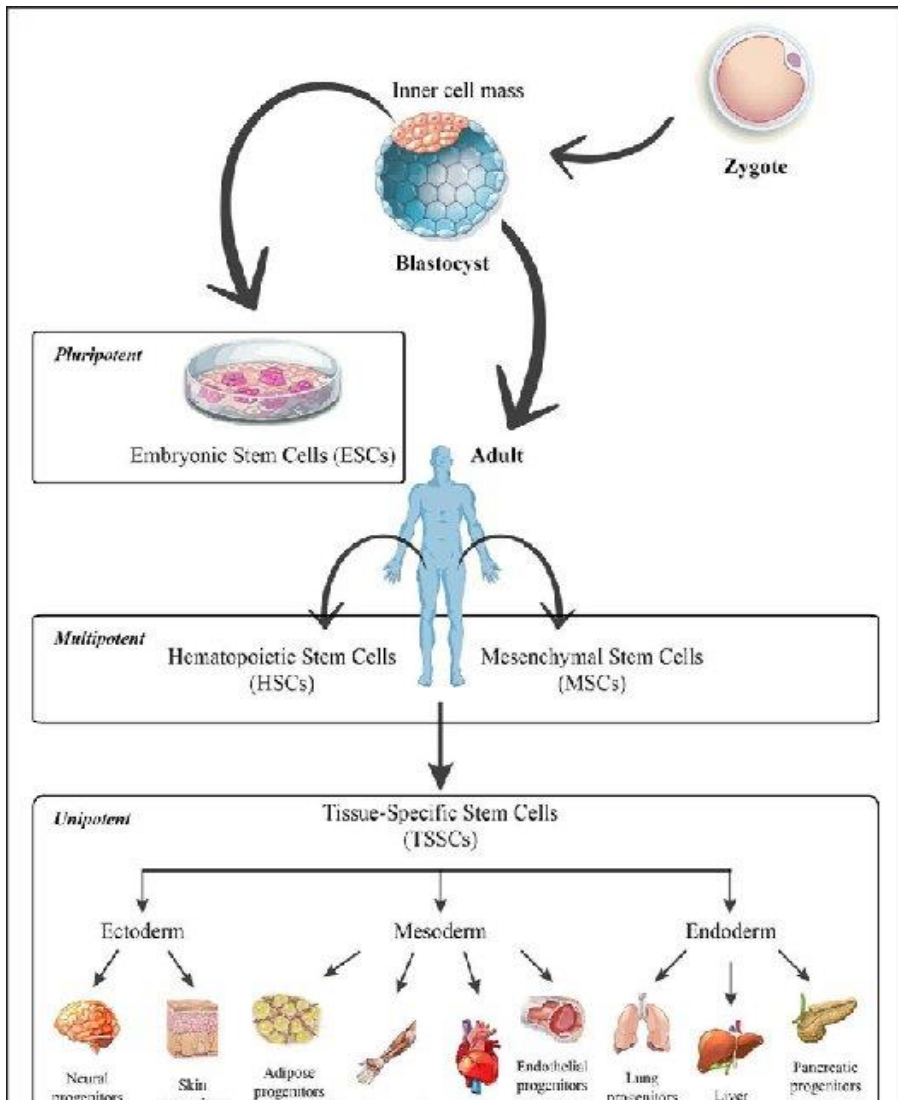


Figura : Le cellule staminali sono classificate in tre tipi principali: cellule staminali pluripotenti, che sono cellule staminali embrionali (ESCs) provenienti dalla blastocisti; cellule staminali multipotenti, che includono le cellule staminali ematoietiche (HSCs) e le cellule staminali mesenchimali (MSCs) (Perez LM et al., 2018).

LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI: ORIGINE E

Alla fine degli anni '80, si osservò in un modello murino che il trapianto di cellule nel midollo osseo a livello della capsula renale dava origine non solo al midollo, ma anche

tessuto osseo (Andrzejewska, Lukomska, and Janowski 2019). Nacque così la teoria dell'esistenza e del rigenerare tessuto osseo. Decise quindi di dare a queste cellule il nome di cellule staminali osteogeniche (Friedenstein Alexander et al. 1968).

Una volta isolate in vitro, queste cellule "fibroblasti" aderenti" in grado di crescere rapidamente in vitro sotto forma di Unità Formanti Colonia (CFU) (Friedenstein, Chailakhjan, and Lalykina 1970).

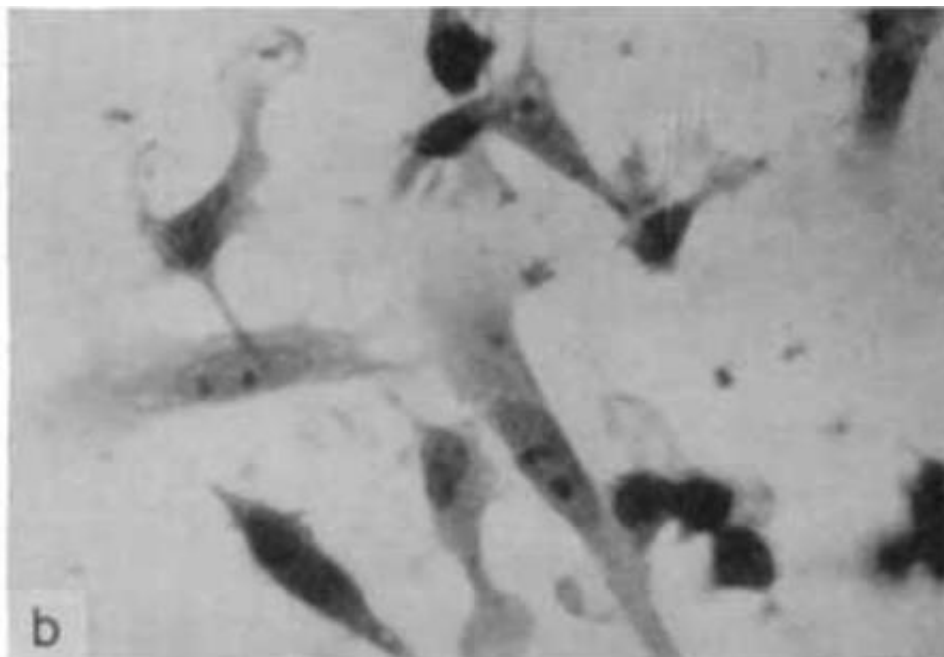


Figura 2: alcune cellule isolate da Friedenstein (Friedenstein, Chailakhjan, and Lalykina 1970).

A pochi anni di distanza venne descritta per la prima volta la capacità differenziativa in vitro di tali cellule. Friedenstein osservò che esse erano in grado di differenziarsi non solo in osteoblasti, ma anche in condrociti e adipociti (Friedenstein, Chailakhjan, and Lalykina 1970).

Quasi 20 anni dopo, Caplan coniò i termini "Cellule stromali mesenchimali" (Caplan 1991) per sottolineare le capacità di tali cellule di potersi differenziare in diversi tessuti connettivi dell'organismo.

Il termine "Cellule Stromali Mesenchimali" è stato coniato da molti autori per riferirsi a una specifica tipologia cellulare. Inizialmente, la terminologia proposta da Caplan si concentrava sulla potenzialità staminale di queste cellule, ossia sulla loro capacità distintiva di replicazione e differenziazione, che le rende particolarmente interessanti per possibili impieghi terapeutici.

Tuttavia, nel corso del tempo, la nomenclatura per queste cellule è diventata piuttosto eterogenea, riflettendo le diverse caratteristiche cellulari legate all'origine e alla capacità staminale. Alcune delle terminologie alternative utilizzate per riferirsi a queste cellule includono:

1. Cellule Stromali Multipotenti: Questa denominazione sottolinea la loro capacità di differenziarsi in diverse linee cellulari.
2. Cellule Stromali Midollari: Questo termine indica l'origine delle MSC dal midollo osseo.
3. Cellule Staminali Mesodermiche: Riflette l'origine embrionale mesodermica di queste cellule, che sono in grado di differenziarsi in tessuti del mesoderma, come ossa, cartilagine e muscoli.
4. Cellule Staminali Mesenchimali: Questo termine è simile a "Cellule Stromali Mesenchimali" ed è spesso utilizzato in modo intercambiabile.

È importante notare che le MSC non sono state isolate solo dal midollo osseo ma anche da numerosi altri tessuti dell'organismo, in particolare dalla componente stromale di vari tessuti. Questa diversità di denominazioni riflette la varietà di fonti e di caratteristiche che possono essere associate a queste cellule.

Nel 2006 l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha pubblicato un articolo che raccomandava l'uso del termine "Cellule stromali mesenchimali multipotenti" (Horwitz et al. 2005) in quanto all'epoca non esisteva un termine standard. Si può notare come nella nuova definizione non sia presente il termine "stromale", in accordo con la nomenclatura attuale (Abdzejewska, Lukomska et al. 2019).

CRITERI MINIMI DI DEFINIZIONE DELLE MSC

Nel 2006, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha pubblicato un articolo intitolato "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy (ISCT) position statement" al fine di stabilire dei criteri minimi per la definizione delle MSC al fine di promuovere la standardizzazione degli studi successivi. Tali criteri sono considerati il minimo requisito indispensabile per definire le colture in vitro delle MSC, ma attualmente, molti altri autori hanno introdotto ulteriori criteri per una definizione più dettagliata e specifica delle MSC.

1) *Crescita in vitro*

Il primo criterio di definizione proposto dalla ISCT riguarda la capacità delle cellule di crescere in vitro formando colonie che aderiscono al fondo delle fiaschette di coltura in plastica in cui sono coltivate. Importante sottolineare come questa caratteristica non sia solamente propria delle MSC, ma possa essere osservata anche in altri tipi cellulari, come ad esempio i fibroblasti (Covas DT et al., 2008). Per questo motivo, le MSC vengono inoltre definite come i *key fibroblastic*

2) *Differenziazione*

Le MSC devono potersi differenziare in vitro in risposta a stimoli specifici di differenziazione tissutale standard, ovvero in risposta a protocolli validati e riconosciuti dalla comunità scientifica. Esse devono quindi poter effettuare una differenziazione in senso adipogenico, condrogenico od osteogenico. Per dimostrare l'avvenimento di metodiche molecolari (PCR), tecniche immunoistochimiche o colorazioni citologiche specifiche come l'Oro Rosso per colorare gli adipociti, l'Alcian Blue per i condrociti o l'Alizarin Red o il Von Kossa per evidenziare focolai di mineralizzazione della matrice extracellulare, è necessario che l'ISCT consiglia di utilizzare protocolli commerciali validati, come kit specifici per la differenziazione cellulare, al fine di garantire la comparabilità tra gli studi condotti.

3) *Espressione/mancata espressione di cluster di differenziazione (CD)*

Nell'articolo della ISCT, vengono delineati i cluster di differenziazione (CD) minimi che devono essere espressi o non espressi per identificare le MSC umane. Gli autori propongono che, per essere classificate come MSC, queste cellule devono mostrare l'espressione di un insieme specifico di geni e, allo stesso tempo, non esprimere altri geni specifici.

Le cellule MSC devono esprimere i seguenti CD:

1. CD105 (Endoglina): Questa proteina di membrana glicoproteica è coinvolta in diversi processi biologici, come l'angiogenesi, la regolazione del ciclo cellulare e la produzione di matrice extracellulare da parte dei condrociti.
2. CD73 (Ecto-5'-nucleotidasi): Questo enzima converte l'adenosina 5'-monofosfato in adenosina ed ha importanti funzioni in vari sistemi biologici, tra cui l'antidolorifico nel sistema nervoso, la protezione dai danni infiammatori nel sistema respiratorio e la cardioprotezione durante danni ischemici.
3. CD90: Questa proteina di superficie cellulare è coinvolta nella regolazione dell'adesione cellulare, della migrazione, dell'apoptosi, della crescita degli assoni e dell'interazione tra cellule e matrice extracellulare. Inoltre, è necessaria nell'attivazione dei linfociti T e nella fibrosi.

Inoltre, è importante che le MSC non esprimano i seguenti CD tipici delle cellule ematopoietiche:

1. CD45 (leucocyte common antigen): Questo è uno dei principali marker di identificazione delle cellule emopoietiche.
2. CD34: Tradizionalmente utilizzato come marker per le cellule staminali emopoietiche, è stato recentemente utilizzato anche come marker per altri tipi di cellule staminali.
3. CD14: Espressa dai monociti e in misura minore dai granulociti polimorfonucleati.
4. CD79 : Parte del recettore per gli antigeni identificare i linfociti B nei mammiferi.
5. HLA-DR: Il complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II, espresso dalle cellule presentanti l'antigene.

Questi criteri sono stati definiti per aiutare a distinguere le MSC da altre tipologie cellulari, in particolare dalle cellule ematopoietiche, e costituiscono una base per la loro identificazione e caratterizzazione in laboratorio.

È importante sottolineare che questi criteri si applicano solo alle MSC umane. Mentre l'adesione e la differenziazione in tre linee differenti (adipociti, condrociti ed osteoblasti) sono caratteristiche evidenziate anche in altre specie, come ad esempio nei topi, l'espressione degli antigeni di superficie (CD) non è stata caratterizzata universalmente (Tropel P et al., 2004).

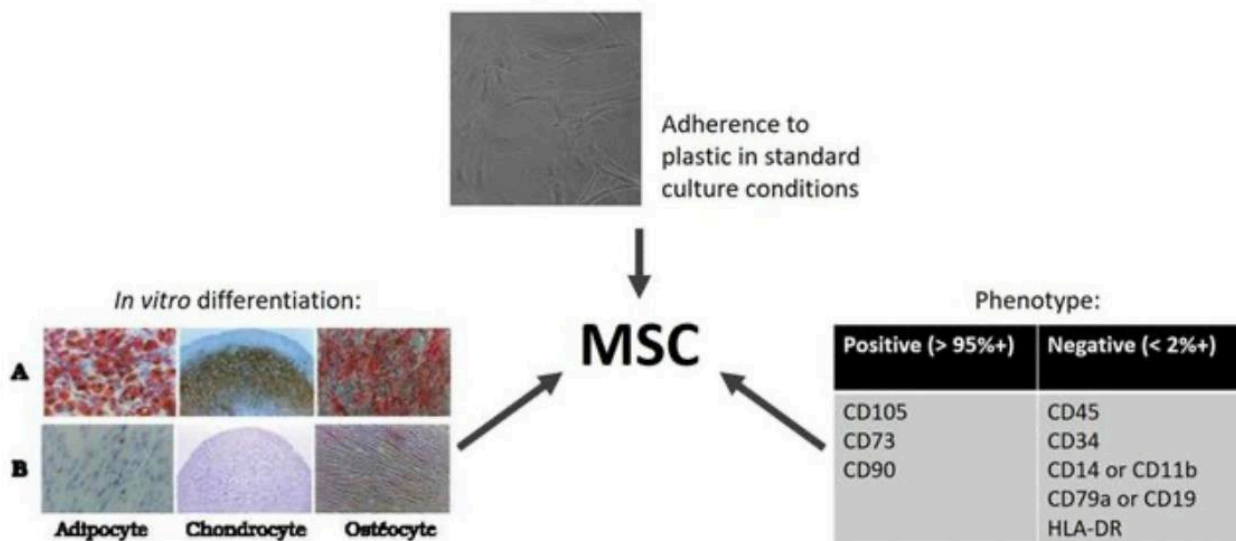


Figura 3: Criteri per definire le MSC secondo le linee guida dell' ISCT. Loubière C. Characterization and impact of the hydrodynamics on the performance of umbilical-cord derived stem cells culture in stirred tank bioreactors (Doctoral dissertation, Université de Lorraine)

CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

La citofluorimetria a flusso è una tecnica di analisi cellulare che utilizza un flusso di cellule per analizzarle in base alle loro caratteristiche di superficie o intracellulari. Questa tecnica è ampiamente utilizzata per la caratterizzazione delle MSC dei mammiferi. La citofluorimetria

a flusso per la caratterizzazione delle MSC viene utilizzata per identificare e quantificare le MSC in un campione. Ciò viene fatto marcando le cellule con anticorpi specifici per (CD) di superficie o intracellulari delle MSC. I CD di superficie comunemente utilizzati per identificare le MSC includono CD44, CD73, CD90 e CD105. I CD intracellulari comuni utilizzati per identificare le MSC includono la proteina di metalloproteinasi 13 (MMP13) e la proteina di arginina-glicina-aspartico-acido (RGD).

Una volta che le cellule sono state marcate, vengono fatte passare attraverso un citofluorimetro per misurarne la fluorescenza. Il citofluorimetro è uno strumento che utilizza un fascio di luce laser che colpisce le cellule e converte parametri come la rifrazione, diffrazione o riflessione luminosa in segnali digitali che vengono elaborati e memorizzati. I dati raccolti dal citofluorimetro vengono quindi utilizzati per creare un profilo di espressione dei marcatori per le cellule. Il profilo di espressione dei marcatori viene utilizzato per identificare e quantificare le MSC nel campione. Un profilo di espressione tipico delle MSC presenterà un'espressione positiva per i marcatori di superficie CD44, CD73, CD90 e CD105. Inoltre, le MSC possono presentare un'espressione positiva per il marcatore intracellulare MMP13.

Questa tecnica è accurata e riproducibile e può essere utilizzata per identificare e quantificare le MSC in un campione.

MSC: SITI DI PRELIEVO NELLE VARIE SPECIE

Il midollo osseo è stato inizialmente la principale fonte per l'estrazione delle MSC e continua a essere comunemente impiegato per questo scopo. Tuttavia, rispetto ad altri tessuti, contiene una quantità relativamente limitata di MSC e comporta sfide notevoli nel processo di estrazione. Nei piccoli animali da compagnia quantitativamente significativo può essere problematica.

L'ago viene posizionato generalmente nella porzione più ampia dell'ala dell'ileo. Altri siti di accesso includono il femore prossimale, l'omero prossimale e lo sterno.

La scelta dell'ago midollare dovrebbe essere proporzionata alle dimensioni del paziente, con un calibro di 16-14 gauge per il cane e 18 gauge per il gatto.

Per garantire il comfort e la gestione del dolore del paziente, viene eseguita un'anestesia locale tramite l'infiltrazione di 1-2 mL di lidocaina al 2% nel tessuto sottocutaneo e nel periostio. L'ago viene quindi inserito perpendicolarmente alla cresta iliaca, e l'anestesia

locale viene infiltrata nell'area circostante, in prossimità del punto in cui verrà effettuato il prelievo.

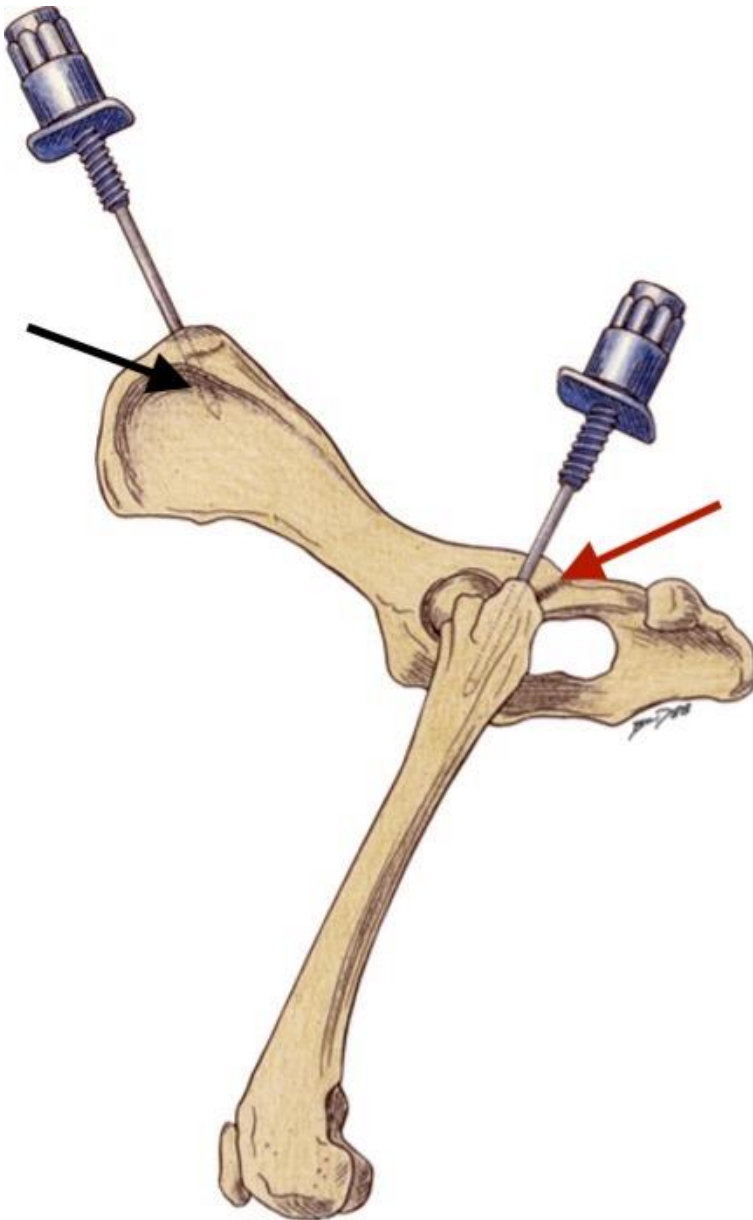


Figura 3: Illustrazione schematica del prelievo di midollo osseo a livello di cresta iliaca (freccia nera) o di femore prossimale (freccia rossa) nel cane.

Nel corso del tempo, sono stati indagati siti di estrazione alternativi di MSC, tali da avere una resa più elevata di cellule da prelevare ed elaborare. Attualmente, le MSC sono state isolate da una varietà di tessuti, tra cui il tessuto adiposo, la cute, il muscolo scheletrico, le ghiandole salivari, il sangue mestruale e tessuti perinatali come il cordone ombelicale, membrane e

fluido amniotico (Mushahary et al. 2018), (Kim EY et al., 2014) e la polpa dentale. Quest'ultima, prelevata naturalmente, rappresenta una fonte vantaggiosa di MSC (Kerkis I, Caplan A., 2012). La polpa dentale come fonte di MSC si è rivelata una soluzione promettente fin dai primi anni 2000 (Gronthos S et al., 2002). Le MSC isolate hanno dimostrato di essere cellule staminali multipotenti aventi elevato potenziale di differenziazione (Kerkis I et al., 2009). Inoltre, in modelli animali, tali cellule non hanno dimostrato fenomeni di rigetto o formazione di teratomi e pertanto, si sono dimostrate sicure, ipotizzando prospettive future riguardanti il trapianto allogenico (Laino GDA et al., 2005). Le cellule staminali derivanti da polpa dentale umana sono state inoltre utilizzate in ambito sperimentale nel cane, come modello animale (Behnia A et al., 2014) (Kerkis I et al., 2008). Nel primo studio condotto da Behnia e colleghi, cellule staminali isolate da denti decidui umani sono state isolate ed impiantate in lesioni mandibolari indotte di dimensioni standardizzate in 4 cani. Il gruppo di controllo ha ricevuto, al posto delle cellule, del collagene all'interno della lesione. A 12 mesi di follow-up, le biopsie, che hanno evidenziato una deposizione di matrice ossea statisticamente significativa nei gruppi dei casi rispetto al controllo (Behnia A et al., 2014). Nello studio condotto da Kerkis e colleghi invece, sono stati utilizzati come casi dei cani di razza golden retriever affetti da distrofia muscolare, come modello animale per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne. Nello studio, sono stati analizzati la capacità delle cellule di migrare ed attecchire a livello tissutale dopo somministrazione intra-arteriosa (IA) o intramuscolare (IM) nel muscolo bicipite femorale. Rispetto al controllo (due soggetti) ai quali non è stata iniettata la sospensione cellulare, le cellule staminali somministrate per via arteriosa e non per via muscolare hanno manifestato un miglioramento clinico statisticamente significativo per oltre 25 mesi. Non sono stati inoltre registrati effetti collaterali secondari a reazioni autoimmuni contro la sospensione cellulare ricevuta (Kerkis I et al., 2008). Nel 2011, le cellule amniotiche possono essere facilmente raccolte durante i test prenatali di routine e la membrana amniotica può anche essere prelevata durante il taglio cesareo o dopo il parto. Questi metodi di isolamento risultano essere quindi scarsamente invasivi, evitando il danneggiamento degli embrioni o dei feti e quindi eticamente più giustificabili (Kim EY et al., 2014).

Oltre al midollo osseo, nel campo della medicina veterinaria, le MSC sono state estratte da fonti come il tessuto adiposo, il liquido sinoviale, il cordone ombelicale, il muscolo, la gengiva,

il legamento periodontale, l'endometrio e la placenta. Esistono infatti numerosi studi condotti su cavalli, ma anche piccoli animali da compagnia come in particolare in cani e gatti. In generale, tutti i tessuti contenenti una componente stromale sono considerati fonti potenziali di MSC. L'estrazione di MSC dal tessuto adiposo (chiamate anche cellule staminali derivate dal tessuto adiposo o ADSC) comporta il prelievo sterile del tessuto sottocutaneo, spesso situato nell'area addominale o inguinale. Generalmente, dopo il prelievo, viene effettuata una digestione enzimatica utilizzando la collagenasi (Araña et al. 2013) (Jankowski M et al., 2020) per estrarre le MSC dal campione e separarle da altre componenti cellulari non ricercate.

Voga M e colleghi (Voga M et al., 2021) hanno condotto uno studio che comparava la vitalità, l'espressione di clusters di differenziazione (CD) la proliferazione e sulla capacità di differenziazione di MSC (ADMSC) derivanti da tessuto adiposo di 11 cani e 8 gatti domestici clinicamente sani. Il tessuto adiposo è stato raccolto individualmente in tutti i soggetti durante gli interventi routinari di castrazione o ovarioisterectomia. Il sito di prelievo del tessuto adiposo è stato ottenuto dalla regione sottocutanea addominale, sito considerato sicuro poiché lontano da organi vitali. Non sono state registrate complicazioni o effetti avversi legati alla procedura di prelievo in nessuno dei casi esaminati. Nello studio, inoltre, è stato evidenziato come le MSC prelevate da tessuto adiposo canino hanno manifestato un tasso di proliferazione maggiore rispetto alle MSC ottenute da tessuto adiposo felino. Queste ultime, inoltre, hanno manifestato una maggior sensibilità nel processo di lavorazione e di trapianto, mostrando un tasso di vitalità ridotto rispetto a quelle canine. Infine, la percentuale di cellule che esprimevano CD propri delle cellule staminali era inferiore nelle cellule derivate dai gatti rispetto alle MSC canine.

In uno studio di Min SOO S e colleghi (Seo M et al., 2009) sono state isolate cellule staminali mesenchimali dal cordone ombelicale di canidi razza beagle. In questo studio, le cellule isolate sono state differenziate con successo in condrociti, osteoblasti e neuroni. L'uso del cordone ombelicale come fonte di MSC si rivela quindi una risorsa promettente, in quanto si tratterebbe di materiale biologico che in condizioni normali verrebbe scartato, fornendo quindi una ricca fonte di cellule staminali senza dover arrecare alcun trauma o ulteriore disagio al paziente donatore. Saulnier N e colleghi sono stati in grado di isolare, differenziare e fenotipizzare MSC da annessi fetali di cane (amnion (AM), placenta (PL), e cordone ombelicale (UCM)). I tessuti sono stati prelevati durante al termine di un intervento di parto cesareo (Saulnier N et al., 2016). Le linee di MSC ottenute sono state differenziate con successo in adipociti, condrociti ed osteoblasti e fenotipizzate tramite qPCR,

esprimendo CD90, CD44, CD105, CD73. Anche in questo caso, seppure siano necessari ulteriori studi riguardanti l'utilizzo di anni traumatiche per il feto e la disponibilità di materiale biologico che altrimenti verrebbe scartato, rendono questi siti di prelievo promettenti per indagini future. Nell'ambito medicina rigenerativa, l'isolamento delle MSC (MSC) e dal liquido amniotico (AF-MSC) si prospetta quindi un campo promettente rispetto ad altre fonti di MSC, a causa della facile reperibilità del materiale cellulare, bassa invasività, multipotenza, bassa immunogenicità e problema etico accettabile.

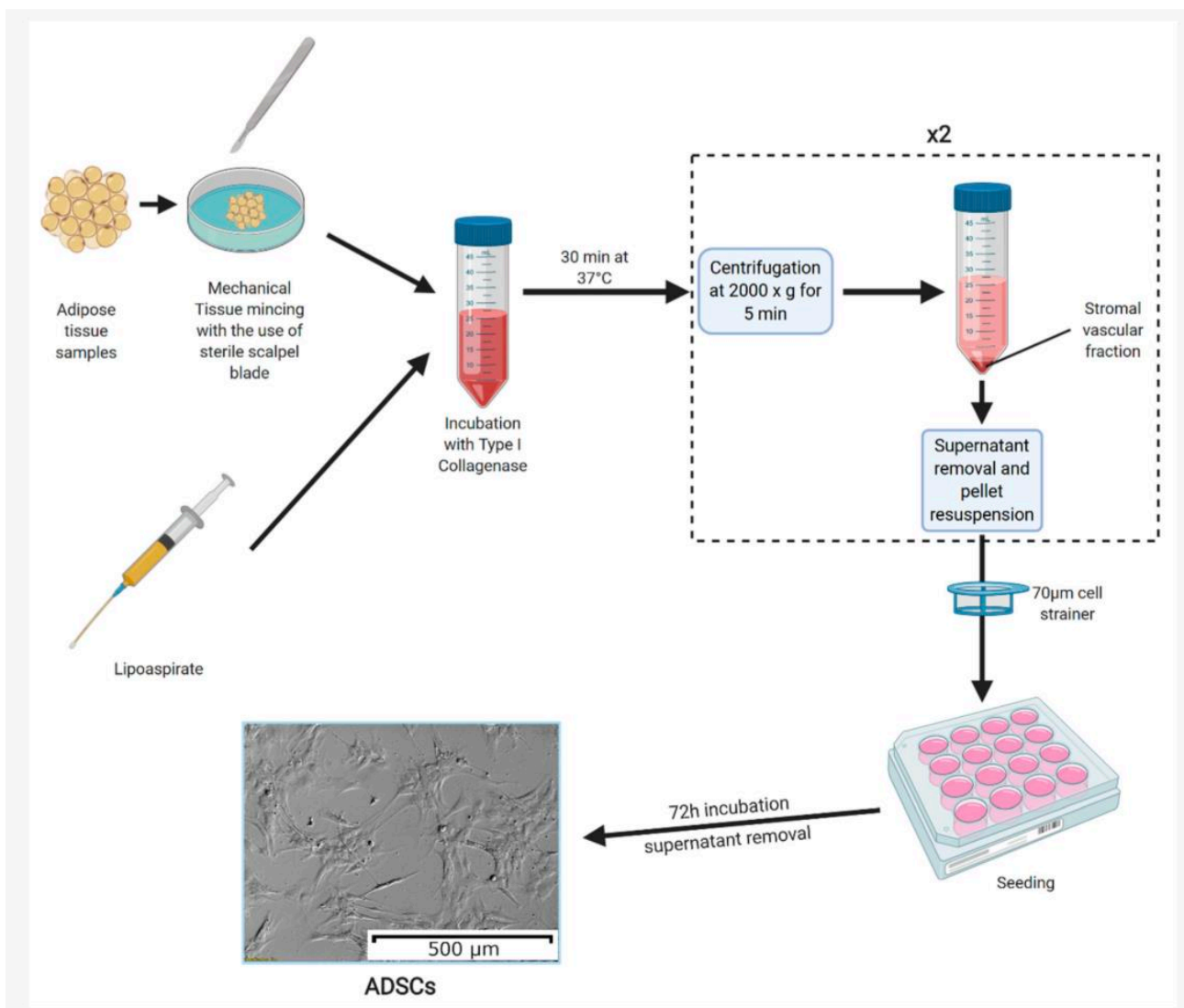


Figura 4: Isolamento di cellule staminali da tessuto adiposo (Jankowski M et al., 2020). I campioni di tessuto adiposo sono frammentati meccanicamente in piccoli frammenti. Successivamente, i frammenti di tessuto vengono incubati in una soluzione di collagenasi di tipo I per 30 minuti a 37 °C. La collagenasi viene neutralizzata utilizzando una soluzione di siero bovino fetale al 5% in terreno di coltura, con i campioni centrifugati successivamente a 2000 g per 5 min. Il supernatante risultante viene scartato e il pellet viene risospeso in terreno di coltura, dopo di che viene ripetuta la fase di centrifugazione. Il pellet ottenuto viene nuovamente risospeso e filtrato attraverso un filtro cellulare da 70 µm. La sospensione cellulare

risultante viene seminata su piastre di coltura e lasciata aderire per 72 ore. Trascorso questo tempo, il terreno di coltura viene rimosso, lasciando gli ASC aderenti al fondo della piastra. <https://doi.org/10.3390/cells9081783>

Attualmente, è in corso un ampio dibattito riguardante la reale funzione ed il comportamento delle MSC in vivo. E' ormai certo che le MSC solitamente associate ad altre popolazioni cellulari localizzate in prossimità della parete vasale o in tessuti limitrofi. Esistono studi aventi l'abilità di differenziarsi in osteociti in risposta a stimolazioni da parte di citochine (da Silva Meirelles, Chagastelles, and Nardi 2006), (Caplan 2008), (Corselli et al. 2010), (Covas et al. 2008), (Corselli et al. 2010). Alcuni markers espressi da tali cellule sono inoltre condivisi, ma attualmente, queste ipotesi sono oggetto di numerose controversie: non esistono infatti specifici markers validati per i periciti. Inoltre, è stata accertata la presenza di MSC anche in siti extra-vascolari, come l'endostio (De Souza et al. 2016).

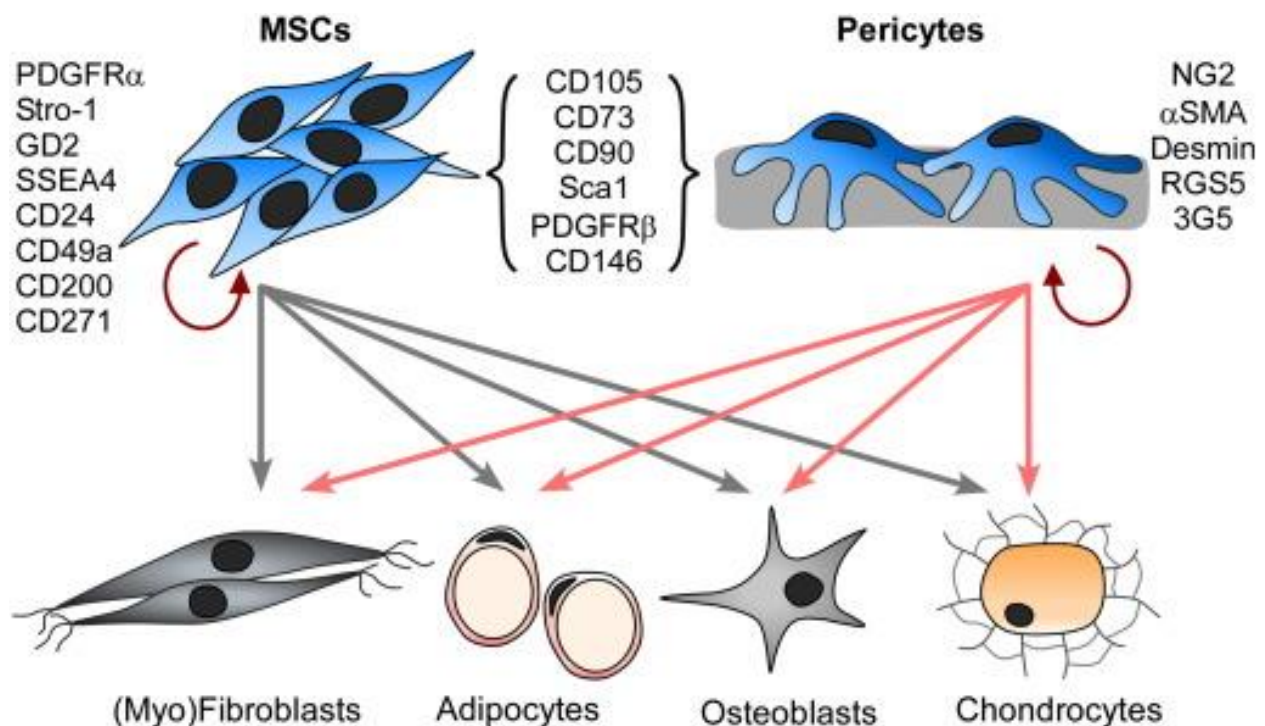


Figura 5: diagramma schematico che illustra la capacità di differenziazione di MSC e periciti in linee separate (freccie grigie e rosa) e per auto-rinnovo (freccie rosse). Vengono mostrati i marcatori unici e condivisi di entrambi i tipi di cellula. Wong SP et al., () <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.03.006>

INTERAZIONE DELLE MSC CON L'ORGANISMO E POTEN

A 50 anni dalla scoperta delle MSC, l'interesse differenziarsi in diverse linee cellulari in risposta a segnali biochimici è cresciuto esponenzialmente. Sono stati condotti quindi numerosi studi sperimentali a valutazione delle loro potenziali applicazioni terapeutiche, per dimostrare se le cellule, una volta inoculate in tessuti danneggiati, potessero integrarsi e differenziarsi in cellule funzionali tipiche di quel tessuto. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che le MSC sono in grado di promuovere la guarigione dei tessuti danneggiati, non solo attraverso il loro processo di differenziazione (Jimenez-Puerta et al. 2020), ma anche grazie all'innate componenti cellulari facenti parte del sistema immunitario (Waterman et al., 2010). Tra le varie caratteristiche salienti delle MSC, infatti, ritroviamo il c e di possedere attività immunomodulante (Kim EY et al., 2014). L'obiettivo di al stato indagare sulla distribuzione e sopravv tessuti. Da alcuni risultati è emerso che la sopravvivenza delle MSC nei tessuti del ricevente è relativamente bassa. Guest DJ e colleghi, dopo aver inoculato MSC in tendini patologici di cavalli affetti da tendinite, ne che si è dimostrato al ut a essere inferiore al 5%.

I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che i potenziali di differenziazione delle MSC all'interno dei tessuti potrebbero essere lim siano stati sostanziali.

Al contrario, uno studio r i g u a r d a d e l l e MSC come terapia in caso di alterazione degenerativa del disco intervertebrale nell'uomo dimostrato la permanenza di MSC nella sede della lesione fino a 8 mesi post l'inoculo (Henriksson et al. 2019). Ciò suggerisce che l'efficacia delle MSC può dipendere non solo dalle caratteristiche del tessuto ricevente, ma anche dal contesto specifico riguardante il tipo di patologia per cui si è scelto di effettuare il trattamento.

Ad oggi, rimangono incerte sia la capacità di sopravvivenza delle MSC dopo il loro impianto nei tessuti, sia la percentuale di cellule che effettivamente subisce una differenziazione. Inoltre, non sono chiari i tempi medi di sopravvivenza in vivo. Questi valori risultano essere differenti in ogni studio condotto in ambito clinico. Si ritiene tuttavia, che la capacità terapeutica delle MSC non possa essere attribuita esclusivamente alla loro capacità di

differenziarsi in altre tipologie cellulari, ma piuttosto sembra che questa capacità sia legata ad altre funzioni biologiche (H. Li et al. 2018).

Studi recenti condotti in vitro hanno dimostrato la capacità delle MSC di differenziarsi in cellule neurali (Kim EY et al., 2014). Esse sono inoltre in grado di secernere fattori neurotrofici aventi potenziale rigenerativo o protettivo nei confronti del tessuto danneggiato. (Kim EY et al., 2014). MSC isolate sia dalla membrana amniotica che dal fluido amniotico sono state differenziate in neuroni dopaminergici in modelli murini sperimentali riguardanti il morbo di Parkinson (Portmann LCB et al., 2009). La risposta motoria dei ratti malati sottoposti a trapianto di MSC è inoltre notevolmente migliorata. Questi studi aprono quindi nuove possibilità terapeutiche riguardanti la cura di patologie neurodegenerative come appunto il morbo di Parkinson.

Con il passare degli anni, sono stati individuati diversi meccanismi propri delle MSC che vengono attuati ogni qualvolta sia presente un danno tissutale.

Homing e Migrazione

Una delle caratteristiche fondamentali delle MSC in medicina rigenerativa è la loro abilità a localizzarsi in vivo nei tessuti danneggiati (Ullah, Liu, and Thakor 2019). Questa capacità è comunemente definita "homing".

- L'homing può essere classificato in due tipologie principali: non sistemico e sistemico (Nitzsche et al. 2017).
- L'homing non sistemico avviene quando le MSC vengono trapiantate direttamente nel tessuto danneggiato. Le cellule si spostano all'interno del tessuto seguendo un gradiente di fattori chemiotattici rilasciati nella zona lesa, raggiungendo così la sede del danno.
- L'homing sistemico, d'altra parte, si verifica quando le MSC vengono inoculate nel corpo tramite vie parenterali, come l'iniezione. In questo caso, le MSC sono in grado di aderire alle pareti dei vasi sanguigni e di uscire dalla circolazione ematica per raggiungere il tessuto danneggiato.

Il processo di homing è può essere riassunto in tre punti principali:

- 1) Il tessuto danneggiato rilascia nel circolo sanguigno citochine proinfiammatorie come l'istamina, IL1, IL6, IL8 e il TNF. Queste citochine attivano le cellule endoteliali, inducendo l'espressione di molecole di adesione cellulare (Andreas, Sittinger e Ringe, 2014).
- 2) Le cellule staminali mesenchimali (MSC) iniziano a "rotolare" lungo l'endotelio dei vasi sanguigni fino a che non aderiscono completamente, grazie al legame con ligandi cellulari espressi dalle cellule endoteliali (Jimenez-Puerta et al., 2020).
- 3) A questo punto, si crea una superficie di contatto tra l'endotelio e le MSC, e mediante la produzione e l'azione di metalloproteasi, le MSC riescono a superare l'endotelio e la membrana basale, uscendo dal circolo sanguigno (Nitzsche et al., 2017).

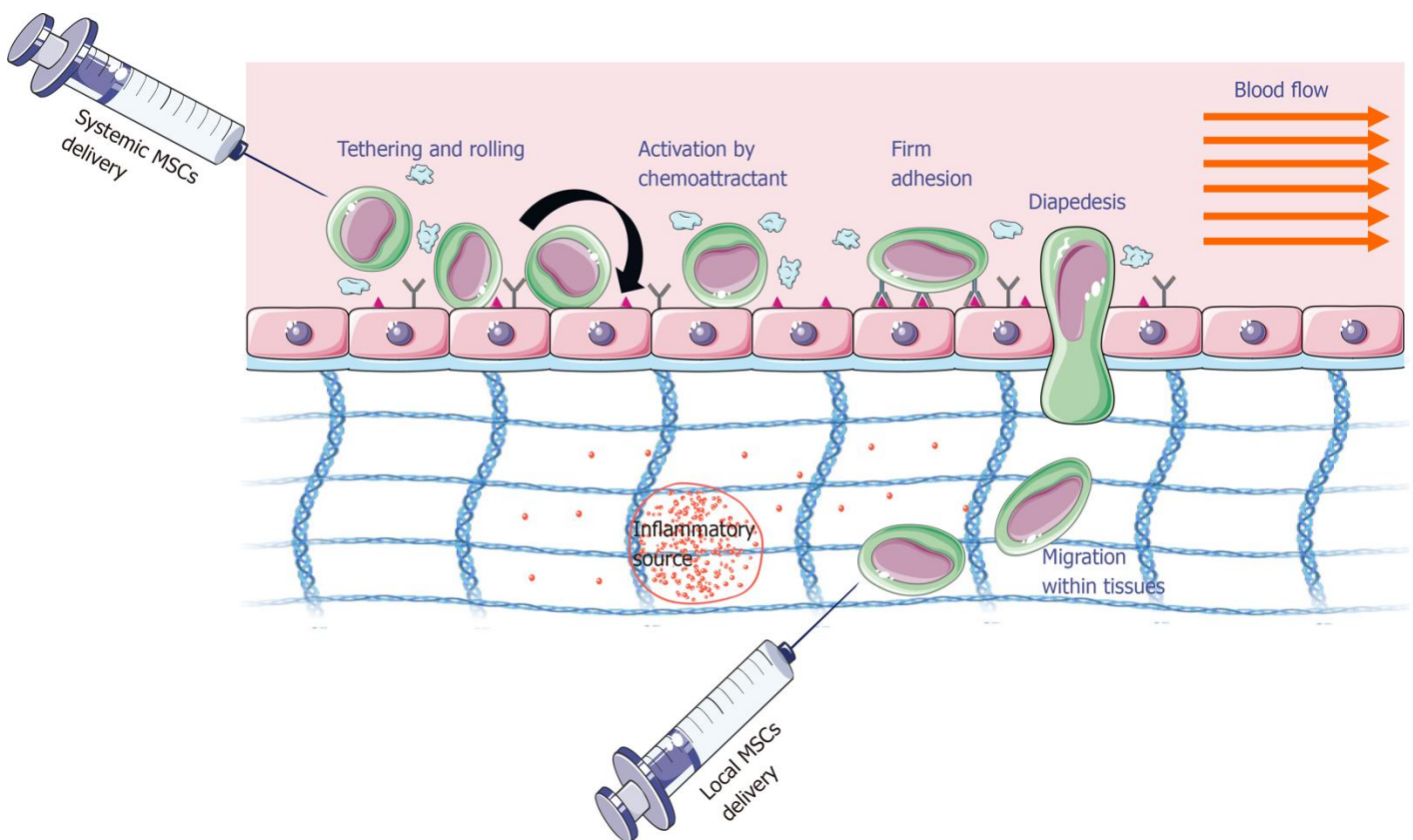


Figura 6: Illustrazione schematica del processo di homing dopo inoculo sistemico e non sistemico (Szydlak R., 2021)

La caratteristica delle MSC di migrare direttamente verso le aree ove è presente un danno tissutale, contribuendo alla sua riparazione, rende le MSC un modello di studio ideale nel campo della medicina rigenerativa (Jimenez-Puerta et al. 2020). In uno studio condotto da Chapel A e colleghi, è stato osservato come le MSC riescano a migrare verso tessuti danneggiati in modelli sperimentali di insufficienza multi-organo causata da radiazioni, infarto cerebrale e miocardico, insufficienza renale acuta (Chapel et al., 2003).

In caso di somministrazione per via sistemica, è stato osservato come le MSC possano colonizzare una varietà di organi e tessuti come midollo osseo, muscolo, fegato e cute (Rocheffort Y., 2001) (Gao J et al., 2001) (Granero M et al., 2008). La fitta circolazione polmonare invece, si è comportata come barriera fisica, limitando la diffusione delle MSC. Tale barriera è stata superata con la somministrazione di un vasodilatatore, con ripristino dell'homeostasi in altri organi come fegato, reni e ossa (Gao J et al., 2001).

Effetto paracrino

Si ipotizza che le MSC possano contribuire alla rigenerazione tissutale indirettamente, tramite un effetto paracrino. Kinnaird T e colleghi hanno notato come le MSC possano migliorare la crescita delle cellule muscolari lisce ed endoteliali in coltura; tale incremento è stato mediato dal fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e dal fattore di crescita del fibroblasto di base (bFGF) (Kinnard T., 2004). Tang et al., utilizzando un modello di infarto miocardico del ratto, hanno riportato livelli più elevati di VEGF, FGF e SDF-1 dopo il trapianto autologo di MSC rispetto ai controlli (Tang YL., 2005). Zhang et al. (Zhang M., 2007) hanno dimostrato un aumentato trofismo dei cardiomiociti riceventi MSC esprimenti SDF-1 e, Mahmood et al. (Mahmood et al., 2004), in un modello di lesione cerebrale traumatica del ratto, hanno rilevato che FGF, fattore di crescita nervosa e fattore neutrofico derivato dal cervello sono incrementati in soggetti a cui erano state trapiantate MSC. È plausibile quindi, che attratte da un tessuto danneggiato, le MSC secernano fattori solubili che garantiscono la sopravvivenza delle cellule ospitanti circostanti e, anche in presenza di un livello basso o nullo di differenziazione, la presenza stessa delle MSC sia di beneficio. Una prova più diretta dell'effetto paracrino di MSC è stata riportata in un modello di insufficienza epatica fulminante del ratto (Parekkadan et al., 2008). In questo modello, 24 ore dopo l'iniezione di un'epatotossina, la somministrazione sistemica di lisati di MSC umana o terreno condizionato da MSC umane in coltura ha aumentato il tasso di sopravvivenza degli animali (Parekkadan

et al., 2008). I lisati di MSC e il mezzo condizionato da MSC erano più efficaci dei trapianti intatti di MSC, che hanno mostrato un tasso molto basso di innesto nel fegato.

Trasferimento mitocondriale

Il trasferimento mitocondriale è stato proposto come un altro meccanismo di azione delle MSC. Oltre a trasferire le molecole via vescicole extracellulari (VEs), le MSC sembrano essere capaci del trasferimento intercellulare degli organelli via attraverso un processo chiamato nanotubes tunneling. Nel 2006 è stato osservato il primo trasferimento mitocondriale tra MSC e cellule somatiche (Spees JL., 2006). Questo studio ha rivelato che il trasferimento attivo dei mitocondri dalle cellule staminali adulte alle cellule somatiche può ripristinare la respirazione aerobica in cellule di mammiferi con mitocondri non funzionali. In un modello murino di polmonite, MSC estratte dal midollo umano (BMMSC) potrebbero aver trasferito i loro mitocondri attraverso il fenomeno di nanotube tunneling ai macrofagi alveolari, che hanno portato ad un incremento del processo di fagocitosi ed ad un inaspettato effetto antimicrobico (Jackson MV., 2016). Il trasferimento mitocondriale è stato dimostrato anche in vivo da BMMSC somministrate sistemicamente a modelli murini affetti da nefropatia diabetica (Li C., 2019). Poiché il trasferimento mitocondriale è associato a varie attività fisiologiche e patologiche, esso potrebbe essere potenzialmente utile per trattamenti futuri di molte patologie.

Interazione tra sistema immunitario e MSC (Immunomodulazione)

Come anticipato precedentemente, le MSC svolgono un ruolo significativo nell'immunomodulazione, e questo processo è influenzato dai segnali provenienti dall'ambiente circostante, come le citochine infiammatorie o i fattori di ipossia (Waterman et al., 2010).

La produzione di diversi fattori da parte delle MSC è il risultato dell'interazione tra il loro ambiente e il loro fenotipo cellulare, che è influenzato da recettori sulla loro superficie, come i recettori Toll-like (Sangiorgi and Panepucci, 2016). Ad esempio, è stato scoperto che l'attivazione di MSC con i ligandi TLR3 ha innescato il rilascio dei fattori che hanno migliorato la sopravvivenza dei granulociti neutrofili (Le Blanc K et al., 2012). Inoltre, gli agonisti del

TLR3 hanno dimostrato di stimolare un maggiore rilascio di chemochine neutrofile rispetto ad altri agonisti TLR e di stimolare le proprietà migratorie delle MSC nei tessuti.

Waterman e colleghi hanno proposto una classificazione delle MSC basata su due fenotipi caratteristici: un fenotipo proinfiammatorio ed un fenotipo antiinfiammatorio (Waterman et al., 2010).

Le MSC dimostrano significative capacità immunosoppressive, come evidenziato in vitro dalla loro capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T dopo la stimolazione con MSC e di inibire la produzione di citochine proinfiammatorie (Di Nicola et al., 2002). Esse possono prevenire o ridurre le potenziali complicanze legate a una risposta eccessiva del sistema immunitario durante il danno ai tessuti e agli organi, contribuendo così alla riparazione.

L'attività immunosoppressiva delle MSC è mediata da fattori solubili, tra cui il TGF- β , l'epatocyte growth factor (EGF) e l'ossido nitrico (NO). L'attività immunosoppressiva delle MSC sembra essere favorita da stimoli infiammatori, come l'esposizione a citochine proinfiammatorie (Hoogduijn et al., 2010).

Nauta e colleghi hanno dimostrato come le MSC riescano ad inibire anche la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B, influenzando la risposta delle cellule presentanti l'antigene (Nauta et al., 2006). In vivo, tali effetti immunosoppressivi sono stati indagati in patologie ad andamento cronico (epatiti, nefriti, coliti) o processi patologici autoimmuni (Popp et al., 2008), (Parekkadan, Tilles e Yarmush, 2008).

Per quanto riguarda le MSC a fenotipo proinfiammatorio, è stato dimostrato come esse siano in grado di produrre diversi tipi di chemochine (Di Nicola et al., 2002) e che, in condizioni fisiologiche, esse possano attirare neutrofili e monociti tramite chemiotassi. In caso di flogosi inoltre, possano attrarre cellule dendritiche, linfociti T e natural killer (NK) nel sito in cui è presente il danno tissutale (Hoogduijn et al., 2010).

Pur non essendo ancora stato chiarito il ruolo dell'attività chemiotattica delle MSC, si presume che questo meccanismo possa servire a reclutare le cellule del sistema immunitario verso di esse, rendendo così queste ultime più accessibili ai meccanismi di immunomodulazione e di comunicazione (Suvæthae, 2008). Tale comunicazione è stata dimostrata a livello di membrana 2,3-diossigenasi da parte delle MSC, al fine di differenziare i macrofagi di tipo I in macrofagi di tipo II, aventi un ruolo antiinfiammatorio e immunosoppressivo fondamentale nei processi flogistici (Francois et al., 2010).

Factors from MSCs

- TGFb
- PGE2
- HepGF
- Gal-1
- iNOS
- IL-6
- IL-1Rag
- IL-10
- HLA-G
- IDO
- TSG-6

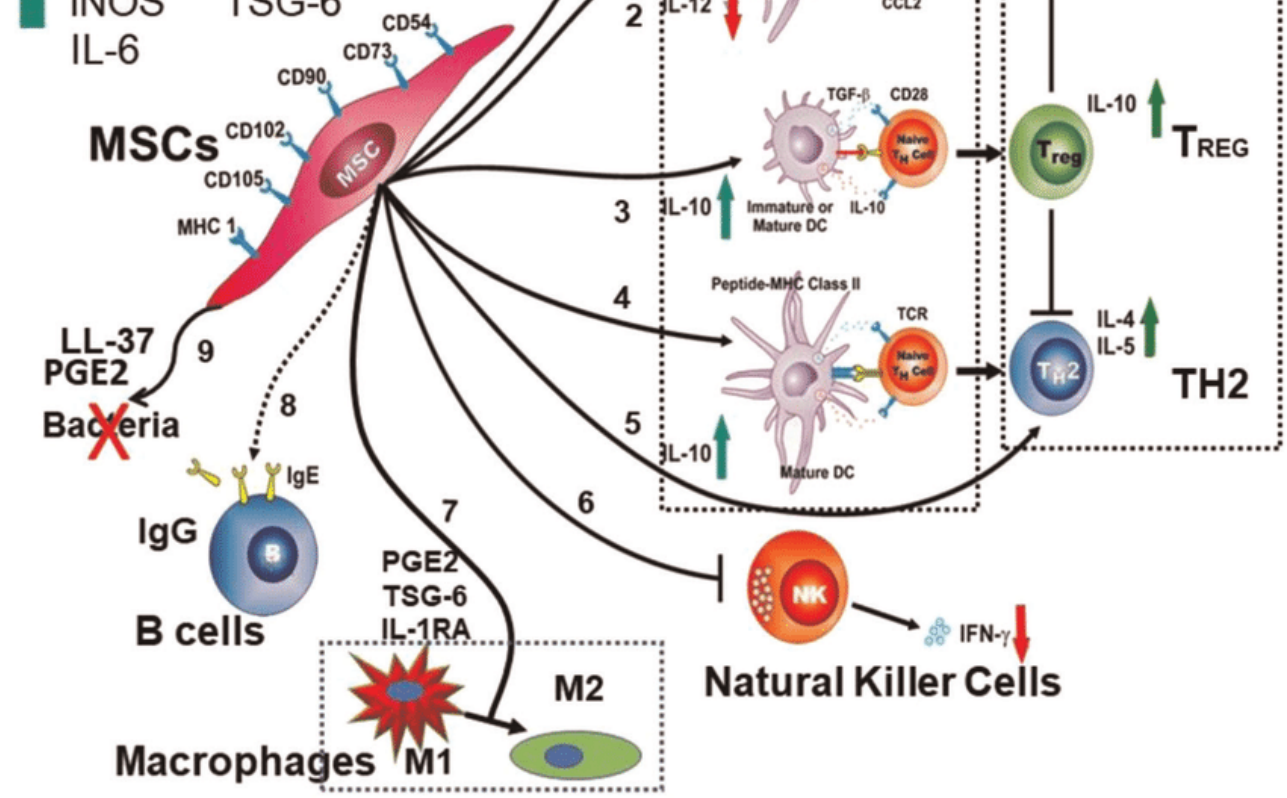


Figura 7: Illustrazione schematica che mostra le interazioni delle MSC con le cellule del sistema immunitario tramite la secrezione di interleuchine

Jhonson V e colleghi. (Jhonson V et al., 2017). Hanno studiato gli effetti della somministrazione di MSC in modelli murini e canini affetti da infezioni croniche correlate alla presenza di biofilm batterico. Nei topi affetti da infezione cronica legata ad impianto di *Staphylococcus aureus*, è stato effettuato un trattamento che ha previsto la somministrazione IV di MSC attivate (TLR-MSC) o non attivate, con o senza terapia antibiotica. Il protocollo terapeutico di MSC attivate somministrate in associazione con terapia antibiotica. Nello studio, le MSC attivate sono state identificate a livello di margini della ferita molti giorni dopo la somministrazione IV (Jhonson V et al., 2017) (Chow L et al., 2020). I macrofagi nei tessuti infetti assumevano un fenotipo M2 (fenotipo generalmente coinvolto nella risposta antiinfiammatoria), rispetto alle infezioni non trattate che contenevano prevalentemente macrofagi a fenotipo M1 (fenotipo

coinvolto nella risposta proinfiammatoria). La distruzione batterica secondaria a somministrazione di MSC è stata imputata non solo alla somministrazione di antibiotici, probabilmente alla secrezione di catelicidina, una proteina prodotta da granulociti neutrofili e cellule epiteliali in risposta a secrezione di citochine (Reinholz et al., 2012). La terapia sistemica con MSC attivato può essere considerata essere un approccio efficace e promettente al trattamento delle infezioni croniche da batteri resistenti agli antibiotici.

Secretoma

Si definisce secretoma la complessa miscela di fattori solubili e molecole bioattive rilasciate dalle MSC nel loro ambiente circostante. Queste molecole svolgono un ruolo cruciale nella modulazione dell'ambiente cellulare e possono influenzare diversi processi biologici, comprendendo una vasta gamma di fattori paracrini, tra cui citochine, chemochine, fattori di crescita, enzimi, oltre a vescicole extracellulari e acidi nucleici (L. et al., 2019); (Madrigal, Rao e Riordan, 2014). Il secretoma delle MSC è particolarmente interessante in ambito di ricerca medica e terapia cellulare perché molte di queste molecole hanno effetti benefici. Attraverso il secretoma, si ritiene che le MSC svolgano la maggior parte delle loro attività fisiologiche e terapeutiche. In vitro, il secretoma viene ottenuto coltivando le MSC in un mezzo condizionato che stimola la secrezione dei fattori utili per la terapia. Negli ultimi anni, sono state sviluppate tecniche per indurre la produzione del secretoma e per purificarlo dai mezzi di coltura. Poiché il secretoma derivato dalle MSC è una formulazione acellulare, si ritiene che non induca una risposta immunitaria quando viene utilizzato a fini terapeutici su individui diversi dal donatore delle cellule utilizzate per la sua produzione.

Si ritiene che uno dei principali vantaggi del secretoma sia la possibilità di effettuare terapie acellulari con secretomi allogenicici, cioè utilizzando un secretoma prodotto da cellule non provenienti dal soggetto ricevente. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi e dati clinici per chiarire se ciò sia effettivamente possibile senza rischi. Al contrario, le terapie cellulari basate sulle MSC richiedono l'uso di cellule autologhe per motivi di sicurezza, poiché la somministrazione di cellule allogene potrebbe potenzialmente innescare una risposta immunitaria nel soggetto ricevente. Il secretoma può essere quindi oggetto di standardizzazione e regolamentazione a livello legislativo come un trattamento terapeutico standard, a differenza delle MSC. Attualmente, ci sono numerosi studi in corso per identificare con precisione tutti i componenti del secretoma, e sono già state osservate

variazioni nella composizione legate al tipo di MSC, all'età delle cellule e al mezzo di coltura utilizzato (Pires et al., 2016).

Al contrario delle MSC, il secretoma può essere conservato tramite congelamento senza l'utilizzo di DMSO, un crioprotettore che deve essere somministrato alla sospensione cellulare. Questo rende il processo di conservazione e somministrazione del secretoma più pratico e meno soggetto a potenziali rischi riguardanti la somministrazione di residui di crioprotettore al paziente. La comprensione del secretoma delle MSC, inclusa la sua composizione e i suoi effetti, è fondamentale per lo sviluppo di terapie cellulari più efficaci e per comprendere come queste cellule interagiscono con l'ambiente circostante per promuovere la guarigione e la rigenerazione dei tessuti.

Vescicole extracellulari

Le vescicole extracellulari (EVs), chiamate anche esosomi, sono piccole strutture membranose rilasciate MSC e da molte altre cellule nel corpo. Queste vescicole contengono una varietà di molecole bioattive, tra cui proteine, acidi nucleici (come RNA e DNA), lipidi e altri composti e svolgono un ruolo cruciale nella comunicazione intercellulare e nella trasmissione di segnali tra le cellule (Chen et al. 2016). Oltre alle molecole citate, esse contengono anche lipidi in grado di mediare la modulazione della risposta immunitaria, di ridurre lo stress ossidativo (Stone et al. 2017) (Bray ER et al., 2021).

I ruoli noti delle EVs sono:

1. Comunicazione intercellulare: Le EVs possono trasportare informazioni da una cellula all'altra, consegnando molecole segnale, proteine o RNA che influenzano il comportamento e la funzione delle cellule riceventi.
2. Modulazione dell'infiammazione: Le EVs delle MSC possono contenere molecole che riducono l'infiammazione e modulano la risposta immunitaria. Questo le rende utili in condizioni infiammatorie o autoimmuni.
3. Promozione della rigenerazione dei tessuti: Le EVs possono contenere fattori di crescita e altre molecole che stimolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule, contribuendo alla guarigione e alla rigenerazione dei tessuti danneggiati.

4. Trasporto di acidi nucleici: Le EVs possono trasportare RNA e DNA che possono essere trasferiti ad altre cellule, influenzando l'espressione genica e la funzione cellulare.
5. Rimozione dei detriti cellulari: Le EVs possono anche contribuire alla pulizia e alla rimozione di materiali di scarto o danneggiati dalle cellule.

L'uso terapeutico delle EVs delle MSC è oggetto di crescente interesse nella medicina rigenerativa e nella terapia cellulare. Queste vescicole possono essere isolate dalle MSC e utilizzate per trasportare molecole bioattive specifiche in aree di interesse, migliorando la capacità di rigenerazione dei tessuti o riducendo l'infiammazione in diverse condizioni patologiche. Jackson e colleghi hanno notato che le EVs possono anche trasferire i mitocondri dalle MSC ai macrofagi, implementando (2016).

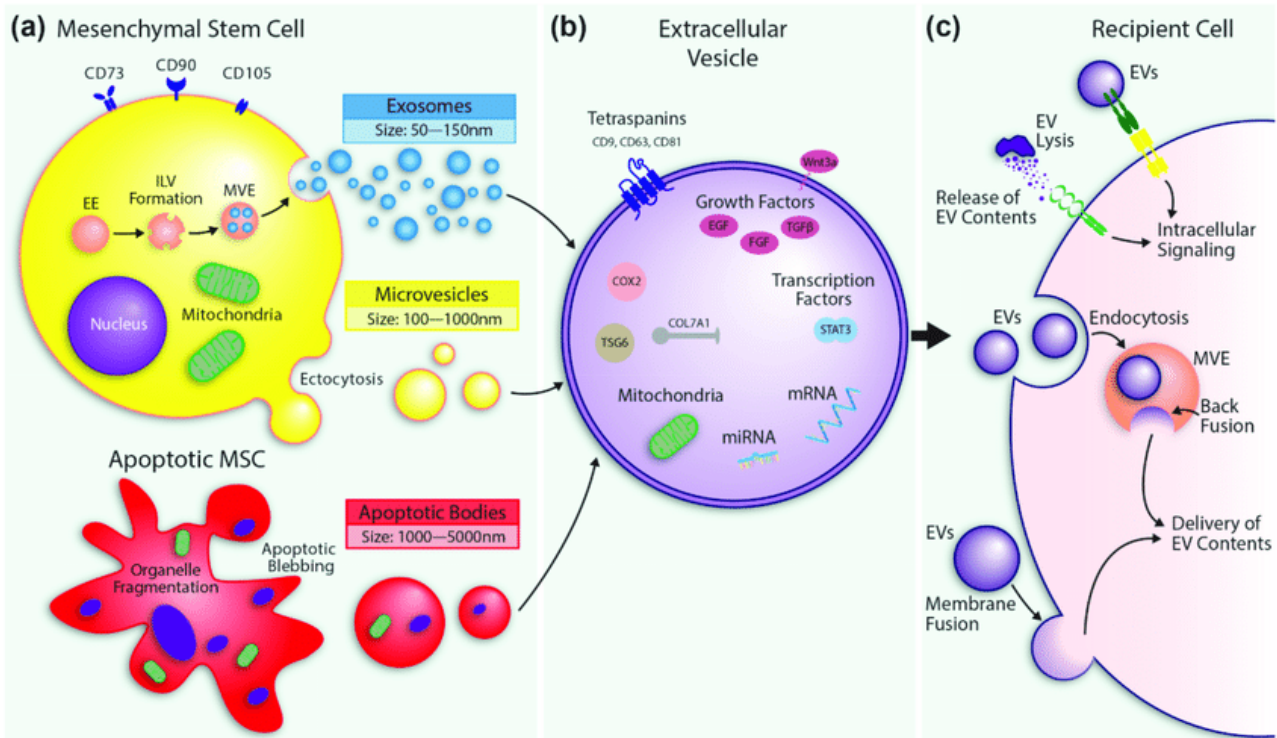


Figura 8: Formazione e ruolo delle vescicole extracellulari delle MSC. (a) La formazione di esosoma comincia con endocitosi della membrana dell'endosoma iniziale (EE) per formare le vescicole intraluminali (ILV). ILVs sono contenute all'interno di un endosoma multivesicolare (MVE). Gli esosomi sono liberati dopo fusione del MVE con la membrana citoplasmatica. Le microvescicole vengono rilasciate per ectocitosi e "budding" dalla membrana. Le vescicole apoptotiche si formano da cellule sottoposte ad apoptosi e possono contenere organelli frammentati. (b) Rappresentazione del contenuto delle vescicole extracellulari che contribuiscono alla guarigione dei tessuti danneggiati. (c) Le vescicole

rilasciate interagiscono con una cella ricevente attraverso i recettori di membrana avviando così il signaling pathway (Bray ER., 2021).

APPLICAZIONE CLINICA DELLE MSC: RUOLO NELLA MEDICINA RIGENERATIVA

VIE DI SOMMINISTRAZIONE

Sia in medicina umana che veterinaria, le MSC possono essere somministrate tramite diverse modalità. Tali metodi di somministrazione devono essere attentamente valutati dal medico relativamente alle condizioni cliniche del paziente ed agli obiettivi terapeutici prefissati. Il target terapeutico può essere una struttura anatomica ben definita ed accessibile facilmente (come, ad esempio, la cute o annessi cutanei), o in alternativa, un organo interno o un sistema funzionale come ad esempio il sistema immunitario.

Somministrazione topica

Dopo aver applicato topicamente le MSC a livello di un sito specifico o tessuto bersaglio (es: lesioni cutanee o muscolo-tendinee), le MSC riescono a raggiungere il sito specifico ove è presente il processo infiammatorio, svolgendo la loro attività paracrina (Quazi TH et al., 2017), (Quazi TH et al., 2019). L'applicazione topica di MSC risulta essere una metodica poco invasiva, dimostrando di avere un enorme potenziale nei campi della medicina delle ustioni. In uno studio condotto da Caplan e colleghi infatti, MSC applicate a livello topico hanno garantito migliori risultati rispetto al controllo, sia in merito alle tempistiche di guarigione, che alla percentuale di sopravvivenza dell'innesto cutaneo (Caplan H., 2019). Risultati simili sono stati ottenuti non solo in presenza di ferite da ustione, ma anche nelle piaghe diabetiche e in altre ferite croniche di altra natura (Caplan H., 2019).

Un fenomeno marcato di neoangiogenesi e di rivascularizzazione di tessuti oramai non più perfusi è stato inoltre osservato in uno studio condotto da Han KH e colleghi in caso di ischemia critica degli arti inferiori nell'uomo. Per quanto riguarda la via di somministrazione intramuscolare (IM) di MSC, essa risulta essere un metodo sicuro e semplice che, comparato ad altri siti di somministrazione come intravenoso (IV) o intraperitoneale (IP), garantisce un tempo di permanenza maggiore delle

MSC all'interno (et al., 2019). In uno studio condotto da Hamidian J e colleghi al., la permanenza di MSC umane somministrate IM in un modello murino è stata dimostrata fino a 5 mesi post iniezione. Nello stesso studio, inoltre, è stato dimostrato come le fibre muscolari scheletriche possano garantire un canale preferenziale per il veicolo sistemico di fattori trofici e supporto per le azioni paracrine delle MSC a causa della loro massiccia vascolarizzazione (Hamidian J et al., 2019).

Somministrazione sistemica

La somministrazione sistemica prevede l'infusione endovenosa (IV o IA). Il metodo più comunemente usato, a causa della relativa facilità di esecuzione, paragonato alla somministrazione IA (Sanchez-Diaz et al., 2021). Tuttavia, è essenziale monitorare attentamente il paziente durante e post somministrazione cellulare, in quanto la metodica non è esente da possibili complicazioni, come tromboembolismi (Caplan H., 2019). Tuttavia, considerato il fatto che la prima distribuzione di MSC avviene a livello polmonare, esiste la possibilità che eventuali emboli vengano catturati dal circolo polmonare prima che possano giungere a livello sistemico (Caplan H., 2019). Attraverso la somministrazione IV, un gran numero di MSC giunge a livello del circolo polmonare e da qui, a livello sistemico, colonizzando in 24-48 ore la milza, il fegato ed i reni (Lee et al., 2009) (Caplan H., 2019). Solo una piccola percentuale di MSC (circa l'1%) raggiunge gli altri organi (Lee et al., 2009). La via di somministrazione IV è più spesso associata a meccanismi che coinvolgono sistemi cellulari secondari di trasduzione del segnale, coinvolgendo il sistema immunitario dell'ospite. L'infusione IV può quindi dare origine ad un numero ridotto di cellule che raggiungono i tessuti bersaglio e per un periodo di tempo limitato.

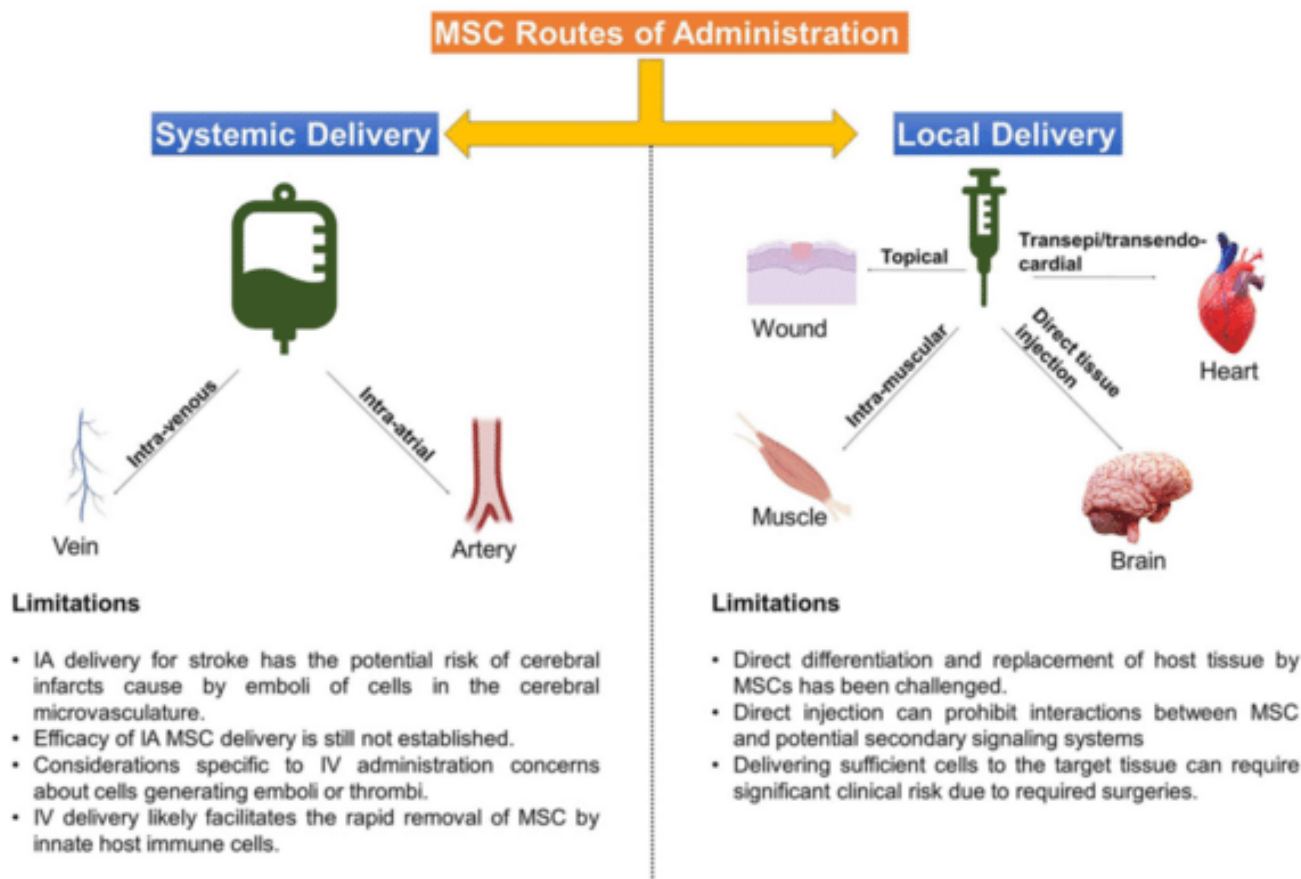


Figura 9: diagramma schematico che elenca i pro ed i contro di una somministrazione sistemica o locale di cellule staminali mesenchimali (Caplan H., 2019)

Durante il processo di homing, si realizza il dei tessuti o degli organi del ricevente. Si livello polmonare sia legata alle dimensioni delle cellule stesse, che vengono intrappolate nella fitta rete capillare polmonare. Tale fenomeno deve essere sempre considerato quando si pianifica una somministrazione IV di MSC, al fine di prevenire la formazione di emboli cellulari polmonari, dai potenziali effetti collaterali per il paziente.

La somministrazione intrarteriosa (IA) rappresenta una valida alternativa alla via IV (Figura 10). Essa permette di bypassare il filtro polmonare, distribuendosi in maniera più efficace nei vari tessuti (Sanchez-Diaz et al., 2021).

La via di somministrazione IA ideale riguarda la tributaria dell'organo bersaglio. Ovviamente, è anestetizzato, in quanto si tratta di una procedura invasiva, rispetto alla somministrazione per via endovenosa (Mäkelä et al., 2015).

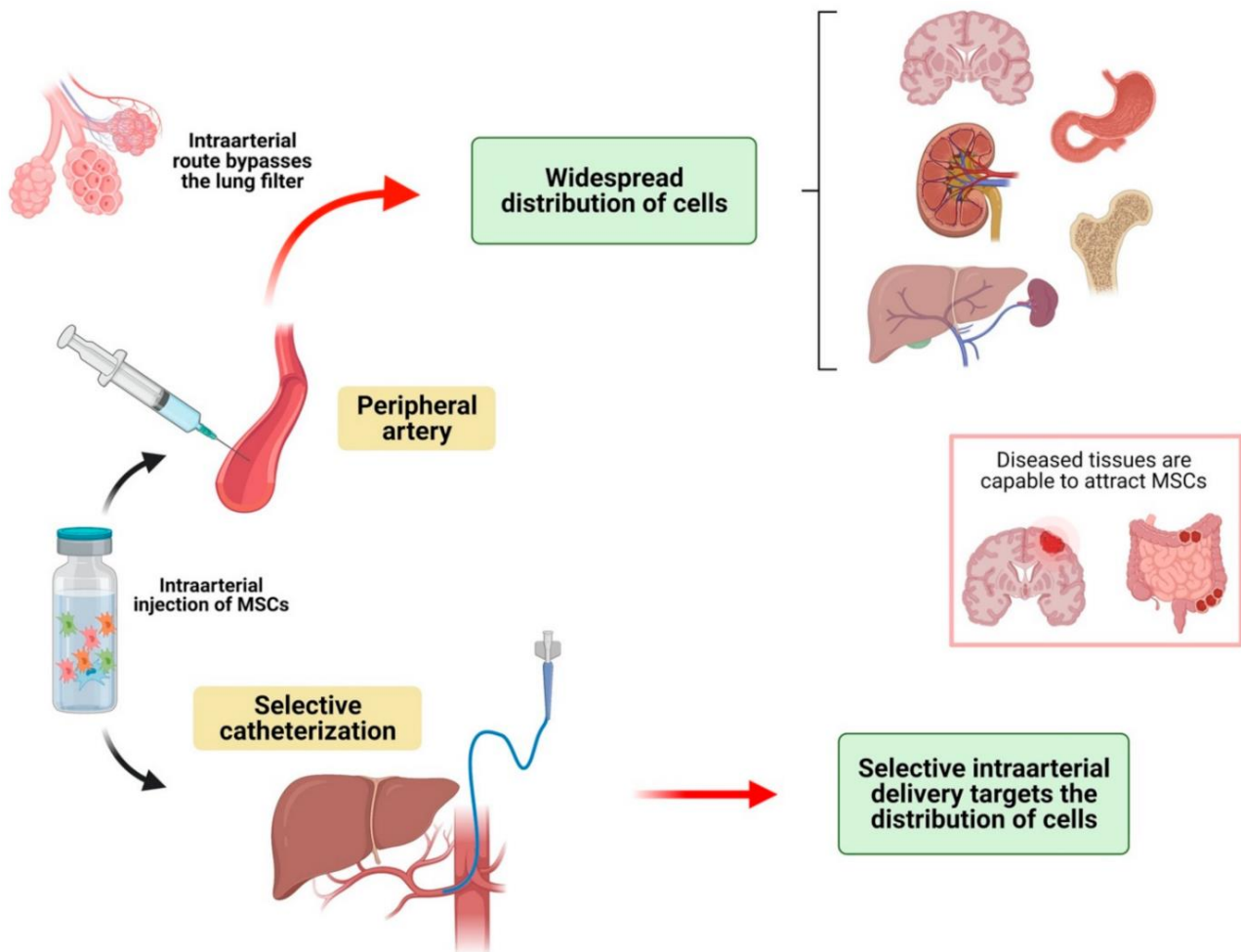


Figura 10: illustrazione schematica che mostra il destino delle MSC dopo somministrazione intra-arteriosa

Indipendentemente dalla via di somministrazione (IV o IA), è stato osservato come gli organi o i tessuti danneggiati siano in grado di richiamare le MSC verso la loro sede. Tale processo, come anticipato precedentemente, è mediato da citochine infiammatorie e chemochine prodotte dall'organo da (Dane et al., 2017), (Taylor et al., 2020). C

Esiste una terza modalità di somministrazione delle cellule nel tessuto danneggiato, o in prossimità di esso. Tale metodica viene preferita in caso di lesioni focali o processi infiammatori ben delimitati, come lesioni tendinee, interarticolari

o a localizzazione encefalica. Sono stati inoltre condotti studi che hanno utilizzato questa metodica come trattamento a lesioni dell'apparato cardiovascolare, urinario, riproduttivo, di cute e sottocute e del sistema linfatico (Sanchez-Diaz et al., 2021).

Per quanto riguarda la somministrazione intra-articolare, essa è stata ampiamente utilizzata in modelli animali. L'iniezione delle MSC dove le cellule non sono libere di entrare nella circolazione sistemica, ma riescono comunque a diffondere per chemiotassi nei tessuti infiammati circostanti come tendini e legamenti, grazie alle citochine infiammatorie liberate da essi (Yang et al., 2019).

Sono state descritte inoltre vie di somministrazione intratecali, intracerebrali o intraventricolari, in caso di patologie a carico del sistema nervoso centrale (SNC) (Barberini et al., 2018; Xie et al., 2016; Park et al., 2016). Addirittura, Hua Li e colleghi hanno dimostrato come una somministrazione intranasale di MSC abbia permesso una migrazione di tali cellule al SNC (Y. Hua Li et al., 2015). Combinazioni tra le diverse vie di somministrazione sopracitate sono possibili, ma devono essere valutate attentamente in base alle esigenze specifiche del paziente.

CELLULE ALLOGENICHE VS CELLULE AUTOLOGHE: PRO E CONTRO

In materia di terapia cellulare, si definiscono cellule autologhe le cellule prelevate dal paziente stesso e utilizzate per il trattamento della sua malattia. Il termine "autologo" significa "proveniente dalla stessa persona".

Le cellule sono "allogene" e quindi provengono da un individuo diverso dal ricevente. Le cellule autologhe hanno diversi vantaggi rispetto alle cellule allogeniche. Innanzitutto, sono compatibili con il paziente e quindi non richiedono un processo di compatibilità. In secondo luogo, sono meno suscettibili di rigetto da parte del sistema immunitario del paziente (C. Li et al., 2021). L'utilizzo di cellule autologhe presenta però alcuni svantaggi. Innanzitutto, la produzione di queste cellule richiede tempo, il che le rende meno adatte al trattamento di patologie acute. Inoltre, non tutti i pazienti sono idonei al prelievo

di tessuto adiposo o midollo osseo, a causa di patologie che rendono questa procedura controindicata.

In Italia, l'uso di cellule autologhe è consentito per il trattamento di pazienti in ambito clinico, mentre l'impiego di cellule allogeniche è consentito solo per la ricerca sperimentale, previa approvazione del Ministero della Salute. È necessario condurre ulteriori ricerche per ridurre i rischi associati alle cellule allogeniche, in modo da poterle utilizzare in ambito clinico.

<https://www.anmvioggi.it/images/ACCORDO LINEE GUIDA STAMINALI IN MEDICINA VETERINARIA.pdf>

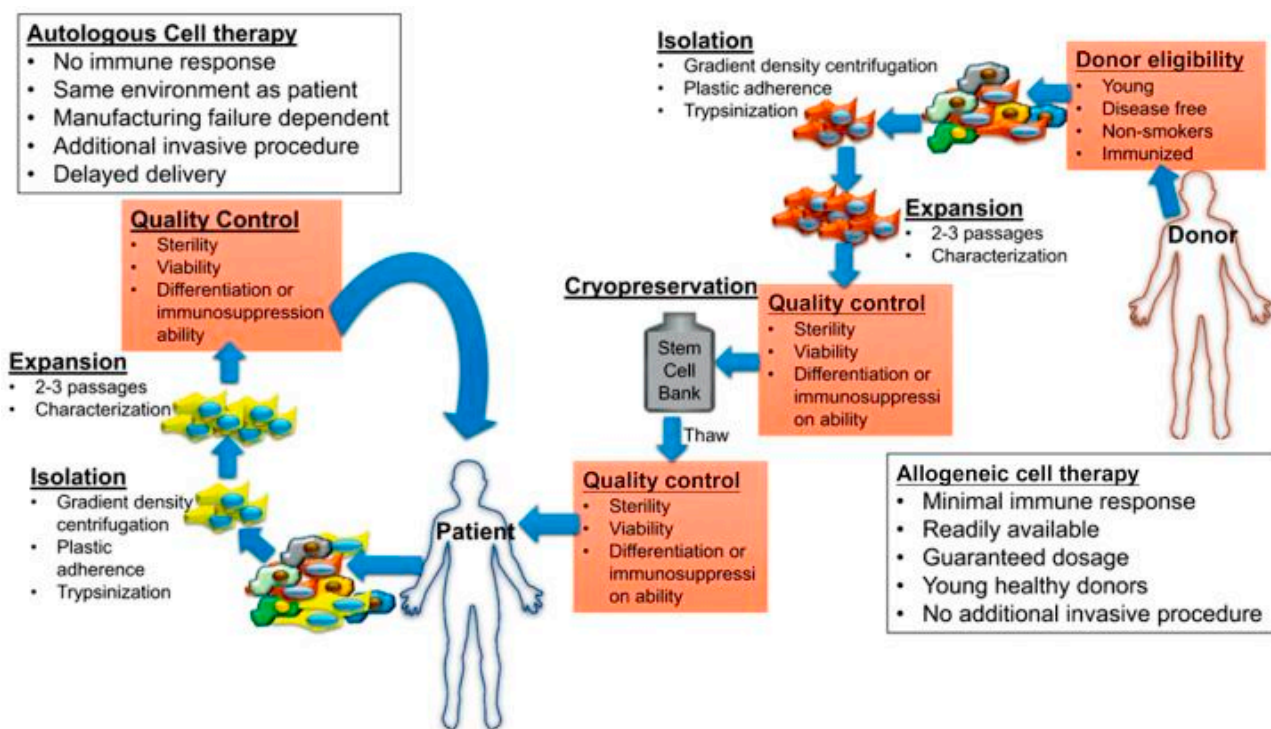


Figura 11: confronto tra MSC utilizzate come terapia autologa e allogenica. (Karantalís et al., 2015)

SICUREZZA E ASPETTI REGOLATORI DELLE TERAPIE A BASE DI CELLULE STAMINALI IN MEDICINA VETERINARIA

Sono state proposte delle linee guida per i prodotti medicali contenenti cellule staminali ad uso veterinario. Tali linee guida, sono state redatte dal comitato per i medicinali veterinari (CVMP) dell'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) al fine di garantire un monitoraggio rigoroso non solo dal punto di vista della composizione del farmaco, ma anche dal punto di vista microbiologico in tutte le fasi del processo di preparazione del prodotto finale. Esse includono misure per garantire la sicurezza dei prodotti, come la verifica dell'assenza di agenti estranei, come virus, batteri e protozoi patogeni per cavalli e cani (in relazione alla regione di provenienza e alla situazione epidemiologica della regione di origine) che non devono essere presenti in nessuna fase di preparazione. Le linee guida per la produzione e il controllo di medicinali veterinari immunologici dovrebbero essere applicate anche alle cellule staminali mesenchimali allogeniche.

In generale, si raccomanda che i donatori di cellule siano clinicamente sani. Per le cellule di animali neonati o provenienti da tessuti placentari, è consigliabile testare le madri per la presenza di agenti infettivi. È sempre opportuno effettuare uno screening del donatore, prestando particolare attenzione all'anamnesi, alle informazioni cliniche, ai test per la presenza di agenti patogeni specifici e al fine di verificare l'assenza di agenti patogeni. Tutti i materiali di origine biologica necessari per la raccolta, la selezione, la coltura e la modifica delle cellule dovrebbero essere chiaramente identificati e testati. L'asepsi è quindi essenziale per ridurre al minimo la probabilità di contaminazione da parte di agenti estranei. (Linee guida EMA). Tutte queste raccomandazioni sono volte a garantire che i medicinali a base di cellule staminali siano sicuri ed efficaci per i pazienti.

USO DELLE MSC IN MEDICINA VETERINARIA

Ad oggi, le cellule staminali sono state utilizzate (per lo più sperimentalmente) per il trattamento di una varietà di malattie in diverse specie di animali domestici e non. Inizialmente, l'attenzione della medicina veterinaria si è concentrata sulle malattie ortopediche, ma ora si sta espandendo rapidamente in altri settori come le malattie a carico dell'apparato digerente, del fegato, dei reni, patologie cardiache, respiratorie, neuromuscolari, malattie del sistema circolatorio e riproduttore. Gli animali da compagnia sono spesso utilizzati come "modello" in quanto

processi patologici propri dell'uomo. Purtroppo sono logisticamente più spartani rispetto a studi condotti con una metodica standardizzata in animali da laboratorio. La complessità del valido in ambito clinico risiede nel fatto che esistono numerose variabili (costi delle procedure che il proprietario deve sostenere, etica professionale, mancanza di dati legati alla mancanza di un follow up).

Patologie del sistema muscolo-scheletrico

Tendiniti

Le lesioni traumatiche di tendini e legamenti guariscono naturalmente con la formazione di tessuto cicatriziale, che è funzionalmente deficitario rispetto al tessuto sano. Mentre la lesione iniziale causa una riduzione della rigidità strutturale, la fibrosi cancella completamente l'architettura fisiologica e la funzione del legamento (Dakin SG., 2011). Ciò si traduce in funzione locomotoria compromessa incline a recidive (Dyson SG., 2004). Il trattamento ottimale dovrebbe, quindi, mirare al ripristino della normale struttura e funzione del tessuto. Le terapie tradizionali per le lesioni tendinee nei cavalli sono basate sul raffreddamento della parte lesa (Petrov R., 2003), sul bendaggio e sul periodo di riabilitazione tramite esercizio controllato. I trattamenti farmacologici includono l'uso di corticosteroidi sistemici e locali o altri farmaci antiinfiammatori (Chan KM et al., 2009), ma generalmente il trattamento chirurgico è spesso necessario (Jann HW et al., 1990). Queste tecniche conservative non consentono la completa guarigione dei tessuti, la recidiva è comune e spesso gli animali non sono in grado di tornare al livello di prestazioni iniziali (Jann HW et al., 1990). Il trattamento ideale dovrebbe quindi mirare a rigenerare la normale matrice tendinea. L'uso delle MSC è stato introdotto come alternativa all'approccio tradizionale, poiché rappresenta un potenziale strumento per una migliore rigenerazione dei tessuti (Smith RK et al., 2003) (Renzi S et al., 2013). La terapia rigenerativa basata sulle cellule mira alla guarigione tramite una corretta formazione di fibre collagene e il recupero ottimale della normale attività del tendine con un minor rischio di recidiva. La migliore fonte di cellule staminali per le tendinopatie sarebbe quindi il tendine patologico stesso (Filomeno P et al., 2012). Purtroppo, però, l'isolamento delle cellule staminali dai tendini è molto impegnativo e non esiste un protocollo standard di induzione per la tendonogenesi (Costa AR et al., 2019).

Le cellule staminali provenienti da altre fonti, principalmente da tessuto adiposo e midollo osseo, sono state quindi utilizzate per la rigenerazione cellulare dei tendini. L'impianto autologo di BMMSC nel tendine flessore digitale superficiale del cavallo è stato segnalato per la prima volta nel 2003 (Smith RK et al., 2003). Dopo che le cellule sono state iniettate in 11 cavalli da corsa con lesioni digitali superficiali del tendine flessore, è stato riportato un significativo recupero clinico (Pacini S et al., 2007). Allo stesso modo, in uno studio di coorte che include 141 cavalli da corsa con lesione del tendine flessore digitale superficiale, l'iniezione intralesionale di BMMSC autologo ha provocato la riduzione di oltre il 28% delle recidive in tutti i cavalli con 2 anni di follow-up (Godwin EE et al., 2012). I risultati hanno mostrato una significativa riduzione del tasso di recidiva rispetto a quelli di uno studio simile dello stesso tipo di lesioni e follow-up, in cui i cavalli sono stati trattati con iniezione intralesionale di acido ialuronico, beta aminopropionitrile fumarato o glicosaminoglicani polisolfurati (Dyson SJ., 2004).

Oltre ai cavalli, anche i cani sono stati sottoposti a trattamenti sperimentali con MSC. Una lesione piuttosto comune nei cani è la lacerazione del legamento crociato craniale (Harasen G., 2002). La sua rottura è associata allo sviluppo di artrosi ed è la causa più comune di zoppia nei cani adulti (Chuang C et al., 2014). Attualmente, la terapia raccomandata è una correzione chirurgica (Molsa SH et al., 2014).

Par ec ch i s t u d i h a n n o e v i d e n z i a t o c h e l ' u t i l i z z o è p r o m e t t e n t i . È stato dimostrato che il livello di zoppia post-operatoria e dolore dopo singola iniezione intra-articolare di BMMSC allogenico potrebbe essere una valida alternativa al periodo di 1 mese di somministrazione orale di farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS) nei cani che necessitano la TPLO (Taroni M et al., 2017). È stato dimostrato inoltre che l'innesto autologo intraarticolare di BMMSC nel sito di inserzione del legamento crociato craniale lesionato ha un effetto antiinfiammatorio (Lion E et al., 2014). L'iniezione post-operatoria intraarticolare o IV di MSC autologhe in cani affetti dalla medesima condizione ha provocato una diminuzione del livello di linfociti T CD8 +, diminuzione della concentrazione di CRP sierica e sinoviale, diminuzione dei livelli sinoviali di IFN- γ che persisteva a n 8 settimane dopo l'iniezione BMMSC (Muir P et al., 2012). Nei casi di strappo parziali in assenza di destabilizzazione dell'articolazione (casi in cui la chirurgia non è la soluzione ottimale) sono stati raccolti risultati promettenti usando BMMSC autologhe in combinazione con PRP (Canapp SO et al., 2016).

Patologie articolari

A causa della relativa ipocellularità e avascolarizzazione, il tessuto cartilagineo ha una capacità limitata di autoriparazione. Nei cavalli, è inoltre sottoposto a enormi forze di carico e dalle sollecitazioni meccaniche che vengono scaricate sulle superfici articolari durante la performance. Le patologie articolari sono tra le cause più comuni negli equini atleti insieme all'osteoartrite (Rossdale PD., 1985). Il trauma scheletrico, che comporta il danno alla cartilagine articolare, legamenti e menischi è spesso associato a una prognosi sfavorevole per quanto riguarda il recupero delle prestazioni atletiche dei cavalli (Walmsely JR et al., 2003), (Cohen JM et al., 2009). L'efficacia in vivo del trattamento intraarticolare di MSC per quanto riguarda patologie a carico del menisco e della cartilagine articolare nei cavalli è stata recentemente documentata. Il disturbo del sistema locomotore più studiato e descritto è lo spavin osseo, una malattia degenerativa delle articolazioni in cui il trattamento convenzionale si basa sull'applicazione di corticosteroidi antiinfiammatori per diminuire il dolore e l'infiammazione. In uno studio che ha visto coinvolti 16 cavalli con spavin osseo trattati con somministrazione intraarticolare di MSC autologhe estratte da tessuto adiposo, non sono stati osservati segni di zoppia 180 post trattamento nei cavalli trattati rispetto al gruppo di controllo non trattato. I risultati sono stati confermati dall'esame scintigrafico, che non ha identificato segni di processi infiammatori a livello di articolazioni tarsali nei cavalli trattati rispetto al gruppo di controllo in cui l'infiammazione era ancora presente (Nicpon J et al., 2013). Il trattamento con MSC risulta essere promettente anche nei cavalli con danni al menisco. In cavalli trattati con somministrazione intraarticolare di MSC estratte da midollo osseo autologo si è registrata una *restitutio ad integrum* più rapida rispetto a soggetti trattati con sola artroscopia (Ferris DJ et al., 2014). In un altro studio, 80 cavalli con artrosi sono stati trattati con MSC derivate da tessuto adiposo allogenico. In questi soggetti è stata osservata una significativa riduzione della zoppia durante un periodo di follow-up di 90 giorni, suggerendo un effetto benefico delle cellule allogeniche somministrate (Marinas PL., 2018). Tali risultati positivi ottenuti attraverso l'uso di MSC hanno permesso la riduzione della di farmaci antinfiammatori per un periodo di tempo prolungato e di conseguenza i loro ben noti effetti collaterali.

Patologie a carico dell'apparato digerente

La malattia infiammatoria intestinale (IBD) è un disordine autoimmune caratterizzato da una reazione di ipersensibilità cronica a carico della mucosa intestinale ad eziologia sconosciuta (Cerquetella M et al., 2010). Alcuni cani sono refrattari ai trattamenti tradizionali (a vita) con ciclosporina o steroidi (Perez Merino EM et al., 2015). Una singola infusione IV di adipose tissue-derived MSC (ADMSC) allogeniche ha provocato la remissione clinica in 9 su 11 cani con grave IBD 6 settimane dopo il trattamento, con un significativo aumento dei livelli di albumina, cianocobalamina, e folati nel sangue relativamente comune nei pazienti felini affetti da vomito cronico e diarrea. In uno studio in doppio cieco controllato con placebo, i gatti con IBD sono stati trattati con ADMSC allogeniche. I proprietari hanno riportato un miglioramento significativo o una risoluzione completa dei segni clinici in 5 gatti su 7. Al contrario, nei gatti che hanno ricevuto il placebo, non si è registrato nessun cambiamento, addirittura è stato segnalato il peggioramento della sintomatologia clinica (Webb TL et al., 2015).

Epatopatie

Esistono diversi studi che hanno preso in considerazione il trattamento di epatopatie nei cani attraverso l'uso di cellule. In uno studio, Yan Y e colleghi hanno esaminato l'effetto della somministrazione IV di ADMSC autologo come trattamento di lesioni epatiche acute indotte artificialmente nei cani (Yan Y et al., 2019). Attraverso il processo di homing, le ADMSC sono giunte al fegato, i livelli di enzimi epatici nel sangue periferico si sono ridotti e la struttura del tessuto epatico è stata ristabilita dopo la terapia, indicando un potenziale per uso di MSC nelle malattie del fegato in animali domestici. In un altro lavoro che ha preso in considerazione un modello canino di cirrosi epatica, l'applicazione IV di BMMSC autologhe ha diminuito significativamente l'area fibrotica del fegato e ne ha migliorato la funzionalità (Matsuda T et al., 2017). Analogamente alla somministrazione IV, la somministrazione intrarteriosa (IA) di BMMSC in un modello canino di fibrosi epatica si è dimostrata sicura. È interessante, inoltre, che i livelli di enzimi epatici nel sangue periferico è durato più a lungo (Nishimura t et al., 2019). ADMSC autologhe sono state utilizzate inoltre anche in ripetute somministrazioni IV come trattamento a casi di epatopatia degenerativa in 10 cani. Tutti gli animali hanno mostrato un miglioramento significativo della funzionalità epatica dimostrato misurando una diminuzione di enzimi e biomarkers epatici dopo ogni applicazione) rispetto al gruppo di controllo (Gardin

C et al., 2018). È stato anche riportato un caso clinico di sindrome epatocutanea trattata con MSC. Gli ADMSC allogeneici sono stati amministrati ripetutamente direttamente nel parenchima epatico o nel circolo portale. La sopravvivenza del cane è stata più lunga rispetto ai tempi previsti per questa malattia; i segni clinici, inoltre, sono regrediti (Nam A et al., 2017).

Poiché la somministrazione IV di MSC provoca l'accumulo di cellule nel fegato dopo essere stato eliminato dai polmoni (de Witte SFH et al., 2018) la via IV della somministrazione sembra essere logica per il trattamento di malattie del fegato che rispondono alla terapia MSC negli animali. Tuttavia, le conclusioni sulla migliore via di somministrazione ed anche sull'efficacia e sulla sicurezza di MSC allogeneici nel trattamento delle malattie del fegato sono limitate da un numero basso di studi condotti. Sono pertanto necessari ulteriori studi in ambito clinico su un numero maggiore di soggetti in condizioni standardizzate.

Nefropatie

La malattia renale cronica (CKD) è una condizione medica comune nei gatti geriatrici ed è caratterizzata da nefrite tubulointerstiziale cronica, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale. Attualmente, il trapianto renale è l'unica terapia che può ripristinare la funzione renale (Adin CA et al., 2001). Le terapie a base di cellule staminali possono quindi essere considerate come opzioni di trattamento meno aggressive. A causa di gravi effetti collaterali e dei rischi associati all'anestesia durante inoculazione intrarenale di cellule staminali, la somministrazione IV di MSC in pazienti svegli è preferibile (Quimby JM et al., 2011) (Vidane AS et al., 2017). Tuttavia, la somministrazione IV di ADMSC allogeneiche nei gatti con malattia renale, pur non essendo stata associata a effetti collaterali, ma non sono stati segnalati miglioramenti a breve termine nella funzione renale (Quimby JM et al., 2013) (Quimby JM et al., 2017). Tuttavia, in uno studio condotto da Vidane et al. (Vidane AS et al., 2017), a gatti affetti da CKD spontanea sono state ripetutamente iniettate IV MSC allogeneiche derivate dalle membrane amniotiche feline e dopo la seconda somministrazione di MSC, è stato osservato un miglioramento significativo della funzione renale. In particolare, le concentrazioni sieriche di creatinina e proteine delle urine sono diminuite e il peso specifico delle urine è aumentato. Un notevole miglioramento è stato riportato anche nelle condizioni cliniche generali dei gatti, tra cui l'assunzione di cibo e il comportamento sociale.

I risultati contraddittori di alcuni studi complicano le conclusioni riguardo alla applicabilità della terapia MSC nei gatti con CKD. Sono necessari ulteriori studi per determinare la possibile influenza di diversi fattori che potrebbero influenzare i risultati della terapia con MSC in gatti con CKD (fonte di MSC, somministrazioni singole o ripetute, tempo di applicazione).

Patologie cardiache

In medicina umana, le terapie che prevedono la riparazione del miocardio dopo l'infarto miocardico acuto o cronico vengono utilizzate da diversi anni (Wernley B et al., 2019). L'infarto miocardico primario è raramente osservato negli animali da compagnia (Hoffman AM, Dow SW., 2016). Tuttavia, nelle razze di cani grandi e giganti, la cardiomiopatia dilatativa è una malattia piuttosto comune. L'inevitabile progressione di questo disturbo porta ad insufficienza cardiaca congestizia refrattaria e alla morte (Pogue B et al., 2013). Un trattamento sperimentale per questa condizione è stato condotto in un doberman con somministrazione intra-coronarica retrograda di ADMSC allogeniche. Sebbene il trattamento fosse sicuro, non sono stati osservati effetti benefici della terapia con cellule staminali (Pogue B et al., 2013). Nelle razze toy, la patologia cardiaca più comune è la malattia valvolare degenerativa, che è spesso complicata da dilatazione ventricolare e disfunzione del miocardio (Fox PR., 2012). Petchdee e Sompeewong hanno studiato l'effetto della somministrazione IV di cellule staminali derivate da denti decidui di cucciolo come trattamento verso la malattia valvolare degenerativa (Petchdee S, Sompeewong S., 2012). I loro risultati hanno mostrato un miglioramento nella frazione di eiezione ventricolare sinistra, ma ulteriori studi saranno necessari per stabilire eventuali effetti positivi in quanto si tratta di uno studio condotto su un numero di soggetti limitato.

Patologie respiratorie

In medicina veterinaria le malattie respiratorie sono un problema comune. Soprattutto nei cavalli, l'ostruzione delle vie aeree ricorrenti (RAO) o malattia infiammatoria delle vie aeree,

è una condizione medica grave per la quale non vi è alcun trattamento efficace disponibile. La malattia si sviluppa in presenza di fieno ammuffito, paglia polverosa e pollini. I cavalli soffrono di tosse frequente, aumento dello sforzo respiratorio a riposo e intolleranza all'esercizio. I segni clinici possono essere controllati dalla somministrazione di corticosteroidi, broncodilatatori, o controllo ambientale. I farmaci possono avere effetti collaterali e sono quindi necessarie nuove opzioni terapeutiche. Barussi et al. (Barussi FC et al., 2016) hanno studiato l'effetto dell'applicazione intra-tracheale di cellule mononucleate derivate dal midollo osseo sul decorso dell'infiammazione respiratoria nei cavalli affetti da RAO. Il confronto tra trattamento con singola somministrazione intra-tracheale di cellule autologhe e terapia orale con desametasone ha dimostrato che le cellule mononucleate derivate dal midollo osseo hanno ridotto significativamente la risposta infiammatoria e la sintomatologia clinica nei cavalli affetti da RAO. I livelli di IL-10 sono aumentati dopo il trattamento cellulare e sono stati significativamente superiori rispetto al gruppo di controllo trattato con desametasone. I risultati di questo studio sono correlati ai risultati positivi di studi sperimentali con condizioni respiratorie indotte nei cani (Hao Y et al., 2018) e nei gatti (Trzil JE et al., 2016).

Patologie spinali e disordini neuromuscolari

Le lesioni del midollo spinale, sia negli animali, che negli esseri umani, spesso si traducono in una disabilità permanente (Besalti O et al., 2016). Nei cani, una lesione del midollo spinale potrebbe essere indotta da un trauma o da una patologia discale. In entrambe i casi, trattamenti con cellule staminali sono stati studiati con risultati benefici. Una terapia a base di cellule staminali derivanti dal midollo osseo autologhe (BMMSC) è stata sperimentata come trattamento per lesioni spontanee del midollo spinale secondarie a trauma spinale nei cani. Tali cellule sono state applicate in loco durante intervento di emilaminectomia. Sono stati osservati lievi o moderati miglioramenti nell'andatura, nella nocicezione e nella propriocezione in alcuni soggetti (Besalti o et al., 2016, Penha EM et al., 2014). In un altro studio, BMSC allogeneiche sono state combinate con la terapia farmacologica standard e questa combinazione ha indotto un miglioramento significativo per quanto riguarda il recupero funzionale dei pazienti con lesione midollare traumatica rispetto al solo farmaco convenzionale (Bhat IA., 2019). Tuttavia, in cani con malattia degenerativa del disco

intervertebrale naturale, il trapianto di BM-MSC autologo non ha influenzato i risultati clinici e non sono stati rilevati effetti rigenerativi in uno dei tre pazienti (Steffen F et al., 2017).

Rigenerazione tissutale in corso di patologie cutanee

La mancata guarigione delle ferite è spesso la conseguenza di una varietà di meccanismi cellulari e molecolari inadeguati. Spesso porta alla formazione di piaghe, accompagnata da disagio e dolore per il paziente. Pertanto, per il trattamento di piaghe accompagnate da grave infiammazione e risposta iperplastica, le MSC potrebbero essere una valida opzione di trattamento a causa del loro potenziale antinfiammatorio e rigenerativo (Ojeh N et al., 2015). Diversi studi su modelli animali hanno dimostrato l'effetto benefico del trattamento con MSC nella guarigione delle ferite nelle capre (Pratheesh MD et al., 2017), pecore (Martinello T et al., 2018), cavalli (Textor GA et al., 2018) e cani (Johnson V et al., 2018). Oltre ai modelli animali, un miglioramento significativo delle ferite spontanee è stato documentato in parecchi studi facendo uso della terapia delle cellule staminali. In quattro cavalli con ferite spontanee infette e non responsive alle terapie tradizionali, sono state iniettate localmente e sistematicamente cellule staminali di derivazione ematica. In tutti e quattro i casi, l'esito positivo del trattamento è stato documentato: si è creato nuovo tessuto di granulazione e piccole cicatrici al centro della ferita, con *restitutio ad functionem* 4 settimane dal trattamento (figura 12) (Spaas JH et al., 2013).



Figura 12: rappresentazioni fotografiche dell'evoluzione della guarigione delle ferite di due puledri (casi a, b) dal giorno 0 (somministrazione MSC) fino a completa guarigione (caso a) e (caso b) 4

La guarigione completa della ferita cutanea in assenza di cicatrici è stata osservata anche in una puledra dopo ripetuta applicazione locale di MSC eterologhe disperse in un mezzo costituito da gel di carbossimetilcellulosa. La ferita è guarita completamente in 5 giorni (Lanci A et al., 2019).

Oltre alla rigenerazione delle ferite, le MSC sono state utilizzate anche per il trattamento della dermatite atopica, una delle malattie della pelle più frequenti nei cani. Due studi hanno ottenuto risultati contraddittori utilizzando ADMSC somministrate IV in cani con dermatite atopica. Nel primo caso non è stato osservato alcun miglioramento significativo dei segni clinici o del prurito (Hall MN et al., 2010). Il secondo studio ha incluso 22 cani con dermatite atopica, non risponde alla terapia convenzionale. Il prurito è diminuito significativamente dopo 1 solo trattamento. La remissione dei segni clinici è durata almeno 6 mesi e non sono stati osservati effetti collaterali (Villatoro AJ., 2018). Il concetto alla base dell'impiego di MSC per l'immunomodulazione della dermatite atopica, ha portato Hall et al. a progettare uno studio clinico controllato che impiegasse una singola dose di ADMSC autologhe (1x10⁶ cellule IV) in cinque cani, utilizzando score clinici stabiliti per registrarne gli effetti. Le varie somministrazioni tramite inoculo sono state considerate sicure, ma non è stato osservato alcun beneficio conseguente alla somministrazione ADMSC.

Apparato riproduttore

Molti studi stanno cercando di trovare trattamenti utili ad incrementare la fertilità per scopi commerciali negli animali da allevamento. Purtroppo, però, l'obiettivo di incrementare o addirittura ripristinare la fertilità nelle fattrici anziane con un'iniezione intraovarica di BMMSC non è stato portato a termine (Grady ST et al., 2019). Analogamente, non sono stati osservate sostanziali modifiche nella composizione dello sperma o nel tasso di fertilità negli stalloni dopo la somministrazione intra-testicolare di BMMSC allogenico. Tuttavia, la sicurezza della procedura e la mancanza di effetti collaterali rilevati nello studio suggerisce che un tale approccio potrebbe essere teoricamente sfruttato per trattare condizioni patologiche o degenerative del testicolo (Papa PM et al., 2020). È interessante notare che gli spermatozoi del cane possano essere suscettibili al trattamento con EVs derivate ADMSC durante la crioconservazione, poiché l'aggiunta di EVs riduce il numero di spermatozoi danneggiati con diminuzione del ROS nello sperma scongelato (Qamar AY et al., 2019). Per sfruttare le proprietà immunomodulanti delle MSC nelle patologie uterine, sono state studiate ed isolate MSC endometriali da scrofe (Miernik K et al., 2019), vacche (Cabezas J et al., 2014), pecore (Letouzey V et al., 2015), capre (Tamadon A et al., 2017) e cavalle (Cabezas J et al., 2018). Mambelli et al. (Mambelli LI et al., 2013), hanno dimostrato che dopo essere state somministrate per via intrauterina, le MSC rimangono in sede fino a 21 giorni dopo l'applicazione. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare le potenziali proprietà immunomodulatorie e antinfiammatorie delle MSC endometriali e il loro potenziale nel trattamento dell'endometriosi ed altre patologie (E et al., 2018). Oltre alle patologie del sistema riproduttivo, è stata studiata una terapia a base MSC per il trattamento della mastite negli animali da reddito, evidenziando un effetto antiproliferativo contro la mastite mediata da *Staphylococcus aureus* nelle vacche (Cahuascano B et al., 2019) ed un effetto rigenerativo ed antifibrotico nella mastite cronica caprina (Costa CRM et al., 2019).

La *Trachemys scripta*, nota anche come tartaruga palustre americana, o tartaruga dalle orecchie rosse, è una specie di tartaruga semiacquatica originaria del Nord America, dove è diffusa in una vasta gamma di habitat, dalle zone umide costiere alle foreste paludose. Essa è una specie di tartaruga semiacquatica appartenente alla famiglia Emydidae e si nutre di una varietà di alimenti, tra cui pesci, insetti, molluschi, rane e piante acquatiche. Le femmine raggiungono la maturità sessuale a circa 4 anni di età, mentre i maschi a circa 3 anni. La stagione riproduttiva si svolge in primavera e in estate, dove la femmina depone da 10 a 50 uova in un nido scavato nel terreno. Le uova si schiudono dopo circa 2 mesi (Bonato L & Pivato, M., 2013).

La specie è stata introdotta in Europa e in altre parti del mondo a scopo ornamentale. È considerata una delle tartarughe più popolari come animali domestici nel mondo, ma è anche considerata una specie invasiva, grazie alla sua notevole resistenza e capacità di adattamento (Bonato L & Pivato, M., 2013). In Italia, la *Trachemys scripta* è stata introdotta negli anni '70 e '80, e da allora la sua popolazione è aumentata rapidamente (Benson DH, Blackburn TM., 2007). Per questo motivo, in Italia, la presenza della *Trachemys scripta* è considerata problematica. La sua presenza rappresenta una minaccia per gli ecosistemi nativi, poiché entra in competizione con le specie autoctone per le risorse alimentari e le nicchie ecologiche.

Per ridurre l'impatto negativo della *Trachemys scripta* sull'ambiente italiano, è stato sviluppato un piano per controllare la popolazione della specie. Il piano di controllo della popolazione di *Trachemys scripta* in Italia prevede che i detentori di tartarughe siano obbligati a denunciarne la presenza alle autorità competenti. È inoltre vietato abbandonare o cedere a terzi questi animali. Il piano prevede inoltre misure di sterilizzazione o, in alcuni casi, l'abbattimento degli esemplari presenti sul territorio, al fine di gestire e limitare l'impatto negativo di questa specie invasiva sull'ecosistema (Piano nazionale per la gestione della testuggine palustre americana - *Trachemys scripta*, 2020) (Cadi A. e Joly P., 2004) (Ficetola Gentile Francesco e Scali Stefano, 2010).

Attuazione del piano

L'attuazione del piano di controllo della *Trachemys scripta* richiede l'impegno di diversi attori, tra cui:

- Governo: il governo è responsabile dell'emanazione di leggi e regolamenti per la protezione della biodiversità.
- Enti locali: gli enti locali sono responsabili della gestione del territorio e possono contribuire al controllo della popolazione di *Trachemys scripta* attraverso azioni di sensibilizzazione e di raccolta degli esemplari.
- Associazioni ambientaliste: le associazioni ambientaliste possono contribuire alla *diffusione di informazioni e alla sensibilizzazione del pubblico sui rischi della Trachemys scripta*.
- Medici veterinari esperti in animali esotici: al fine di effettuare interventi di sterilizzazione, previo riconoscimento della specie in questione come effettivamente appartenente al genere *Trachemys sp.*

L'attuazione del piano di controllo della *Trachemys scripta* dovrebbe portare a una riduzione della popolazione della specie in Italia. Questa riduzione dovrebbe contribuire a proteggere la biodiversità locale, riducendo la competizione con le specie native e la predazione sulle specie native.

Limiti del piano:

Il piano di controllo della *Trachemys scripta* presenta alcuni limiti, tra cui:

- Difficoltà di cattura degli esemplari in natura: la *Trachemys scripta* è una specie molto adattabile e può vivere in una vasta gamma di habitat. Questo rende difficile catturare gli esemplari in natura.
- Reazioni del pubblico: è possibile che alcune persone si oppongano al piano di controllo della *Trachemys scripta*, in quanto potrebbero considerarlo un'uccisione indiscriminata di animali.

Il piano di controllo della popolazione di *Trachemys scripta* in Emilia-Romagna prevede la cattura e l'abbattimento degli esemplari, come riportato da Macchi et al. nel 2020. In alternativa, in casi eccezionali, come ad esempio in presenza di popolazioni ridotte e isolate,

è possibile considerare la sterilizzazione chirurgica come alternativa all'abbattimento, previa valutazione della fattibilità dell'intervento in termini di dimensioni della popolazione e costi.

Il presente studio ha esaminato un gruppo di tartarughe *Trachemys scripta* che sono state recuperate da privati nell'ambito di un progetto approvato a livello regionale. Il progetto, condotto dal Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università degli Studi di Parma in collaborazione con le associazioni Rescue Dogs e ENPA Parma, prevede il recupero degli esemplari di *T. scripta*, la loro sterilizzazione chirurgica e il loro reinserimento in un'area specificamente scelta per evitare danni alla fauna locale. (Ficetola et al., 2010).

Per quanto riguarda lo studio sull'isolamento delle cellule staminali mesenchimali (MSC) dal tessuto adiposo di *Trachemys scripta*, sono stati inclusi 5 esemplari adulti di entrambi i sessi. Gli animali hanno presentato un esame obiettivo generale nella norma e un peso medio di 1,59 kg. Sono stati considerati clinicamente sani, poiché non presentavano segni clinici di patologie sottostanti. Il tessuto adiposo è stato raccolto contemporaneamente all'intervento di sterilizzazione.

MATERIALI E METODI

SCelta E PREPARAZIONE DEI SOGGETTI DONATORI

Il progetto è stato approvato dal comitato etico (OBPA) con la delibera PROT. N. 15/CESA /2022.

In questo studio, tutti i soggetti sono stati sottoposti a un prelievo di sangue dalla vena giugulare (Doneley et al., 2018) di circa 0.5 ml. Il campione è stato raccolto in provette contenenti litio eparina come anticoagulante e utilizzato per eseguire un microematocrito e un esame biochimico del plasma prima dell'intervento chirurgico come BUN, K+, TP, acidi biliari e acido urico.

In due soggetti con un peso superiore a 2 kg, è stato prelevato un ulteriore campione di sangue di 1,5 ml, che è stato conservato in una provetta con sodio citrato (3.2%) e inviato al laboratorio per l'isolamento dei leucociti (Di Ianni et al., 2015).

I soggetti che non presentavano alterazioni ematologiche rispetto ai parametri considerati normali per la specie (Carpenter and Harms nel 2023 Carpenter J et al., 2023) sono stati inclusi nello studio.

Essendo i rettili animali ectotermi, è importante mantenere temperature e livelli di umidità adeguati alla loro specie. La temperatura ideale per la specie è definita come zona di temperatura ottimale preferita (POTZ). Durante tutta la procedura, è importante monitorare la temperatura corporea del paziente. È possibile mantenere la temperatura corporea attivamente utilizzando strumenti conduttivi, convettivi o radianti. È anche possibile preservare il calore corporeo passivamente riducendo la perdita di calore per evaporazione. Per quanto riguarda il protocollo anestesilogico, è quindi stata garantita una temperatura corporea ottimale, mantenendo un ambiente con temperatura ambientale controllata, compresa tra 28°C durante il giorno e 25°C durante la notte prima di effettuare la procedura chirurgica (Longley L., 2008). La temperatura corporea dei soggetti è stata misurata tramite utilizzo di termometro digitale con sonda inserita in sede cloacale e mantenuta a 28°C per tutta la durata dell'operazione. Per quanto riguarda la premedicazione, è stata utilizzata una combinazione di ketamina (10mg/kg), dexmedetomidina (50 g/kg) e midazolam (1 mg / kg) IM (muscoli dell'avambraccio multimodale, è stato somministrato prima della somministrazione dei farmaci anestetici (Scarabelli S and Di Girolamo N., 2022) (Carpenter J., 2023) (Greer L et al., 2001). Un catetere venoso di dimensioni adeguate al calibro vascolare di ciascun soggetto è stato inserito nella vena giugulare per garantire l'accesso venoso. Durante tutto l'intervento, i soggetti sono stati monitorati con sound doppler, ECG e capnografia per valutare la profondità del piano anestesilogico. Prima della somministrazione dei farmaci anestetici, e poi ogni 5 minuti, sono stati valutati il riflesso palpebrale, il tono mandibolare, la facilità dell'estensione manuale del collo ed il riflesso di retrazione degli arti anteriori e posteriori in risposta ad una lieve trazione. Questi parametri sono stati utilizzati per determinare il grado di analgesia e il recupero dell'animale post procedura chirurgica, durante il risveglio. Tutti i riflessi sono stati indicati come presenti o assenti. L'assenza dei riflessi di retrazione degli arti anteriori e posteriori è stata considerata segno di un piano anestesilogico adeguato alla procedura chirurgica di sterilizzazione. La

perdita del tono mandibolare è stata inoltre indicativa della possibilità di intubazione dei soggetti.

In caso di mancata perdita del tono mandibolare, è stato utilizzato il propofol come agente di induzione a 5mg/kg (Carpenter J., 2023) (Greer L et al., 2001). Tutti i soggetti sono stati intubati tramite tracheotubi non cuffiati o tracheale del soggetto. Una lieve pressione esercitata dal tracheotubo sulle cartilagini aritenoidi ne ha garantito l'apertura e l'accesso all'intubazione (Figura 13). Il tracheotubo è stato avanzato fino a circa il 50% della lunghezza del collo dell'animale, al fine di evitare l'intubazione

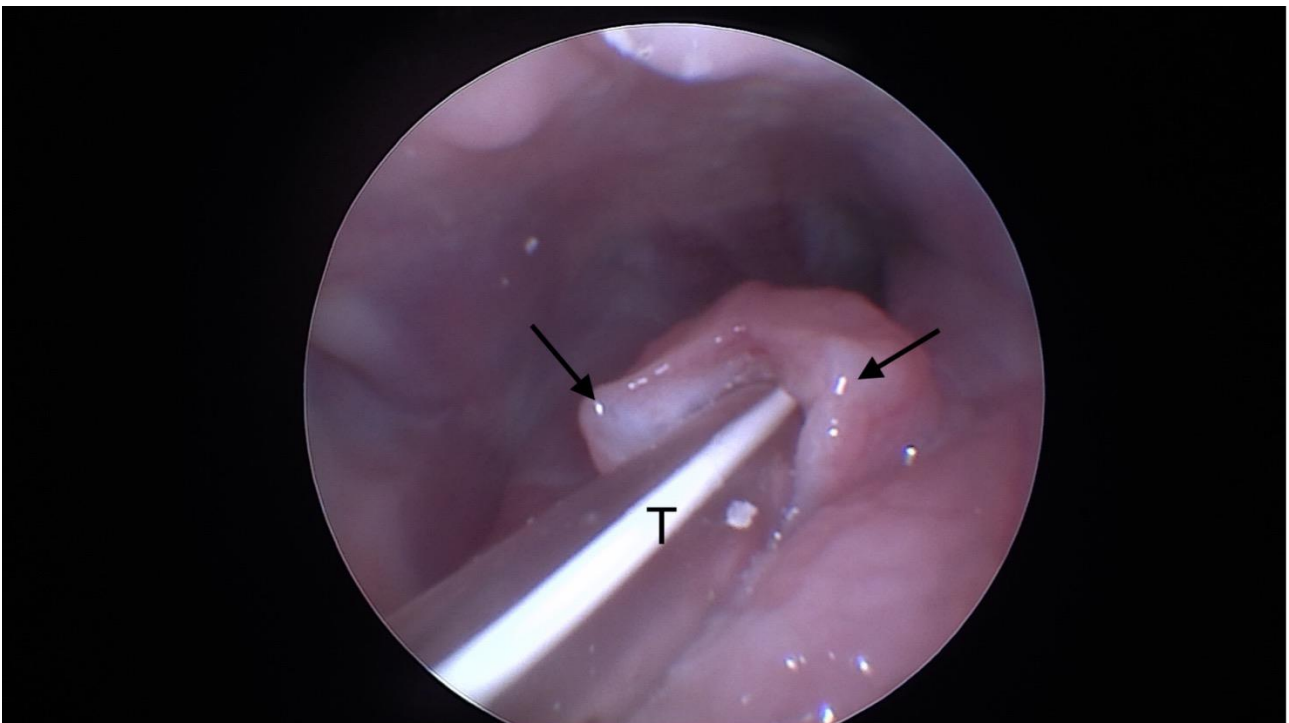


Figura 13: il tracheotubo (T) è introdotto delicatamente all'interno della glottide esercitando una lieve pressione sulle cartilagini aritenoidi.

Durante l'intervento, i soggetti sono stati mantenuti con gas alogenati (isoflurano all'1.5%) e ventilati manualmente tramite un pallone da 0.5 litri a 4 atti al minuto. Al termine dell'intervento, l'effetto della dexmedetomidina è stato mantenuto con un dosaggio di 0.5 mg/kg per via intramuscolare (Eshar D et al., 2021).

Procedura chirurgica

Prima di effettuare l'intervento chirurgico sono stati stimolati ad urinare utilizzando un catetere e fatto roteare contro la mucosa cloacale. Questo ha permesso lo svuotamento della vescica, al fine di ridurre al minimo i rischi legati ad una perforazione iatrogena della stessa durante l'accesso. Per quanto riguarda la tecnica chirurgica, la procedura eseguita è stata quella proposta da Proença and Divers nel 2015 (Proença L et al., 2015). Al fine di evitare complicazioni legate ad una eccessiva replezione del grosso intestino (eventualità che avrebbe ridotto la visibilità degli organi genitali durante la procedura endoscopica) è stato effettuato un digiuno preoperatorio di 5 giorni.

Nel caso dei soggetti di sesso femminile, sono state eseguite ecografie e radiografie preoperatorie per valutare la presenza o l'assenza di uova e misurarne le dimensioni, al fine di determinare la possibilità di estrazione attraverso la fossa del fianco. In caso contrario, sarebbe stato necessario procedere attraverso una celiotomia tramite piastrotomia. Tutti i soggetti sono stati posizionati in decubito laterale sinistro e mantenuti in posizione da supporti in gommapiuma ancorati al tavolo chirurgico tramite nastro telato. Le zampe posteriori sono state estese ed unite con del cerotto di tela al fine di esporre la fossa del fianco destra e sinistra. Successivamente, è stata eseguito uno scrub chirurgico della fossa femorale e delle aree anatomiche adiacenti, come il piastrone, il ponte e il carapace.

È stata eseguita un'incisione caudale al centro della fossa femorale e craniale con una lama da bisturi n° 11, seguita da una dissezione dei tessuti sottocutanei per via smussa fino a giungere all'esposizione dell'aponeurosi del l'addome. Quella è stata delicatamente dissezionata per via smussa permettendo così la visualizzazione della membrana celomatica (figura 14) e degli organi celomatici sottostanti.

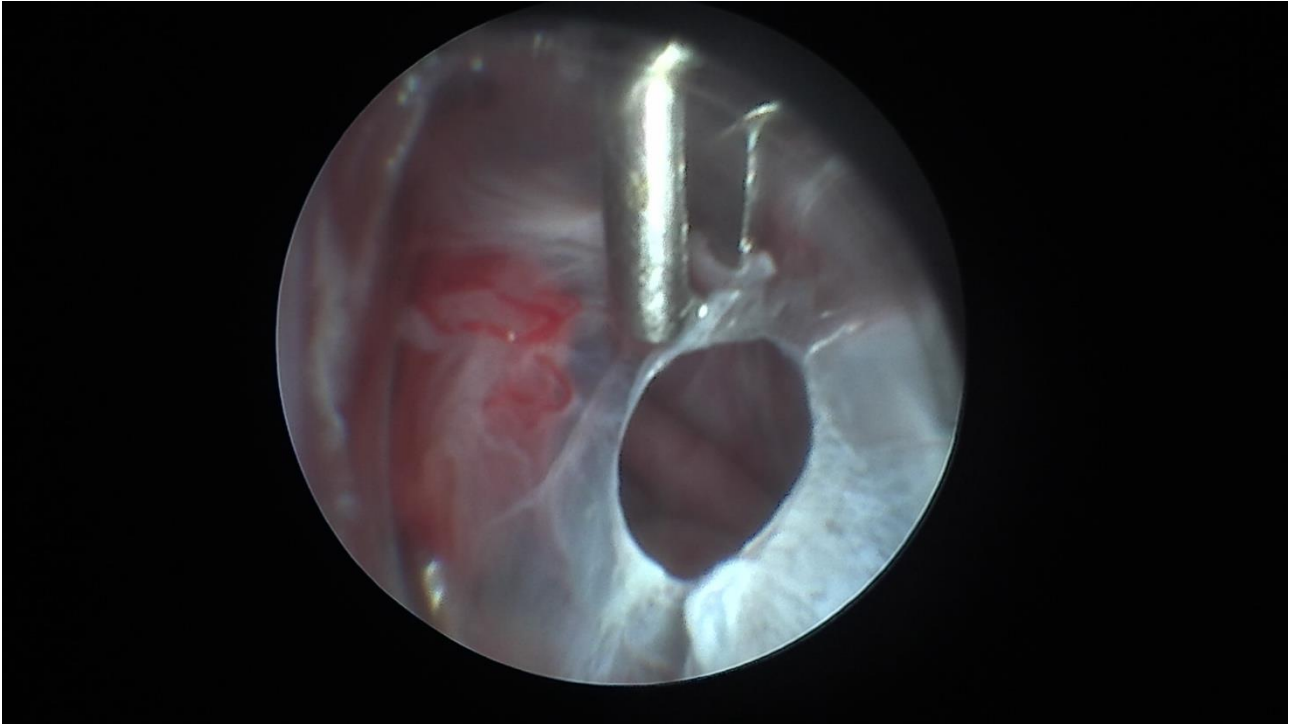


Figura 14: immagine endoscopica che mostra la membrana celomatica appena dissezionata. Attraverso, è possibile intravedere gli organi celomatici.

Dal tessuto sottocutaneo è stato prelevato sterilmente un campione di circa 1 g di tessuto adiposo (" f a t di colore bruno (figura 15).



Figura 15: Il deposito adiposo (" fat pad") è isolato per via di forbici Mayo. Notare la colorazione brunastra del tessuto adiposo di *Trachemys sp.*

Il campione è stato immediatamente inserito in una provetta sterile contenente 10 ml di soluzione a base di PBS sterile, penicillina/streptomina (100 U/ml, 100 ug/ml) e amfotericina B (2.5 ug/ml).

Il frammento di tessuto adiposo appena prelevato è stato poi consegnato in laboratorio da un altro operatore e processato entro massimo 24 ore. Nel frattempo, la membrana celomatica è stata delicatamente dissezionata per via smussa con delle forbici Mayo, al fine di permettere l'ingresso e posando attenzione a non lacerare più o meno la vescicola, i polmoni durante la procedura.

Nei maschi, dopo aver identificato il testicolo a livello di polo caudale renale (visibile come struttura ovalare, a superficie liscia e di colore beige (figura 16)), si è proceduto a chiudere i vasi del mesorchio (figura 17) tramite una emoclip prima della sua asportazione.

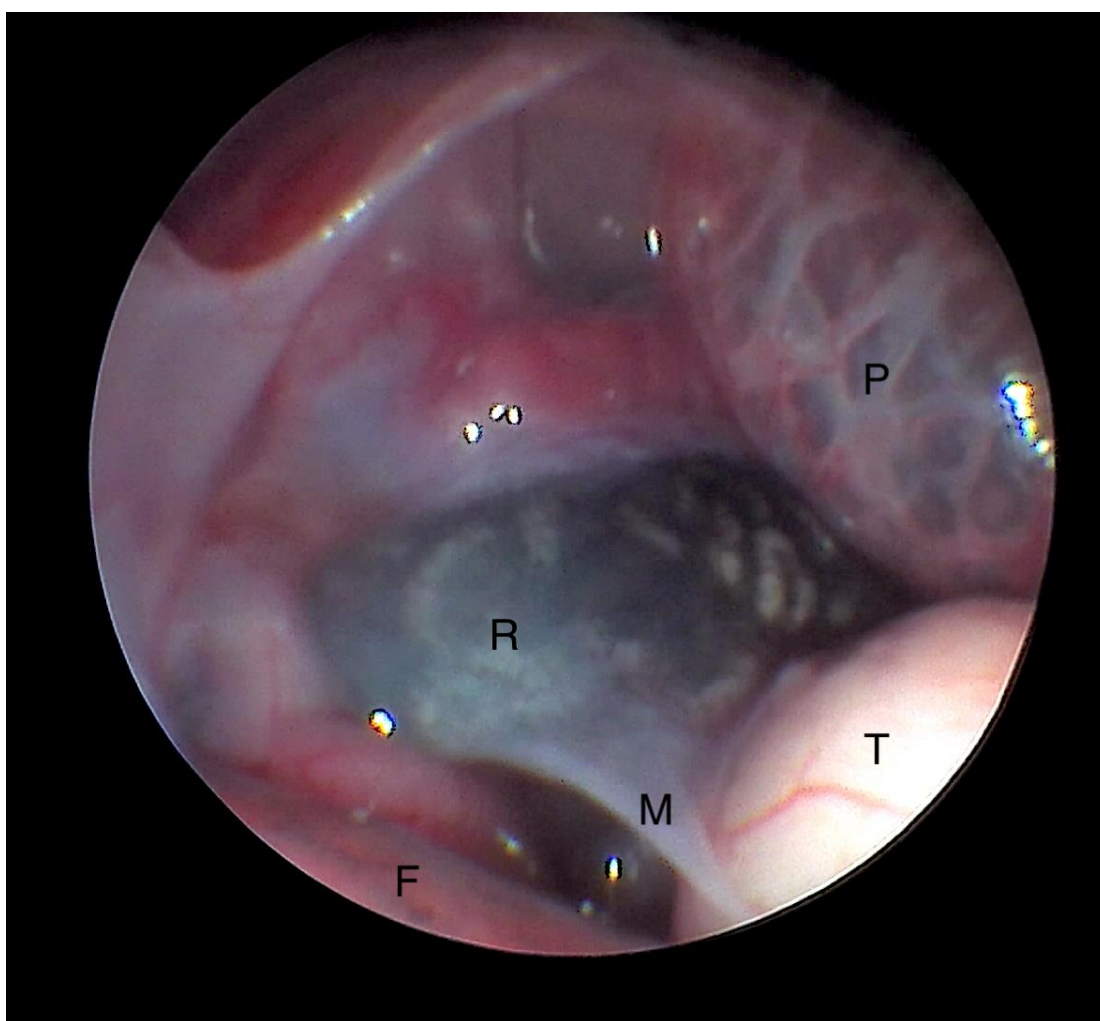


Figura 16: immagine endoscopica che illustra i rapporti tra gli organi celomatici di un esemplare maschio durante la procedura di celioscopia. T: testicolo. M: mesorchio. R: rene. F: fegato. P: polmone.

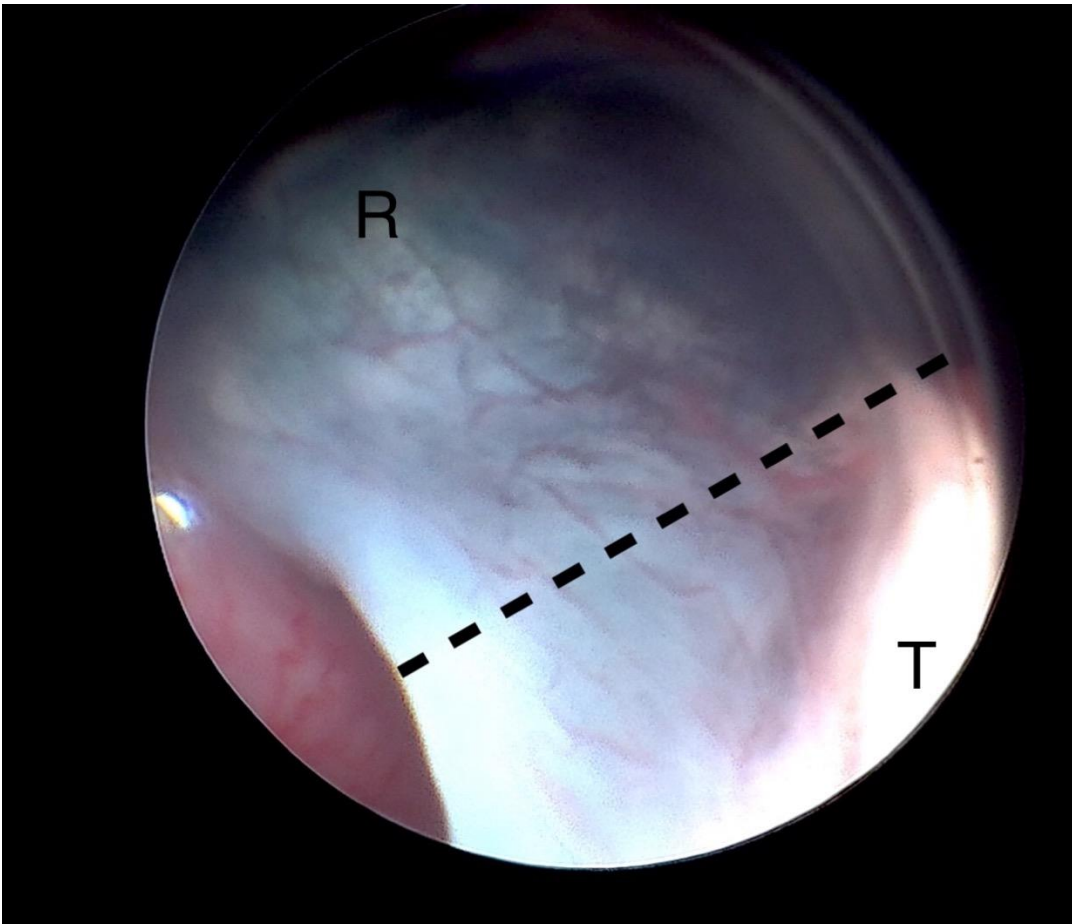


Figura 17: Il mesorchio è stato dissezionato esattamente a metà tra il margine cranio-ventrale del rene (R) ed il margine dorsale del testicolo (T), (Linea tratteggiata). E' possibile

In alcuni casi, è stato possibile eseguire una orchietomia bilaterale tramite il medesimo accesso e senza cambiare decubito.

In caso di un individuo di sesso femminile, identificati (figura 18) ed esteriorizzati tramite il peduncolo lizzoso ovarico, del mesovario e del mesosalpinge sono stati cauterizzati e recisi con dispositivo di elettrocoagulazione (Enseal®). L'ovidutto è porzione terminale, a circa 3 cm dal suo sbocco cloaca utilizzando un monofilamento assorbibile 2/0 e successivamente asportato.

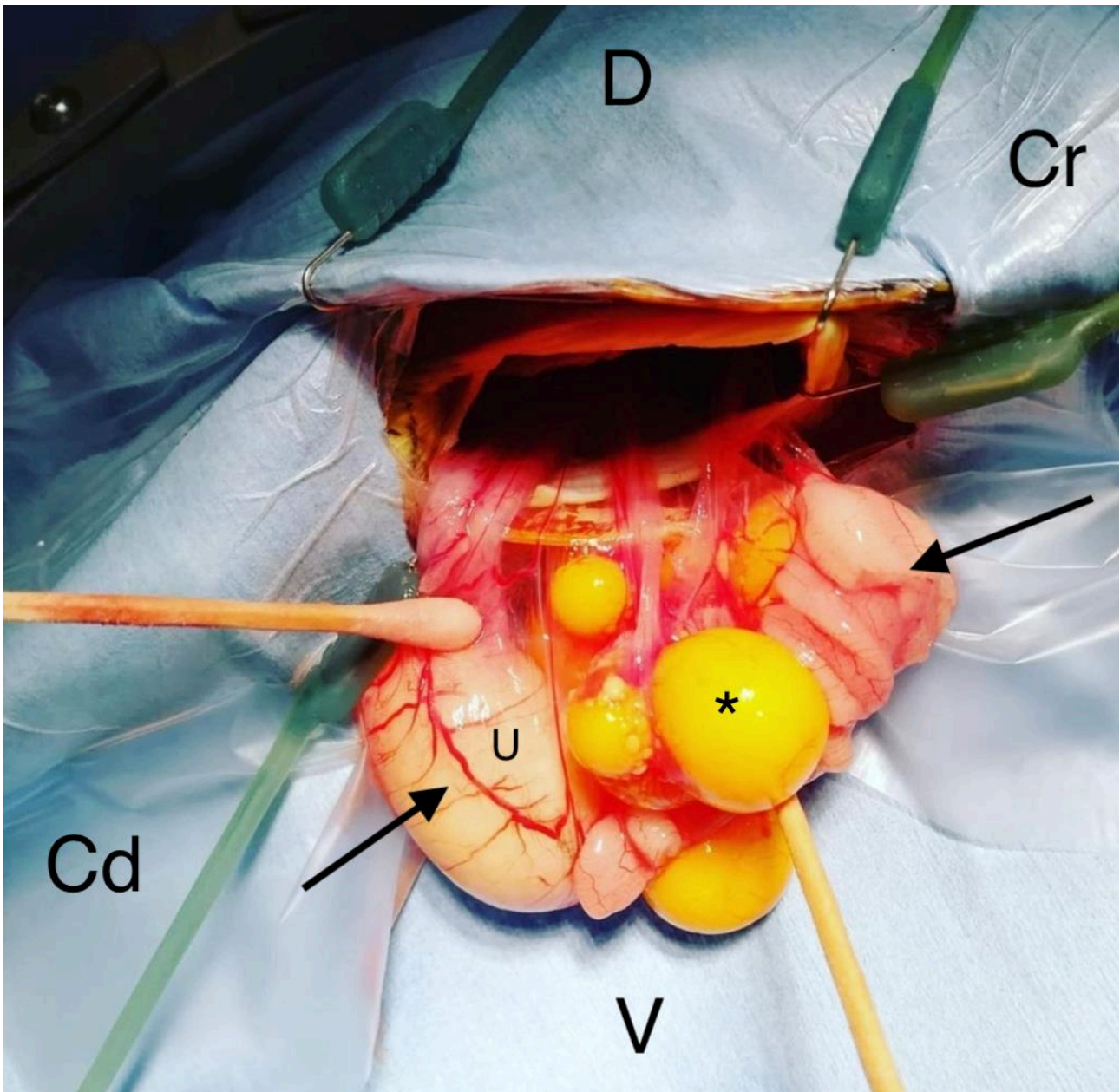


Figura 18: porzione dell'apparato riproduttore in un soggetto di sesso femminile, dopo essere stato estroflesso dalla fossa prefemorale prima della sua dissezione. Le frecce indicano l'ovidutto. L'asterisco indica un follicolo preovulatorio ovarico. Un uovo dal guscio ben calcificato (U) era presente all'interno del tratto dorsale. V: ventrale.

Prima della chiusura del celoma, è stata verificata l'assenza di tramite morra
 esplorazione del celoma ventrale con video endoscopio. La membrana celomatica non è
 mai stata suturata, mentre i piani muscolari sono stati suturati tramite utilizzo di
 monofilamento assorbibile (di diametro compreso tra 3/0 e 2/0 in relazione alle dimensioni
 del paziente) tramite sutura continua introflettente.

La cute è stata poi suturata tramite una sutura continua estroflettente.

GESTIONE POST-OPERATORIA DEI SOGGETTI

Nel post-operatorio è stato garantito ai pazienti un ricovero tranquillo, riscaldato alla temperatura ottimale per la specie (28 °C), lontano da rumori molesti, in box singoli. Il personale medico ha monitorato attentamente i pazienti fino al completo risveglio.

Gli animali sono poi stati ricoverati in una sottoposti a due bagnetti giornalieri di 15 minuti, ciascuno in 2-3 cm di acqua tiepida, durante i quali soggetti erano liberi di idratarsi, urinare e defecare.

La valutazione del dolore post-operatorio è stata effettuata monitorando e la ripresa di un comportamento considerato fisiologicamente normale nel preoperatorio. È stato somministrato post-intervento tramadolo a 10mg/kg, singola somministrazione (Baker et al. 2011).

VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEL CAMPIONE DI TESSUTO ADIPOSO

Per verificare l'effettiva natura del tessuto campione di circa (0.5cm x 1cm) è stato fissato in formalina e processato per essere analizzato istologicamente. Alla colorazione con Ematossilina-Eosina (EE), sono stati osservati numerosi gruppi di adipociti maturi associati alla presenza di tessuto fibroso, vasi sanguigni, linfatici e cromatofori a disposizione perivascolare (figura 19).

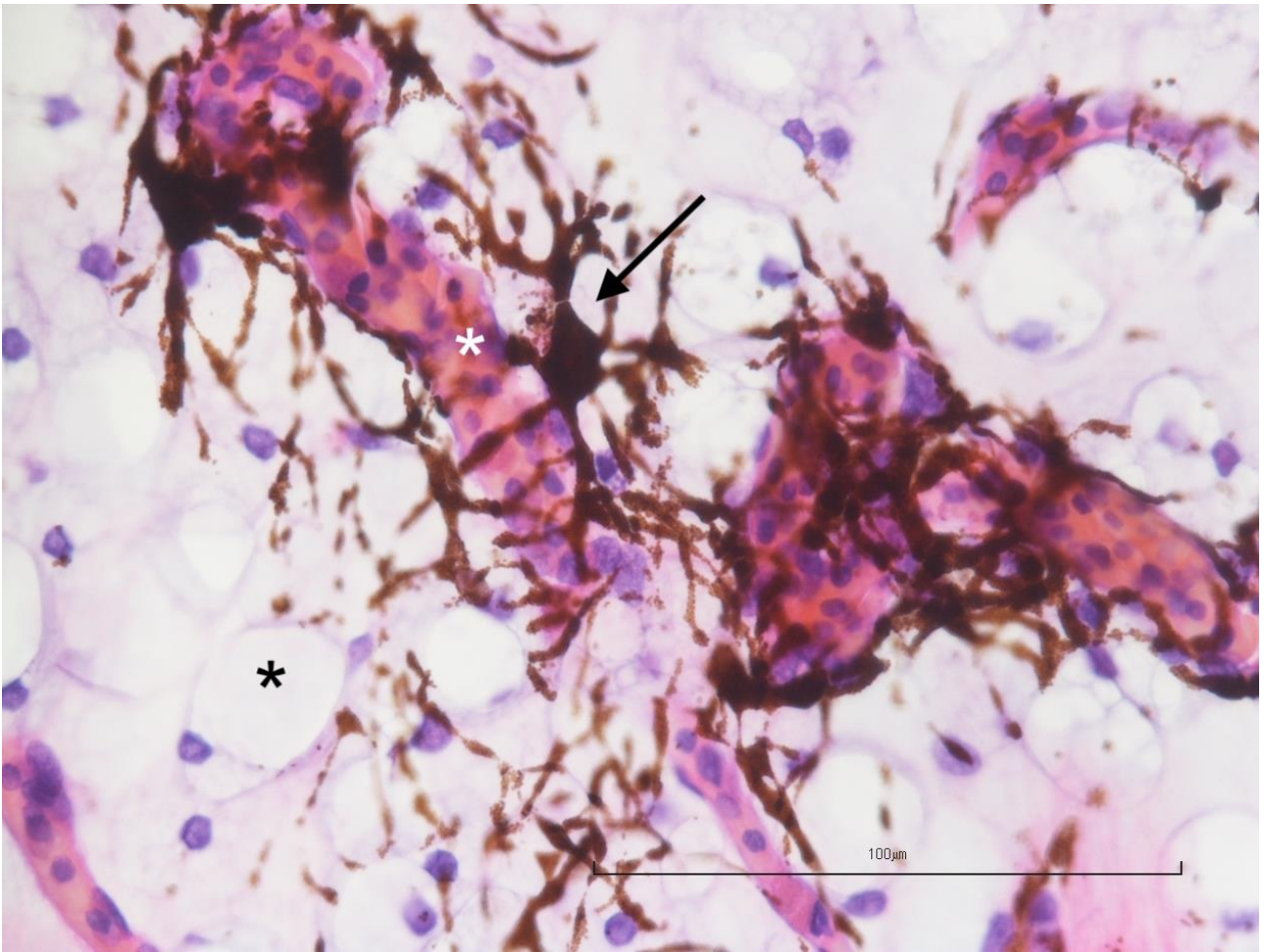


Figura 19. Sezione di tessuto adiposo colorata in ematossilina-eosina (EE). Sono evidenti numerosi adipociti maturi (asterisco nero) cromatofori (freccia nera) a disposizione per: 100 m.

PREPARAZIONE DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO

Attrezzatura e strumenti utilizzati

- Cappa a flusso laminare
- Incubatore apposito per colture cellulari
- Bagno termostato a 37°C
- Petri sterili da 3 e 6 cm di diametro
- Lama da bisturi n 19
- Provette da centrifuga a fondo conico sterili da 15 e 50 ml

- Fiasche per coltura in monostrato da 25, 75, 180 cm²
- Camera di Burker
- Cryovials
- Contenitore per vials congelamento
- Frigorifero a -80 °C
- Bidone azoto liquido

Reagenti per colture cellulari (GIBCO)

- DMEM glutamax High Glucose
- FBS (fetal bovine serum)
- Penicillina/streptomicina (10000 U/ml, 10000 ug/ml) soluzione 100x
- Amfotericina B 250 ug/ml soluzione 100x
- Tripsina-EDTA 0.5% soluzione 10x
- Collagenasi I
- DMSO (Dimetilsulfossido) per colture cellulari
- Histopaque-1077

Soluzioni di lavoro

- Etanolo 70%
- PBS sterile (soluzione salina acquosa contenente NaCl, KCl, Na₃PO₄ sterile, pH 7.4)
- DMEM High Glucose: medium comunemente utilizzato per supportare la crescita di culture cellulari
- DMEM collagenasi I: DMEM H.G., penicillina/streptomicina (100 U/ml, 100ug/ml), amfotericina B (2.5 ug/ml), 0.1% collagenasi.
- DMEM di mantenimento (medium di coltura): DMEM H.G. con 10% FBS, soluzione penicillina/streptomicina (100U/ml, 100ug/ml), amfotericina B (2.5 ug/ml)
- Soluzione Tripsina in PBS (0.05%)
- Soluzione di congelamento: DMEM H.G. 50% FBS, penicillina/streptomicina (100U/ml, 100 ug/ml), amfotericina B (2.5 ug/ml), 10% DMSO

PROCESSAZIONE DEL TESSUTO ADIPOSO

Il campione di tessuto adiposo è stato processato utilizzando due metodiche differenti.

Digestione enzimatica

Come primo step al fine di isolare le MSC dal campione di tessuto adiposo prelevato dalle *Trachemys scripta*, è stata effettuata una digestione enzimatica, attraverso una tecnica simile a quella utilizzata per l'isolamento di

Passaggi chiave del processo:

1. Il campione di tessuto adiposo è stato immerso per alcuni secondi in una piastra di Petri da 6 cm di diametro contenente etanolo al 70% al fine di "lavarlo" rimuovendone eventuali contaminazioni batteriche. Dopodiché è stato immediatamente trasferito in una seconda Petri del medesimo diametro contenente PBS al fine di rimuovere completamente l'alcool residuo.
2. Pesatura del campione: solamente i campioni aventi peso superiore a 0.2 grammi sono stati sottoposti a digestione enzimatica.
3. Il tessuto è stato meccanicamente sminuzzato in frammenti di circa 1 mm di diametro utilizzando una lama da bisturi n 19. I frammenti sono stati poi inseriti in una falcon da 15 ml, contenente 5 ml di DMEM arricchito con collagenasi I, preriscaldato a 37°C. Il tutto è stato agitato e tenuto a 37°C per un periodo di tempo di 1 ora.
4. Una volta terminata la digestione enzimatica, sono stati aggiunti 5 ml di DMEM di mantenimento alla provetta contenente i frammenti di tessuto. Successivamente, la provetta è stata centrifugata a 400xg per 10 minuti.
5. Dopo aver eliminato il surnatante, è stato raccolto il pellet cellulare accumulatosi sul fondo della falcon e risospeso in 1 ml di DMEM di mantenimento.
6. La sospensione cellulare è stata poi suddivisa in due aliquote da 0.5 ml ciascuna. Ogni aliquota è stata seminata in una Petri con un diametro di 3.5 cm contenente 2

ml di DMEM di mantenimento. Le colture cellulari sono state quindi poste in un incubatore apposito con atmosfera controllata al 5% di anidride carbonica (CO₂) e ad una temperatura di 28°C.

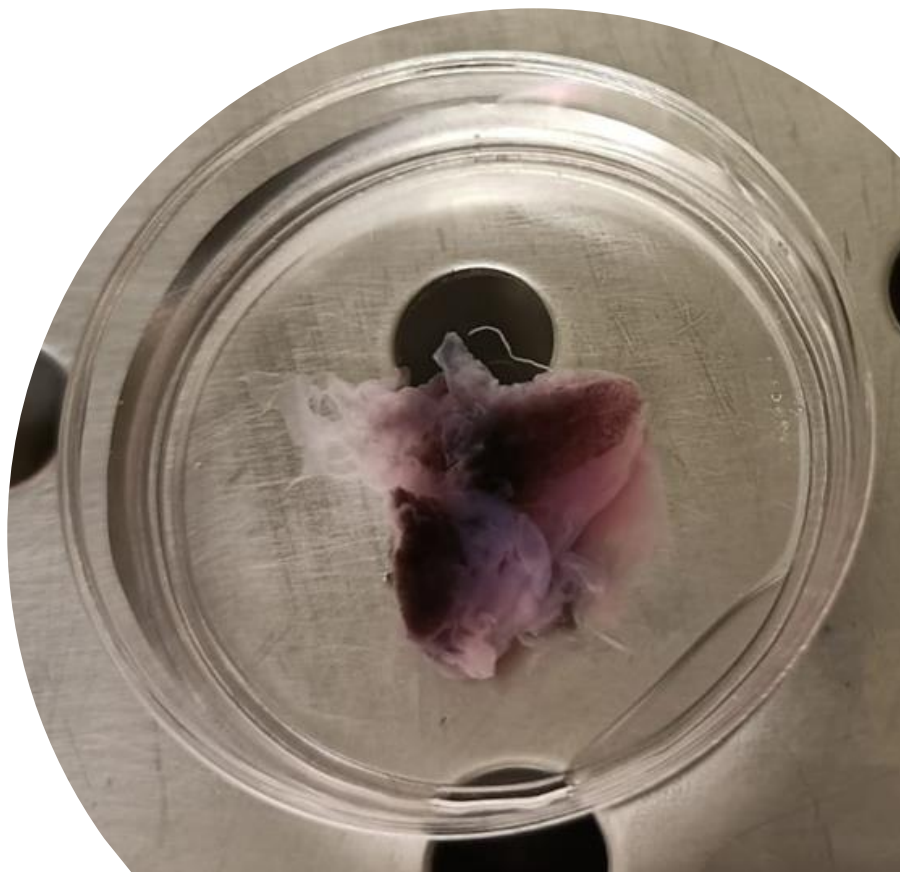


Figura 19: frammento di tessuto adiposo non sottoposto a "la

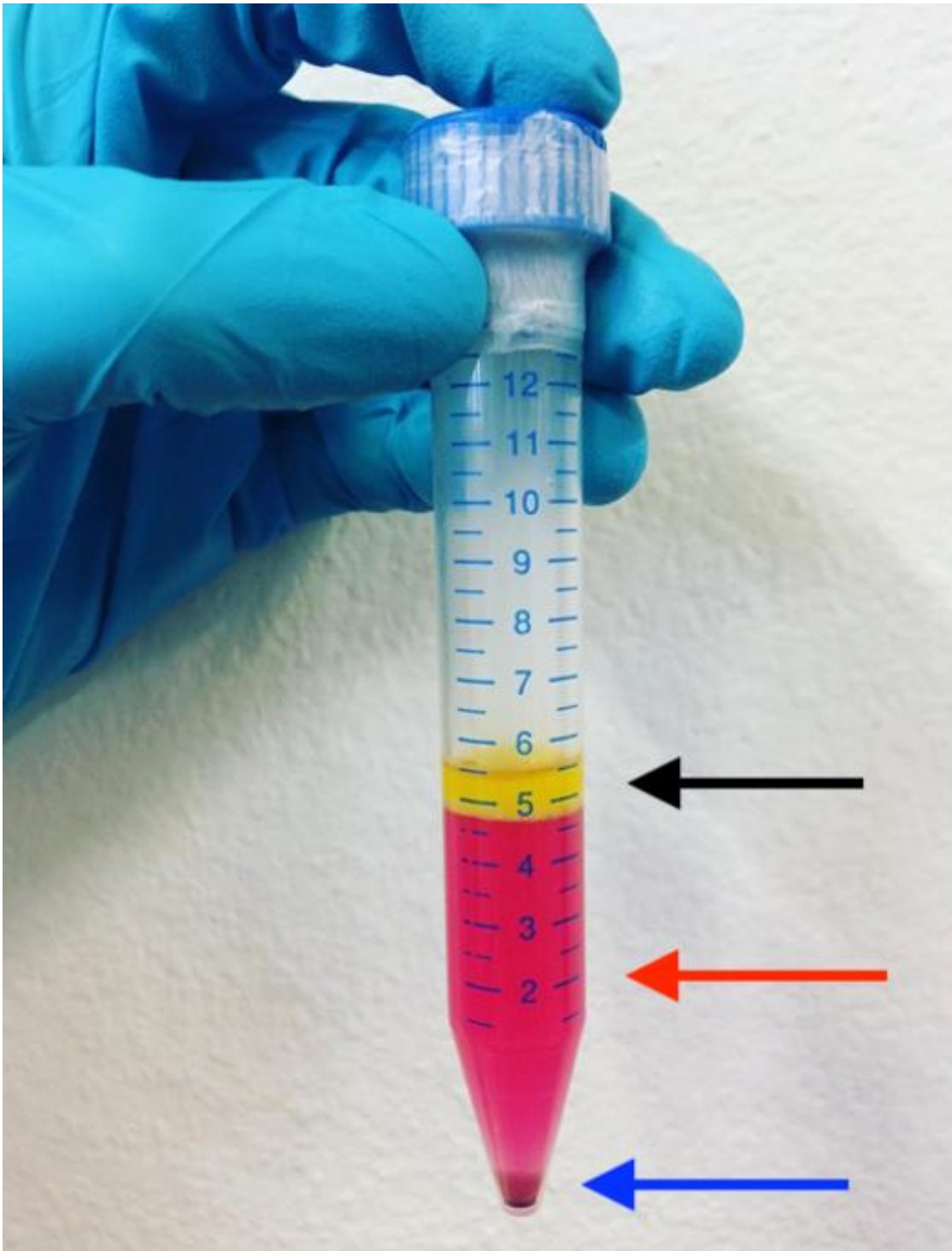


Figura 20: aspetto del campione dopo essere stato incubato con DMEM collagenasi di tipo I a 37°C per 60 min e centrifugato a 400xg per 10 minuti. Freccia nera: surnatante costituito da grasso e rare cellule stromali. Freccia rossa: DMEM e collagenasi I. Freccia blu: pellet cellulare.

Questi passaggi hanno permesso di isolare e coltivare con successo le MSC a partire dal tessuto adiposo.

Isolamento di MSC da frammenti di tessuto adiposo

Questa tecnica si basa sulla frammentazione meccanica del tessuto adiposo, senza l'uso di enzimi digestivi. I frammenti ottenuti vengono poi coltivati in modo tale da permettere la sopravvivenza e la replicazione delle cellule, che migrano dai frammenti stessi ed aderiscono alla superficie della piastra di Petri.

In questa procedura è essenziale che i frammenti di tessuto adiposo aderiscano alla Petri stabilmente, per permettere la migrazione delle cellule al di fuori di essi. Per ottenere ciò, è stato ottenuto un gel costituito da plasma attivato (costituito da 100 μ l di plasma, 80 μ l di DMEM di mantenimento e 20 μ l di calcio gluconato (1000 mg/10 ml)). Il plasma attivato è stato ottenuto attraverso la centrifugazione di 0.5 ml di sangue intero di *Trachemys scripta*, prelevato e stoccato in provette contenenti sodio citrato come anticoagulante.

Per questa procedura, al fine di ottenere un gel che favorisca l'adesione dei frammenti alla superficie della piastra di Petri, è stata utilizzata una piccola quantità di sangue prelevato in sodio citrato (0.5 ml) e centrifugato a 250 xg per 15 min (Di Ianni et al., 2015).

Successivamente, il campione di tessuto adiposo è stato preparato come descritto per la digestione enzimatica.

Il gel costituito da plasma attivato è stato distribuito in modo da coprire ciascun frammento di tessuto con una piccola goccia di plasma. Il processo di gelificazione del plasma è avvenuto in circa 1 minuto. Dopodiché sono stati versati 2.5 ml di DMEM di mantenimento sulla piastra di Petri, coprendo ogni singolo frammento di tessuto. La piastra è stata quindi incubata come descritto per i campioni ottenuti tramite digestione.

CRESCITA DELLE COLONIE CELLULARI

Le cellule sono state incubate ad una temperatura di 28°C in un ambiente controllato, avente una concentrazione di anidride carbonica (CO₂) al 5% ed una umidità del 85-95%. A 48 ore dalla semina iniziale della sospensione cellulare è stato effettuato il primo cambio del mezzo di coltura. Il DMEM di mantenimento è stato quindi sostituito regolarmente ogni 48 ore con una nuova soluzione DMEM preriscaldata a 28°C.

Giornalmente, la piastra è stata osservata al microscopio al fine di escludere la presenza di eventuali contaminanti biologici come muffe o batteri che potrebbero aver compromesso la purezza delle colonie. In media, dopo circa 5 giorni dal trattamento del campione, è stato possibile osservare al microscopio le prime cellule a morfologia fusata adese al fondo della piastra di coltura.

Una volta raggiunto il 90% di confluenza, tali cellule sono state tripsinizzate, contate e quindi riseminate fino a raggiungere il passaggio 8 (P8).

TRIPSINIZZAZIONE E CONTA DELLE COLONIE

Per effettuare la tripsinizzazione, è stato rimosso il DMEM di mantenimento presente nella piastra di coltura e successivamente, si è proceduto a lavare con 3 ml di PBS sterile a 28°C il monostrato cellulare adeso al fondo della piastra. Sono stati successivamente aggiunti 0.3 ml di tripsina-EDTA allo 0.05% alla temperatura di 37°C sulla superficie del monostrato.

La piastra contenente la soluzione di tripsina è stata quindi posta in incubazione a 37°C per un periodo di tempo di 5 minuti. Al distacco delle cellule dalla superficie di coltura (confermato tramite osservazione al microscopio) si è provveduto a trasferire la soluzione contenente le cellule in una provetta sterile contenente 5 ml di DMEM di mantenimento preriscaldata a 28°C ed a centrifugarla a 190xg per 10 minuti.

Dopo la centrifugazione, il surnatante è stato rimosso e il pellet cellulare, raccolto sul fondo della provetta, è stato risospeso nuovamente in 1 millilitro di DMEM di mantenimento a riscaldato a 28°C.

Ad ogni passaggio, è stata effettuata una conta cellulare utilizzando una camera di Burker (figura 21). A tal proposito, sono stati prelevati 10µl della sospensione cellulare centrifugata e posizionati in uno dei due quadranti della camera di Burker, coprendo ciascuna camera di conta con un vetrino copri-oggetto.

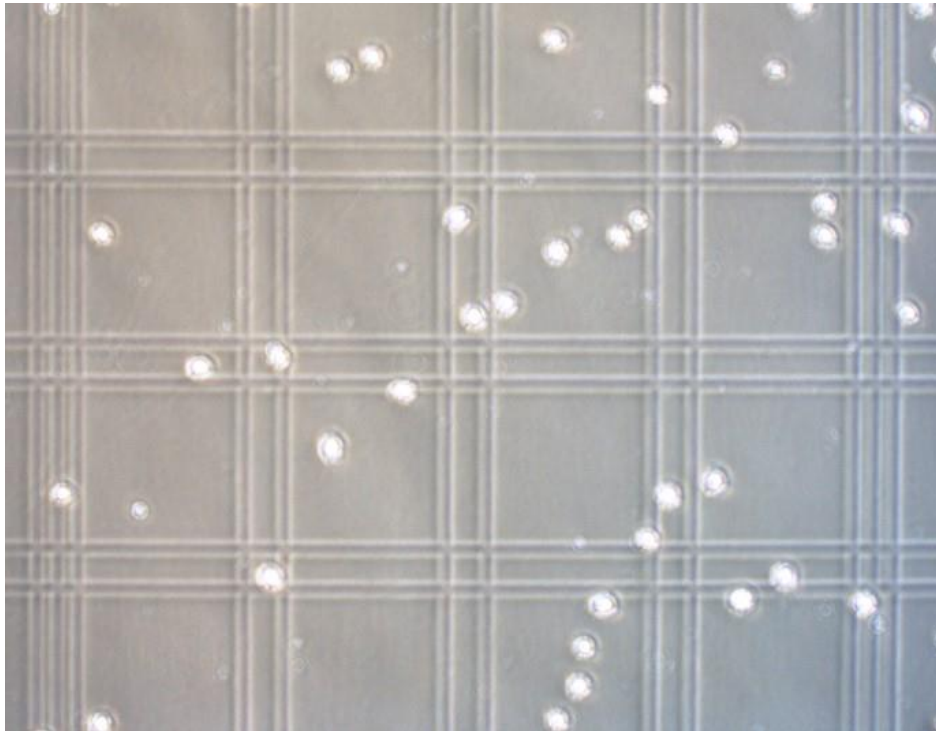


Figura 21: aspetto della camera di Burkert durante la conta cellulare.

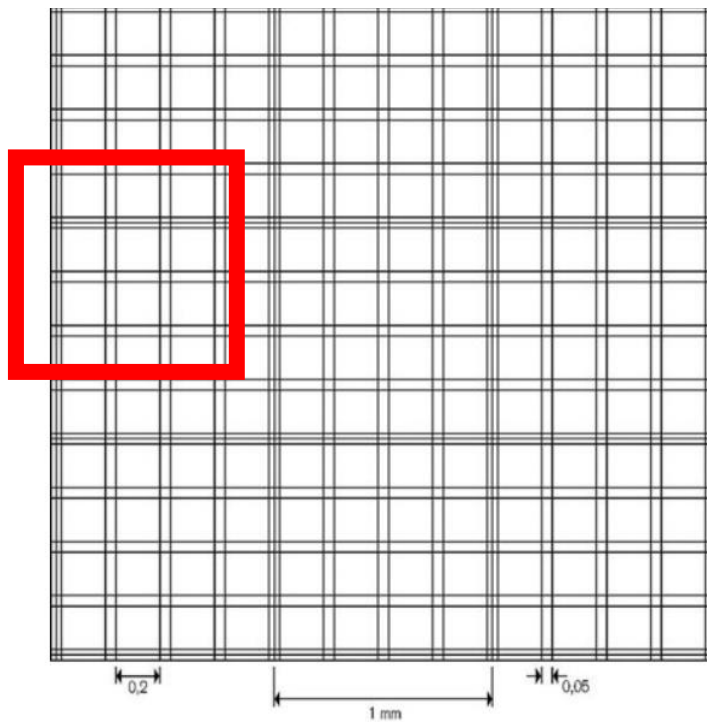


Figura 22: schema di conta utilizzato in camera di Burkert. Le cellule contenute all'interno del quadrato contate. Sono state incluse le lati del quadrato, scelti casualmente.

La conta è stata effettuata al microscopio nel seguente modo:

Sono state contate tutte le cellule contenute in 4 quadrati aventi lato 1mm (figura 22) scelti casualmente. Le cellule a contatto con due lati (scelti casualmente) del quadrato, sono state incluse nella conta.

È stata poi calcolata una media del numero di cellule contato nei 4 quadrati.

Il numero di cellule in sospensione per 1 ml di DMEM è stato calcolato con la seguente formula (dove X indica la media delle cellule contate precedentemente calcolata)

$$= X \times 1000$$

X indica il numero totale di cellule risospese.

Una quota di 8000 cellule /cm² è stata successivamente seminata in 2 fiaschette per colture cellulari da 25 cm² contenenti 5 ml di DMEM di mantenimento preriscaldato a 28°C.

Il volume di sospensione cellulare da riseminare è stato calcolato con la seguente formula:

$$:1 = 20000.0$$

In questo caso, X indica il numero totale di cellule risospese, Y il volume di sospensione da piastrare al fine di avere 8000 cellule /cm² in una fiaschetta da 25 cm².

Le cellule in eccesso sono state poi congelate e le fiaschette sono state riposte nuovamente in incubatore a 28 °C.

La procedura è stata ripetuta ogni qualvolta è stato raggiunto il 90% di confluenza delle cellule nella fiaschetta.

CONGELAMENTO DEI CAMPIONI

Dopo aver effettuato la tripsinizzazione, l'avanzato delle cellule immediatamente non ai fini dello studio è stato congelato con la seguente tecnica:

- Centrifugazione della sospensione cellulare a 190xg per 10 minuti.
- Rimozione del surnatante.
- Risospensione del pellet in 1 ml di soluzione di congelamento (composta da DMEM ad alto contenuto di glucosio, 50% di siero fetale bovino (FBS), penicillina/streptomycin (100 unità/ml, 100 microgrammi/ml), amfotericina B (2.5 microgrammi/ml) e il 10% di dimetilsolfossido (DMSO).
- Trasferimento della sospensione in cryovials e successivamente collocata nell'apposito sistema di congelamento "Mr. Frosty" a -80°C.
- Trasferimento delle cryovials in azoto liquido dopo 24 ore.

NB: I campioni cellulari utilizzati al fine di valutare l'espressione sono stati congelati tal quale (dopo aver rimosso il medium), in quanto la lisi cellulare causata dallo scongelamento ne ha agevolato la processazione.

PREPARAZIONE DEL PLASMA ARRICCHITO DI TROMBOCITI E LEUCOCITI

Al fine di ottenere il plasma arricchito di trombociti e leucociti, passaggio fondamentale per la valutazione dell'espressione genica cellulare prelevato precedentemente dai soggetti e processato entro un'ora, secondo il protocollo proposto da Di Ianni et al. nel 2015.

Il sangue intero è stato sospeso sopra una soluzione di Histopaque 1.077 preriscaldata a 28°C, evitando la miscelazione tra i due fluidi. Il rapporto tra il volume di sangue e il volume di Histopaque utilizzato è stato di 1:1. Dopodiché il campione è stato centrifugato a 150xg per 20 minuti.

Al termine della centrifugazione, la frazione cellulare è stata identificata visivamente e come un anello bianco all'interfaccia con la soluzione di Histopaque e raccolta facendo attenzione a non contaminarla con le frazioni sottostanti. Le cellule sono poi state lavate PBS sterile e

risospese in 5 ml di nuovo PBS. Sono state poi centrifugate nuovamente a 250xg per 10 minuti.

Il pellet ricavato è stato congelato a -20°C prima di essere analizzato come descritto nel paragrafo: "Valutazione dell'espressione genica".

PROVE IN VITRO

Adesione al substrato e crescita in vitro

Sono state analizzate le curve di crescita di 5 campioni di tessuto adiposo appartenenti a 5 soggetti diversi, al fine di valutare le p o t e
La valutazione dei parametri di crescita cellulare è stata effettuata dal passaggio 1 (P1) al passaggio 8 (P8).

Sono state seminate 8000 cellule per centimetro quadrato (8000 cellule/cm²) in due fiaschette da 25 cm² per ciascun passaggio. Una volta raggiunto uno stato di semi-confluenza, ne è stata effettuata la tripsinizzazione e la conta in camera di Burker come p r e c e d e n t e m e n t e d e s c r i t t o . E ' s t a t a p 8000 r i s e
cellule/cm² in maniera analoga, fino al passaggio 8 (P8). Si è deciso di iniziare la conta al passaggio 1 (P1) e non al passaggio 0 (P0) in quanto è fondamentale disporre di un numero preciso di cellule di partenza per valutare la replicazione cellulare.

Questo dato non può essere estrapolato dalle cellule dal tessuto adiposo sottoposto a digestione enzimatica, poiché le cellule ottenute rappresentano una popolazione eterogenea (adipociti, vasi sanguigni, linfatici, fibroblasti, etc).

Per valutare la crescita cellulare, sono stati quindi calcolati i seguenti parametri:

Cell Doubling Number (CDn): $\ln(Nf/Ni)/\ln$

Doubling Time (DT): CT/CDn

Dove CT indica il tempo di coltura cellulare (espresso in giorni), Nf è il numero finale di cellule e Ni è il numero iniziale (<https://www.omnicalculator.com/biology/cell-doubling-time>); (Suelzu et al. 2020).

CONTA DELLE UNITA' FORMANTI COLONIA (CFU)

Al fine di valutare la capacità di adesione ed espansione cellulare, è stata effettuata una conta delle Unità Formanti Colonie (CFU), aspetto cruciale nello studio delle MSC. La formazione di CFU è ritenuta un indicatore delle caratteristiche di staminalità della popolazione cellulare esaminata (Can 2008).

Al fine di valutare e studiare la formazione di CFU, sono state utilizzate delle piastre di Petri a 6 pozzetti, dove in 3 pozzetti sono state seminate 100 cellule, mentre negli altri 3 pozzetti sono state seminate 200 cellule (in entrambi i casi in DMEM). Le piastre sono state poi incubate a 28°C per 14 giorni, dove ogni 72h veniva effettuato il rinnovo del DMEM di mantenimento e un controllo visivo al fine di verificare la crescita delle cellule in coltura.

Dopo 14 giorni, il DMEM di mantenimento è stato rimosso dai pozzetti e le cellule adese sul fondo della piastra sono state fissate in formalina per 24h. Successivamente, i pozzetti sono stati colorati con colorazione May-Grunwald Giemsa in modo da consentire il conteggio delle CFU. Il protocollo di colorazione è stato il seguente:

- Lavaggio dei pozzetti con acqua distillata
- Aggiunta di 2 ml di colorante May-Grunwald Giemsa (0.2 ml di soluzione di Giemsa azur-eosina-blu di metilene per ml di acqua distillata) per 12 minuti.
- Lavaggio con acqua distillata.
- Conteggio delle colonie.

È stato definito una CFU come un raggruppamento di almeno 50 cellule, seguendo il protocollo descritto da Secunda et al. nel 2015 (Secunda et al., 2015).

ANALISI DELLA CAPACITA' DI DIFFERENZIAZIONE DELLE MSC

Attualmente (anno 2023), in mancanza di studi riguardanti la valutazione della capacità di differenziazione delle cellule derivate dal tessuto adiposo nei rettili, sono stati utilizzati protocolli usati routinariamente nei mammiferi (Neupane et al. 2008; Secunda et al. 2015). Le prove di differenziazione cellulare sono state eseguite su due campioni (soggetto identificato come 04-02-22 al passaggio 5 e 08-09-22 al passaggio 2).

È stato valutato il potenziale di differenziazione in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico. Ogni prova di differenziazione è stata condotta in piastre da 6 pozzetti, tramite una semina iniziale di 6000 cellule/cm².

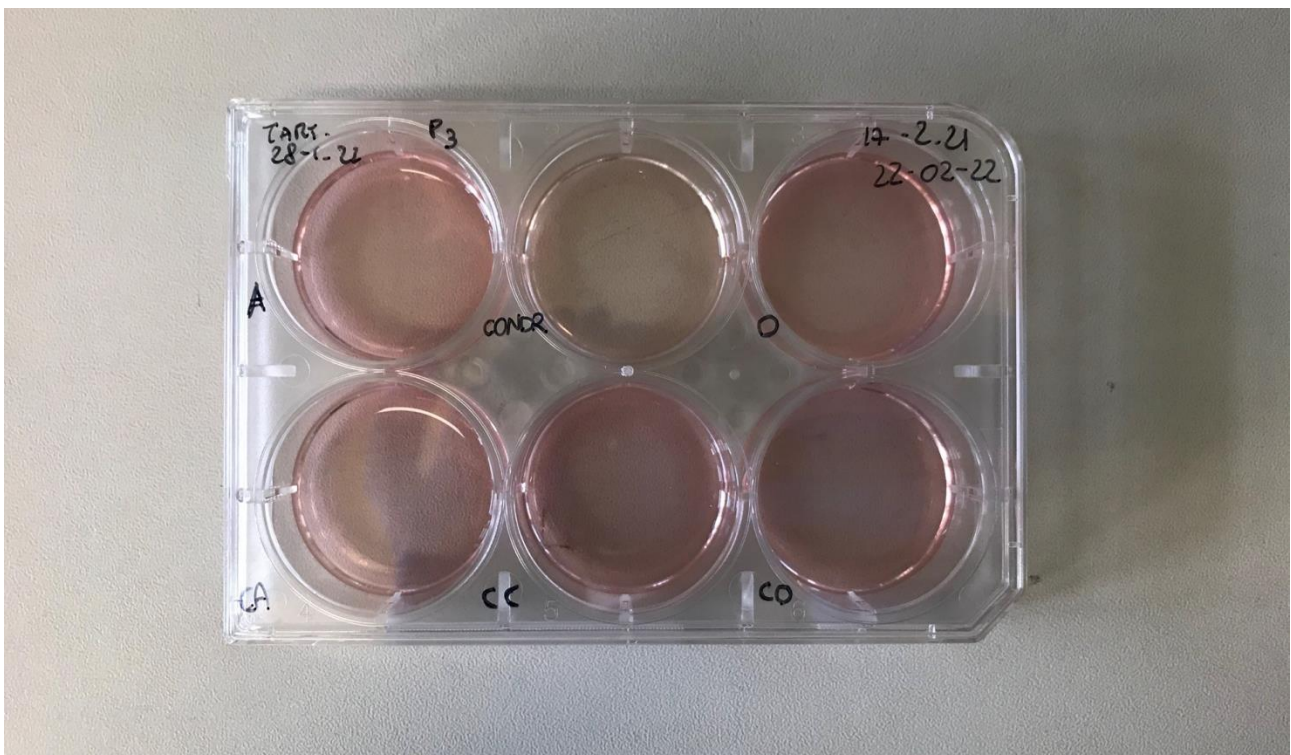


Figura 22: piastra a 6 pozzetti adibiti alla differenziazione cellulare (n=3) in senso adipogenico, condrogenico, osteogenico e relativo controllo (n=3)

Per ciascun pozzetto dedicato alla differenziazione (n=3), è stato allestito il relativo controllo (n=3). Ciascun pozzetto è stato allestito in modo da avere sul fondo un vetrino per poter consentire la colorazione delle cellule al microscopio. Si è deciso di iniziare il trattamento per la differenziazione adipogenica al raggiungimento del 70% di confluenza. Il campo di coltura è stato allestito in DMEM H.G. con 10% di FBS, antibiotici, antifungino e 1uM di Desametasone, 0.2 mM di

Indometacina, 0.5 μ M di IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 1.7 μ M di insulina-10 μ g/ml). Il medium di differenziazione è stato mantenuto per 3 giorni, dopodichè, al quarto giorno, è stato rimpiazzato con un medium di mantenimento DMEM H.G. addizionato con 10% di FBS, antibiotici, antifungino e 1.7 mM di insulina-10 μ g/ml). Tale medium è stato mantenuto per 1 giorno. Questa alternanza tra i due medium è stata portata avanti fino al giorno 24, dove è stata effettuata la fissazione delle cellule con formalina e si è proceduto a colorazione con Oil Red O. Per quanto riguarda la differenziazione in senso condrogenico, è stato utilizzato il kit StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (GIBCO). In questo caso, il medium è stato sostituito ogni 3 giorni, seguendo le istruzioni del produttore. Al termine del processo, le cellule sono state fissate in formalina e colorate con la colorazione Alcian-Blue.

Per quanto riguarda la differenziazione in senso osteogenico invece, è stato aggiunto il medium di differenziazione al raggiungimento di un 80-90% di confluenza da parte delle cellule seminate. È stato utilizzato il composto da DMEM H.G. con 10% di FBS, antibiotici, antifungino e 100 nM di Desametasone, 10 mM di glicerofosfato, 0.250 mM di acido ascorbico, sostituito ogni 48 ore fino al 31° giorno. A fine trattamento, le cellule sono state fissate in metanolo al 95% e colorate con Alizarin-Red.

Prima di essere utilizzati, i medium sono stati preriscaldati a 28°C e le piastre incubate come descritto in precedenza per le altre colture.

EFFETTI DELLA CRIOCONSERVAZIONE DELLE MSC

Per valutare la possibilità di crioconservare le MSC di *Trachemys scripta*, una porzione delle cellule amplificate è stata congelata e conservata in azoto liquido per un periodo variabile, dopodichè è stata valutata la vitalità cellulare. Di seguito, come è stata condotta la procedura:

1. Scongellamento delle cellule: Le cellule congelate sono state scongelate in un bagno termostatico a 28 °C.
2. Risospensione cellulare: Le cellule scongelate sono state risospese in 15 ml di soluzione fisiologica sterile e centrifugate a 190xg per 10 minuti.
3. Risospensione in DMEM di mantenimento: Il pellet cellulare ottenuto dalla centrifugazione è stato risospeso in 1 ml di DMEM di mantenimento.

4. Valutazione della vitalità cellulare: La vitalità delle cellule è stata valutata utilizzando la colorazione con Trypan Blue Solution al 0.4%. A tale scopo, sono stati mescolati 10 µl di Trypan Blue con 10 µl di DMEM contenente le cellule in sospensione. Di questa nuova soluzione, sono stati prelevati 10 µl, e il numero totale di cellule e quello delle cellule vitali sono stati valutati utilizzando una camera di Burker.
5. Identificazione delle cellule vitali e non vitali: Le cellule che presentano una colorazione blu scura o nera sono considerate non vitali. Il conteggio delle cellule vitali e non vitali è stato effettuato seguendo la metodologia precedentemente descritta nel paragrafo "Tripsinizzazione e conta".
6. Calcolo del numero di cellule corretto: poiché è stata eseguita una diluizione (1:1) con il colorante Trypan Blue, è stato necessario applicare un fattore di correzione pari a 0.5 al momento del calcolo del numero totale delle cellule.
7. Coltura delle cellule: Le cellule una volta contate sono state coltivate in piastre con DMEM di mantenimento. Il medium è stato sostituito ogni 48 ore, e le cellule sono state ricontate dopo 4 giorni per valutare la loro crescita.

VALUTAZIONE DELLA ESPRESSIONE GENICA

Attualmente, non essendo stati validati metodi per caratterizzare le MSC dei rettili, in particolare nelle *Trachemys sp.*, si è scelto di utilizzare le linee guida pubblicate dalla ISCT (International Society for Cell Therapy), facendo riferimento quindi alla letteratura già pubblicata relativamente alle MSC dei mammiferi e al panel di geni noti nelle MSC di mammifero.

ESTRAZIONE RNA

Per l'estrazione dell'RNA Machery-Nagel NucleoSpin RNA Kit è utilizzato (Grezzella et al. 2018), che ha permesso di estrarre l'RNA da un numero pari a 5×10^6 di cellule coltivate in vitro (figura 23).

L'RNA è stato quindi estratto sia da ~~da~~, che dai ~~dal~~ leucociti e trombociti isolati tramite la procedura precedentemente descritta. Per entrambi i campioni è stata eseguita la procedura indicata dal produttore.















1	Homogenize sample		30 mg
2	Lyse cells		350 μ L RA1 3.5 μ L β -mercaptoethanol Mix
3	Filtrate lysate	 	11,000 x g, 1 min
4	Adjust RNA binding conditions		350 μ L 70% ethanol Mix
5	Bind RNA	 	Load sample 11,000 x g, 30 s
6	Desalt silica membrane	 	350 μ L MDB 11,000 x g, 1 min
7	Digest DNA		95 μ L DNase reaction mixture RT, 15 min
8	Wash and dry silica membrane	  	1 st wash 200 μ L RAW2 2 nd wash 600 μ L RA3 3 rd wash 250 μ L RA3 1 st and 2 nd 11,000 x g, 30 s 3 rd 11,000 x g, 2 min
9	Elute highly pure RNA	 	60 μ L RNase-free H ₂ O 11,000 x g, 1 min

Figura 23: procedura di estrazione RNA con il kit Macherey-Nagel NucleoSpin RNA Kit.

RETRO TRASCRIZIONE

Per quanto riguarda il processo di estrazione, l'RNA totale ottenuto è stato quantificato utilizzando il "GeneQuant-pro RNA/DNA Calculator" della Biochrom. Questo strumento viene utilizzato non solo per fornire la quantità di RNA estratto, (ng), ma esprime inoltre la purezza del campione, calcolata come il rapporto tra le letture a lunghezza d'onda di 260nm e di 280nm. L'intervallo ideale per questo rapporto è stimato essere tra 1.8 e 2.2.

Dopo la quantificazione, sono stati utilizzati 2µg di RNA al fine di eseguire una retrotrascrizione. Per fare ciò, è stato utilizzato il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit della Applied Biosystems™, seguendo il ciclo utilizzato per la retrotrascrizione è indicato nella Tabella 2.

Settings	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature	25°C	37°C	85°C	4°C
Time	10'	120'	5'	Hold

Tabella 2: ciclo di retrotrascrizione

PCR

Primers utilizzati per la PCR:

GENE		CODICE	PESO	Tm
CD44	GCTTCTACAGCCACCAGTTCTA CCACCCATCTTCTTGTGCGGA	XM_034769691.1 Cd44	263	59.77/59.39
CD73	CTTGGGAAATTTGATTTGTGATGCC GTAGACCACATGAATGCCTGC	XM_034766097.1 NT5E transcript variant X2	297	59.88/59.33
CD90	GAACAGCCTCAAGACCCGAT CCTTCCCTTACAGGGACAC	XM_034754732.1 THY1	282	59.75/59.96
CD105	GTGCACAGACGACTCCATTG CACTCGAACGGCACCTCAA	XM_034793487.1 Endoglin	243	59.21/60.30
CD31	TGAGAAACTGCCATCTGGACC CTATTGGCAATGAGGAGGGGG	XM_034789735.1 PECAM1transcript variant X1(comp. X4,5,9,10)	278	60.00/60.20
CD34	GCAGAGTATTGAACGCCACC TCTGAGCCCCTCTGTTGAGA	XM_034770555.1 CD34 transcript variant X1	257	59.27/59.88
CD45	TTACGTGTCCGCTTTACGGG AGGAGACACCCTCACCTGTT	XM_034780075.1 PTPRC	269	60.39/60.10
HLA-DRA	CAGGGCGACTTCTACGACTG CCCCGCGTTTATAAGGGGC	XM_034789225.1 HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain-like	230	60.18/60.90

		(LOC117886999), transcript variant X1		
GAPDH	GAATGGGAAGCTCACTGGAA CCAAACTCATTGTCATACCAGG	XM_034787619.1	285	57.50/57.03

I primers sono stati creati a partire dal sito NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) attraverso un software dedicato (pick primers, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Le sequenze utilizzate sono state ricavate dalla NCBI Reference Sequence code (tabella 4), derivanti dal genoma della *Trachemys scripta*, completamente sequenziato nel 2016 e pubblicato sul sito.

I primer progettati sono stati prodotti da Microgen Europe.

I geni utilizzati per la caratterizzazione fenotipica sono 9: Il gene GAPDH è stato utilizzato come gene *house keeping*, ossia un gene costitutivo espresso da tutte le cellule, per validare i risultati degli esperimenti.

I geni CD 44, CD 73, CD 90, CD 105 sono marker positivi delle MSC.

I geni CD 31, CD 34, CD 45, HLA-DRA sono marker negativi delle MSC. Questi geni sono espressi però espressi dai leucociti dei mammiferi. L'espressione di questo set di geni nei leucociti del sangue è stata valutata al fine di validare i primers utilizzati nella RT-PCR (Sun et al. 2012).

La master mix per la PCR è stata allestita come indicato in tabella 4 (volume totale 50 µl):

Cdna	2 µl
Primer	2.5 µl
DnTPs	1 µl
TAQDNAPolimerasi	0.2 µl
Buffer 5%	10 µl
H ₂ O DEPC	34.5 µl

Tabella 4 master mix utilizzato per la PCR

Il ciclo utilizzato per la PCR è descritto in tabella 5:

Settings	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5	Step 6
Temperature	94°C	94°C	54°C	72°C	Repeat 30 times from 2 to 4	72°C
Time	2 '	4 5 ' '	4 5 ' '	1 '		1 0 '

Tabella 5: ciclo utilizzato per la PCR

PREPARAZIONE GEL AGAROSIO E CORSA ELETTROFORETICA

Prima di aver effettuato il sequenziamento vero e proprio, sono stati verificati i risultati ottenuti dalla PCR (ampliconi attesi) attraverso una elettroforesi. Di seguito, i passaggi della preparazione dei campioni (e relativo gel del

Preparazione del gel

Sono stati utilizzati 70 ml di soluzione TAE (Tampone Tris-Acetato-EDTA) con agarosio al 1.5% p/v. Tale soluzione è stata preriscaldata nel microonde e successivamente sono stati aggiunti 3.5 µl di bromuro di etidio come tracciante del DNA.

Preparazione dei campioni

Per l'analisi elettroforetica, è stata prelevata una aliquota dalla reazione di PCR, mescolando 20µl di campione con 4µl di soluzione di caricamento 6x (Thermoscientific). In ciascun pozzetto del gel sono stati caricati 20µl di questa soluzione, e le dimensioni degli ampliconi sono state determinate utilizzando il DNA ladder da 1000bp a 100bp come marcatori (Thermoscientific).

I campioni sono stati fatti successivamente correre a un'intensità di 25 milliampere per i primi 60 minuti, e successivamente a 50 milliampere fino alla fine della corsa. La lettura è stata eseguita utilizzando un trans-illuminatore con luce ultravioletta.

Sequenziamento

Una volta verificata la positività della l'espre aliquota di 30µl e successivamente inviata al laboratorio MacroGen Europe per il sequenziamento tramite il servizio "Sanger sequencing".

La validazione dei risultati del sequenziamento è stata eseguita confrontando la sequenza ottenuta con le sequenze specifiche utilizzate per la progettazione dei primers. In caso di discrepanze, è stata eseguita una valutazione manuale dei singoli tracciati cromatografici derivati dal sequenziamento.

L'analisi delle differenze statistiche negli esperimenti è stata eseguita mediante ANOVA, utilizzando il software *StatPlusLE* (<https://www.analystsoft.com/it/products/statplus/>). In caso di differenze significative ($p < 0.05$), le medie sono state confrontate utilizzando i test di Scheffè e Bonferroni.

RISULTATI

CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE

A circa 5-7 giorni dalla semina dei frammenti di tessuto adiposo, è stata osservata la presenza di cellule dalla morfologia fusiforme, simile a quella dei fibroblasti (figura 24), adese al fondo della piastra in tutti i campioni esaminati. Tale morfologia è rimasta invariata nell'arco di tempo per entrambe le metodiche utilizzate (frammentazione e digestione enzimatica). Tuttavia, sono state osservate differenze significative per quanto riguarda l'evoluzione delle colture ricavate dalle due diverse metodiche.

Nelle colture derivanti dalla frammentazione del tessuto adiposo, sono state osservate, dopo circa 5-6 giorni, le prime entità cellulari migrate al di fuori del frammento (figura 25,26). Successivamente, esse si sono occupate gradualmente la superficie disponibile. Tali cellule hanno mostrato una particolare tendenza ad aderire al gel di plasma attivato. Come avviene per le cellule di mammifero, anche le cellule di *Trachemys scripta* hanno iniziato a costituire CFU (figura 27), che con il tempo, sono andati a confluenza.

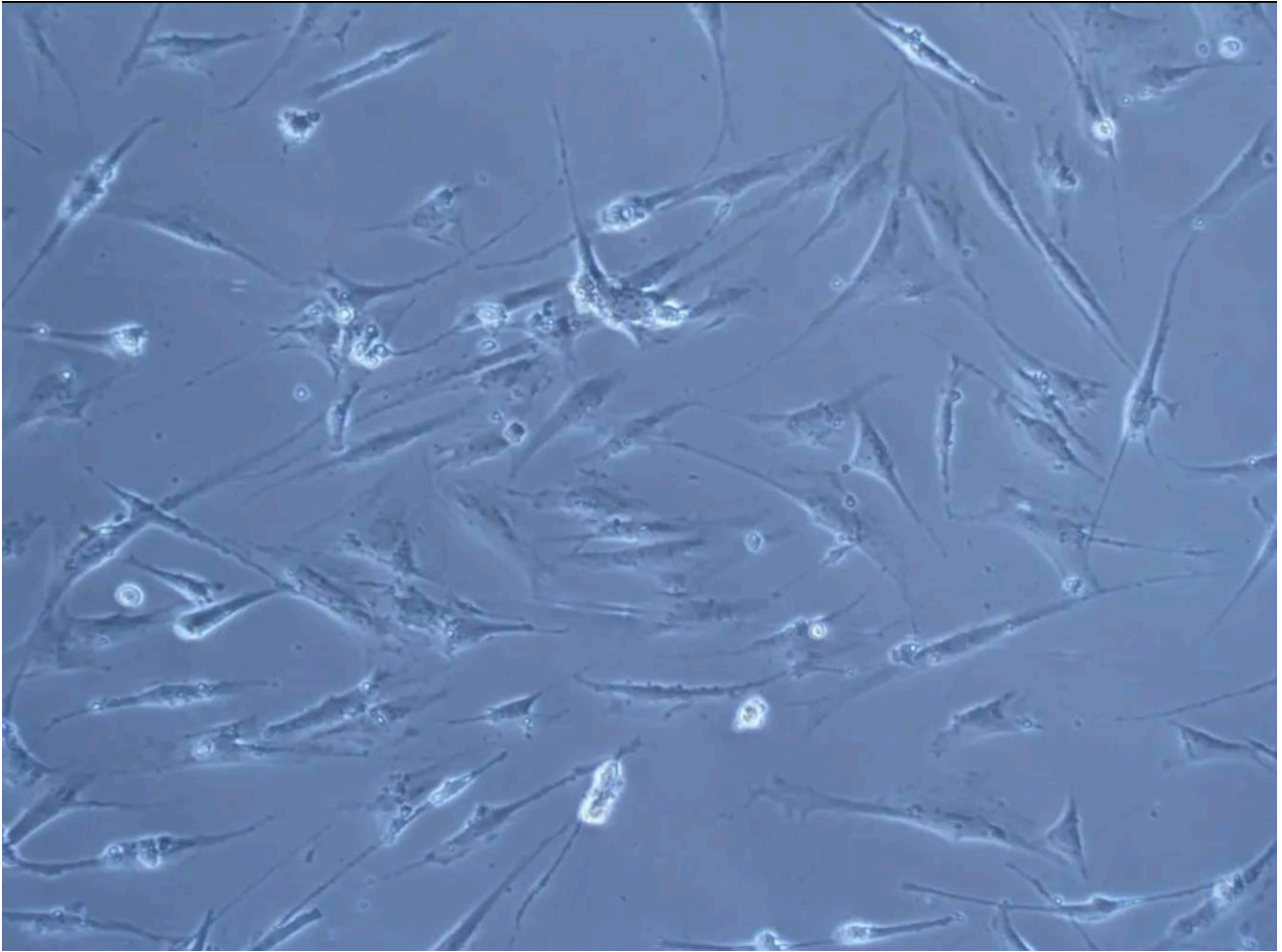


Figura 24: particolare aspetto fusiforme delle cellule isolate da tessuto adiposo adese alla piastra di petri a due settimane dalla semina.

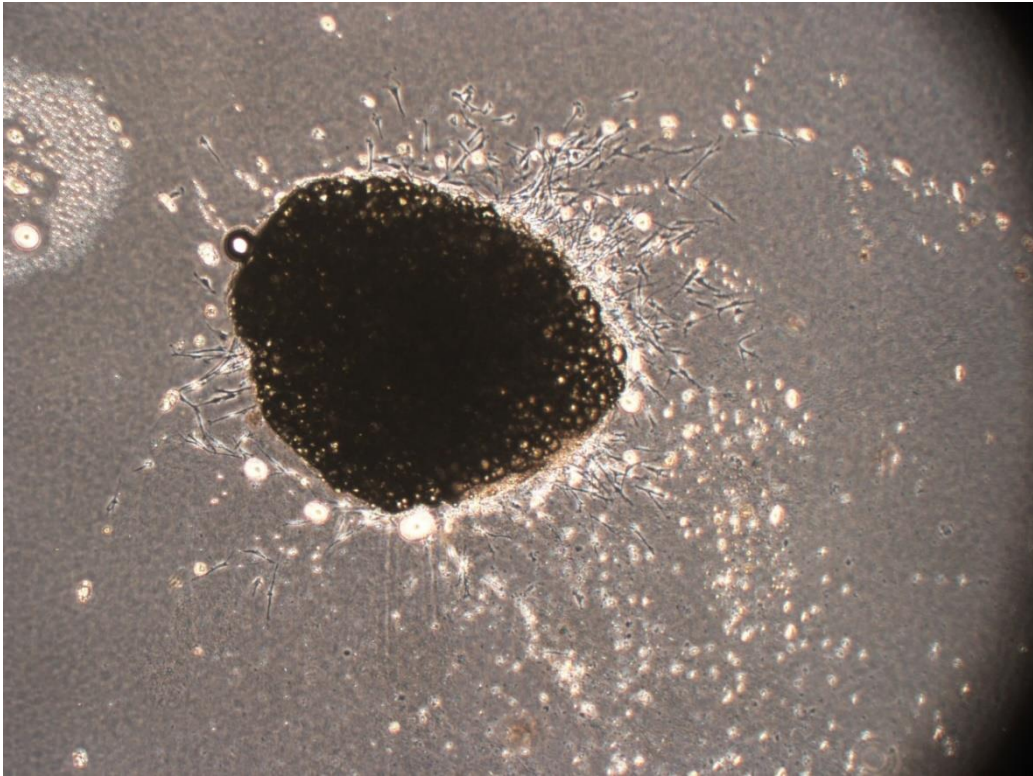


Figura 25: a 6 gg dal trattamento del campione si notano le prima cellule in moltiplicazione a partire dal frammento di tessuto adiposo (a

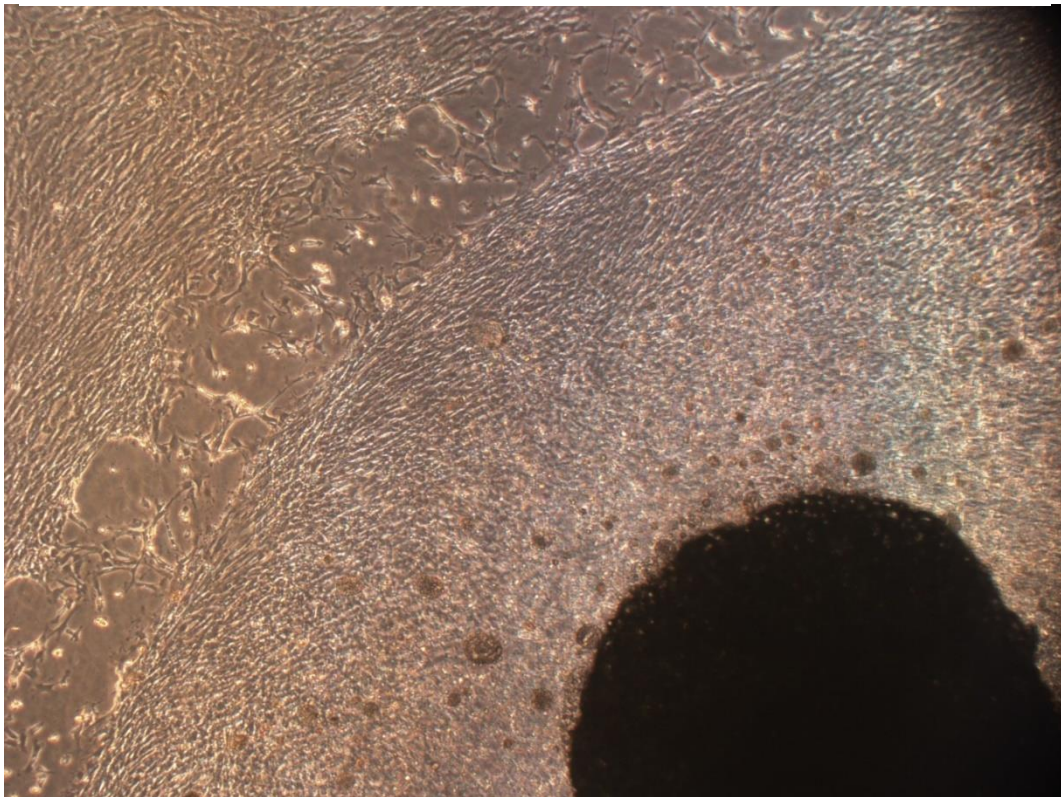


Figura 26: A 18 giorni dal trattamento del campione si notano le cellule che si dispongono fino al margine della goccia di plasma utilizzata per fissare il frammento alla piastra. Ingrandimento 40x

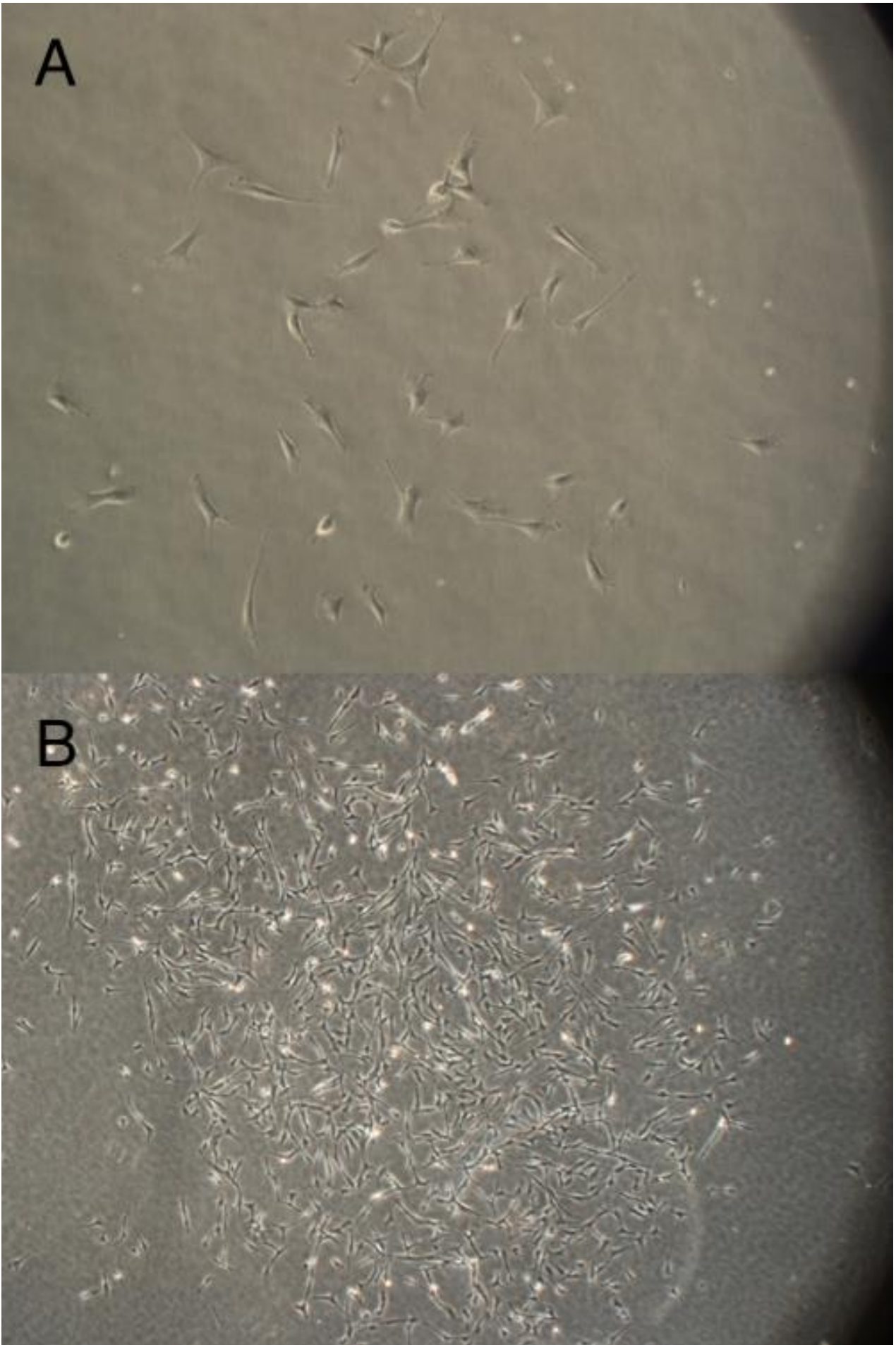


Figura 27 A: cellule ottenute dal campione di tessuto adiposo digerito a 6 giorni dalla semina. 40x. B: le stesse cellule a 15 giorni dalla semina del campione di tessuto adiposo digerito. 40x.

CURVE DI CRESCITA

Dopo aver ottenuto le prime CFU, è stata studiata la cinetica cellulare analizzando le curve di crescita dei 5 campioni nei successivi passaggi (fino a P8). Per ogni passaggio, sono stati calcolati il numero di duplicazioni in 24 ore (CDN/24h), il numero di duplicazioni cellulari (cell doubling number - CDN), la somma totale delle duplicazioni cellulari (CDN tot), e il tempo necessario per ottenere un raddoppiamento della popolazione cellulare (doubling time - DT). Il CDN viene definito come il numero di volte in cui le cellule si sono duplicate in un determinato passaggio, mentre il CDN/24h indica il numero di duplicazioni cellulari che si sono verificate nelle 24 ore. Il CDN totale rappresenta quindi la somma delle repliche cellulari nei vari passaggi. Il DT misura il tempo necessario al fine di ottenere una popolazione cellulare raddoppiata rispetto alla popolazione di partenza.

Le tabelle X-Z riportano i dati ottenuti dall'analisi inclusi nello studio.

Le figure X e Y illustrano i valori medi di CDN/24h e DT ottenuti per i 5 soggetti dal P1 al P8. Sono state evidenziate delle differenze riguardanti sia il CDN/24h che il DT nei diversi campioni, legate probabilmente a variabili come sesso ed età differenti, come verrà discusso nella sezione "discussione".

Tuttavia, queste differenze non sono risultate statisticamente significative ($p < 0.05$) tra i diversi passaggi, suggerendo che almeno fino al P8 non è stato evidenziato un invecchiamento cellulare evidente, almeno per quanto riguarda la capacità di replicazione cellulare (figura 28,29).

CAMPIONE 28-01

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>piastrate</i>		200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000
<i>fiaschette</i>		1	2	2	2	2	2	2
A		425.000	490.000	290.000	473.000	445.000	353.350	333.000
B			453.000	370.000	406.700	486.000	331.500	296.250
<i>media</i>		425.000	471.500	330.000	439.850	465.500	342.425	314.625
<i>tempo (gg)</i>		3	6	4	6	5	3	3
<i>CDn</i>		1,09	1,24	0,72	1,14	1,22	0,78	0,65
<i>CDn/24H</i>		0,36	0,21	0,18	0,19	0,24	0,26	0,22
<i>CDn tot</i>		1,09	2,32	3,05	4,18	5,40	6,18	6,83
<i>DT</i>		2,76	4,85	5,54	5,28	4,10	3,87	4,59

Tabella 6 valori curva di crescita del campione 28-01

CAMPIONE 04-02

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>piastrate</i>	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000
<i>fiaschette</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
A	483.000	446.646	352.500	346.000	302.500	460.000	273.000	481.470
B	416.000	690.000	340.000	430.000	410.000	353.000	292.000	535.000
<i>media</i>	449.500	568.323	346.250	388.000	356.250	406.500	282.500	508.235
<i>tempo (gg)</i>	6	6	4	5	2	3	4	3
<i>CDn</i>	1,17	1,51	0,79	0,96	0,83	1,02	0,50	1,35
<i>CDn/24H</i>	0,19	0,25	0,20	0,19	0,42	0,34	0,12	0,45
<i>CDn tot</i>	1,17	2,68	3,47	4,42	5,26	6,28	6,78	8,12
<i>DT</i>	5,14	3,98	5,05	5,23	2,40	2,93	8,03	2,23

Tabella 7 valori curva di crescita del campione 04-02

CAMPIONE 11-02

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>piastrate</i>		200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000
<i>fiaschette</i>		1	2	2	2	2	2	2
A		315.000	360.000	470.000	553.000	576.700	308.000	503.000
B		385.000	346.000	423.000	946.000	610.000	305.000	566.000
<i>media</i>		350.000	353.000	446.500	749.500	593.350	306.500	534.500
<i>tempo (gg)</i>		3	6	2	5	5	3	4
<i>CDn</i>		0,81	0,82	1,16	1,91	1,57	0,62	1,42
<i>CDn/24H</i>		0,27	0,14	0,58	0,38	0,31	0,21	0,35
<i>CDn tot</i>		0,81	1,63	2,79	4,69	6,26	6,88	8,29
<i>DT</i>		3,72	7,32	1,73	2,62	3,19	4,87	2,82

Tabella 8 valori curva di crescita del campione 11-02

CAMPIONE 13-05

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>piastrate</i>	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000
<i>fiaschette</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>A</i>	275000	465.000	364.000	636.700	368.300	330.000	377.000	503.000
<i>B</i>	293000	390.000	349.000	607.700	370.000	352.500	377.000	566.000
<i>media</i>	284.000	427.500	356.500	622.200	369.150	341.250	377.000	534.500
<i>tempo (gg)</i>	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>CDn</i>	0,51	1,10	0,83	1,64	0,88	0,77	0,91	1,42
<i>CDn/24H</i>	0,10	0,22	0,17	0,33	0,18	0,15	0,18	0,28
<i>CDn tot</i>	0,51	1,60	2,44	4,07	4,96	5,73	6,64	8,06
<i>DT</i>	9,88	4,56	6,00	3,05	5,65	6,49	5,47	3,53

Tabella 9 valori curva di crescita del campione 13-05

CAMPIONE 08-09

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>piastrate</i>	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000
<i>fiaschette</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>A</i>	290.000	526.000	565.000	690.000	560.600	690.000	550.000	576.660
<i>B</i>	291.500	596.000	550.000	650.000	500.000	500.000	500.000	863.330
<i>media</i>	290.750	561.000	557.500	670.000	530.300	595.000	525.000	719.995
<i>tempo (gg)</i>	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>CDn</i>	0,54	1,49	1,48	1,74	1,41	1,57	1,39	1,85
<i>CDn/24H</i>	0,11	0,30	0,30	0,35	0,28	0,31	0,28	0,37
<i>CDn tot</i>	0,54	2,03	3,51	5,25	6,66	8,23	9,62	11,47
<i>DT</i>	9,26	3,36	3,38	2,87	3,55	3,18	3,59	2,71

Tabella 10 valori curva di crescita del campione 08-09

Sono stati successivamente confrontati i valori medi dei CDn/24h e dei DT dei vari passaggi a partire da P2.

	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>CD/24 28-01</i>	0,36	0,21	0,18	0,19	0,24	0,26	0,22
<i>CD/24 04-02</i>	0,25	0,20	0,19	0,42	0,34	0,12	0,45
<i>CD/24 11-02</i>	0,27	0,14	0,58	0,38	0,31	0,21	0,35
<i>CD/24 13-05</i>	0,22	0,17	0,33	0,18	0,15	0,18	0,28
<i>CD/24 08-09</i>	0,30	0,30	0,35	0,28	0,31	0,28	0,37
<i>media</i>	0,28	0,20	0,33	0,29	0,27	0,21	0,33
<i>DEV.ST.</i>	0,05	0,06	0,16	0,11	0,08	0,06	0,09

Tabella 11: valori CDn/24h dei singoli passaggi, la loro media e deviazione standard.

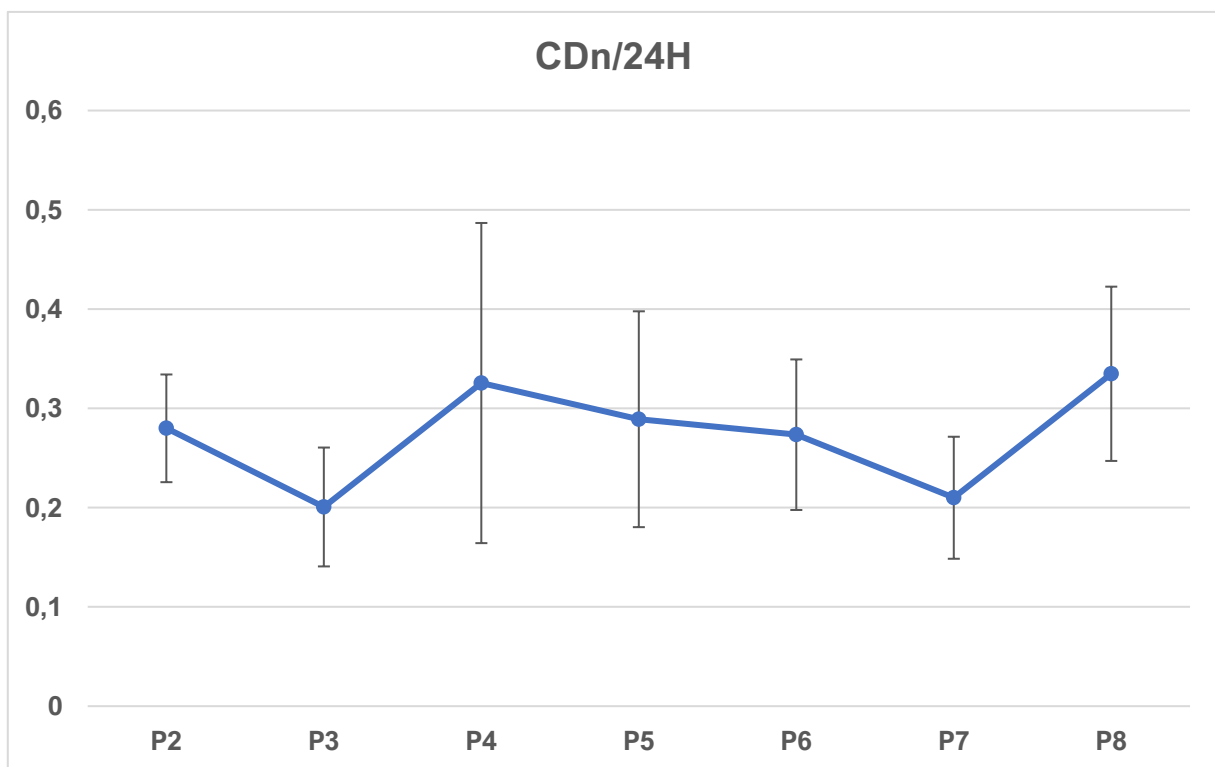


Figura 28: CDn/24h medi +/- deviazione standard.

	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>DT 28-01</i>	2,76	4,85	5,54	5,28	4,10	3,87	4,59
<i>DT 04-02</i>	3,98	5,05	5,23	2,40	2,93	8,03	2,23
<i>DT 11-02</i>	3,72	7,32	1,73	2,62	3,19	4,87	2,82
<i>DT 13-05</i>	4,56	6,00	3,05	5,65	6,49	5,47	3,53
<i>DT 08-09</i>	3,36	3,38	2,87	3,55	3,18	3,59	2,71
<i>media</i>	3,68	5,32	3,68	3,90	3,98	5,16	3,17
<i>DEV.ST.</i>	0,67	1,46	1,64	1,50	1,47	1,77	0,92

Tabella 12: valori DT dei singoli passaggi, la loro media e deviazione standard

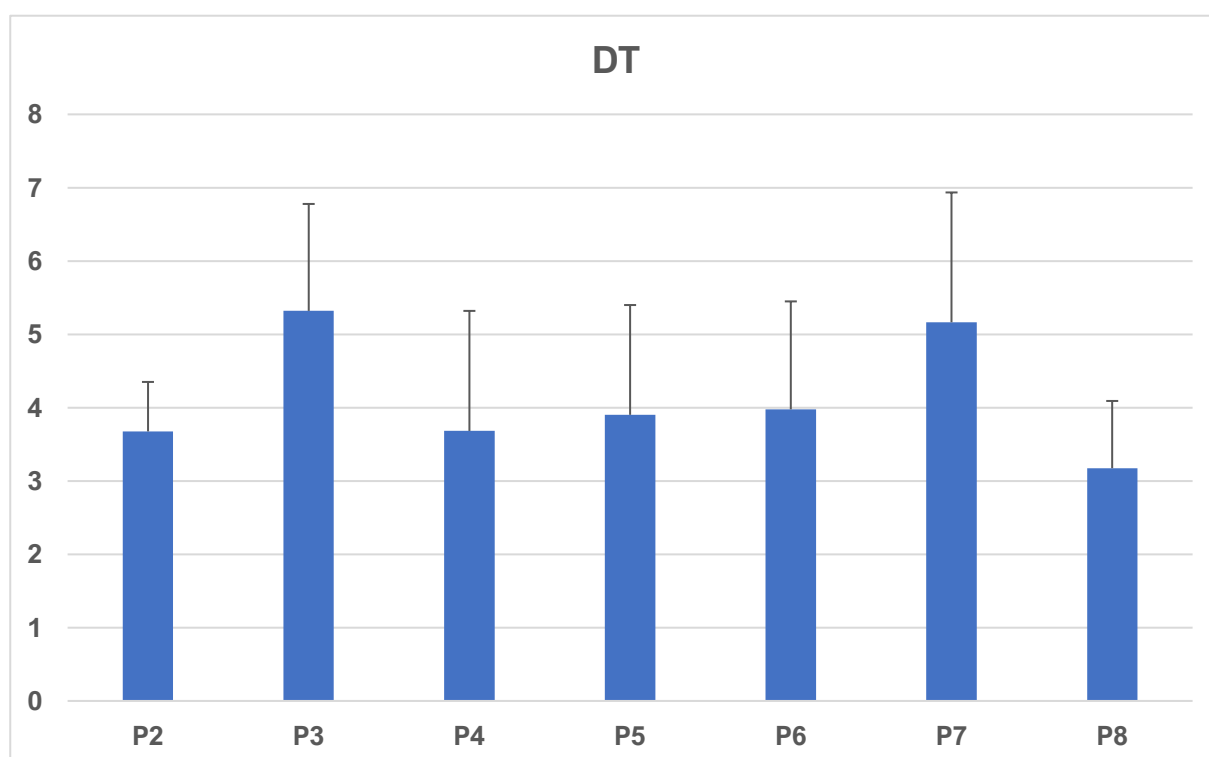


Figura 29: DT medi con deviazione standard.

CFU

Sono stati valutati i CFU di 2 campioni a 2 diversi passaggi (P2; P5).

I valori medi ottenuti a partire dalla semina di 100 cellule e 200 cellule nei 3 diversi passaggi sono riportati in tabella 13.

MEDIA CFU	P2	P5
100 cellule/pozzetto	34,05	38,665
200 cellule/pozzetto	54	55,83
DEV.ST CFU		
100 cellule/pozzetto	7,85	9,43
200 cellule/pozzetto	1,41	4,95

Tabella 13 valori medi e deviazione standard dei CFU ottenuti seminando 100-200 cellule/pozzetto. Numero campioni per ogni prova n=2.

Sopravvivenza al congelamento

La percentuale di sopravvivenza delle cellule dopo congelamento in azoto liquido è stata valutata per due campioni. È stato scelto questo metodo in quanto risulta essere il metodo standard per la crioconservazione cellulare a -80°C.

Il tempo di congelamento è stato di 3.5 mesi. La tabella 14 illustra i valori di mortalità cellulare media espressi in percentuale e la deviazione standard.

	AZOTO	-80
<i>mortalità media</i>	8,50	16,75
<i>DEV.ST</i>	7,78	7,42

Tabella 14 valori medi e deviazione standard della percentuale di mortalità ottenuta scongelando le cellule mantenute a -80 e in azoto. Numero campioni per ogni prova n=2.

DIFFERENZIAZIONI

Le differenziazioni sono state eseguite su due popolazioni cellulari. Le figure 22, 23 e 24 riportano i risultati osservati per cellule del campione 04-02-22 al passaggio P5 dopo stimolazione di 21 gg con i medium di differenziazione.

Per ogni tipologia di differenziazione è stato valutato anche un campione controllo mantenuto per lo stesso periodo nel medium di coltura di mantenimento.

Si possono notare nella Figura 30A la presenza di raccolte intracellulari di materiale lipidico, segno dell'avanzamento in senso adipogenico.

Nella figura 31A e 31A' si notano la presenza di accumuli dalle MSC differenziate in senso condrogenico.

In figura 32A e 32A' si notano depositi di matrice ossea differenziazione in senso osteogenico.

Differenziazione in senso adipocitico

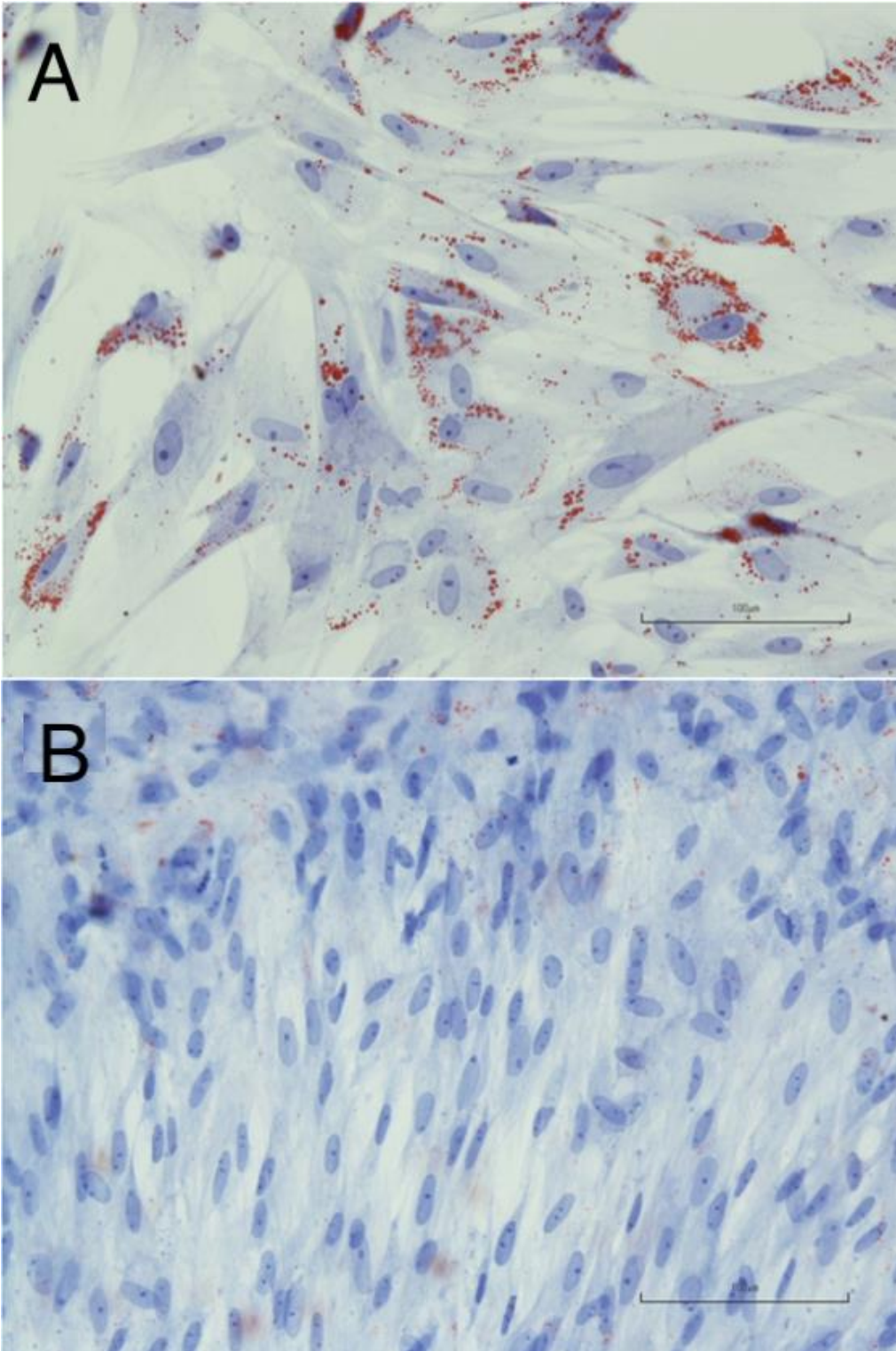


Figura 30: A: cellule differenziate in senso adipocitico e colorate con colorazione Oil red O. Sono evidenti numerosi vacuoli intracitoplasmatici di colore rosso. B: controllo. Scale bar: 400x, colorazione red Oil O.

Differenziazione in senso condrogenico

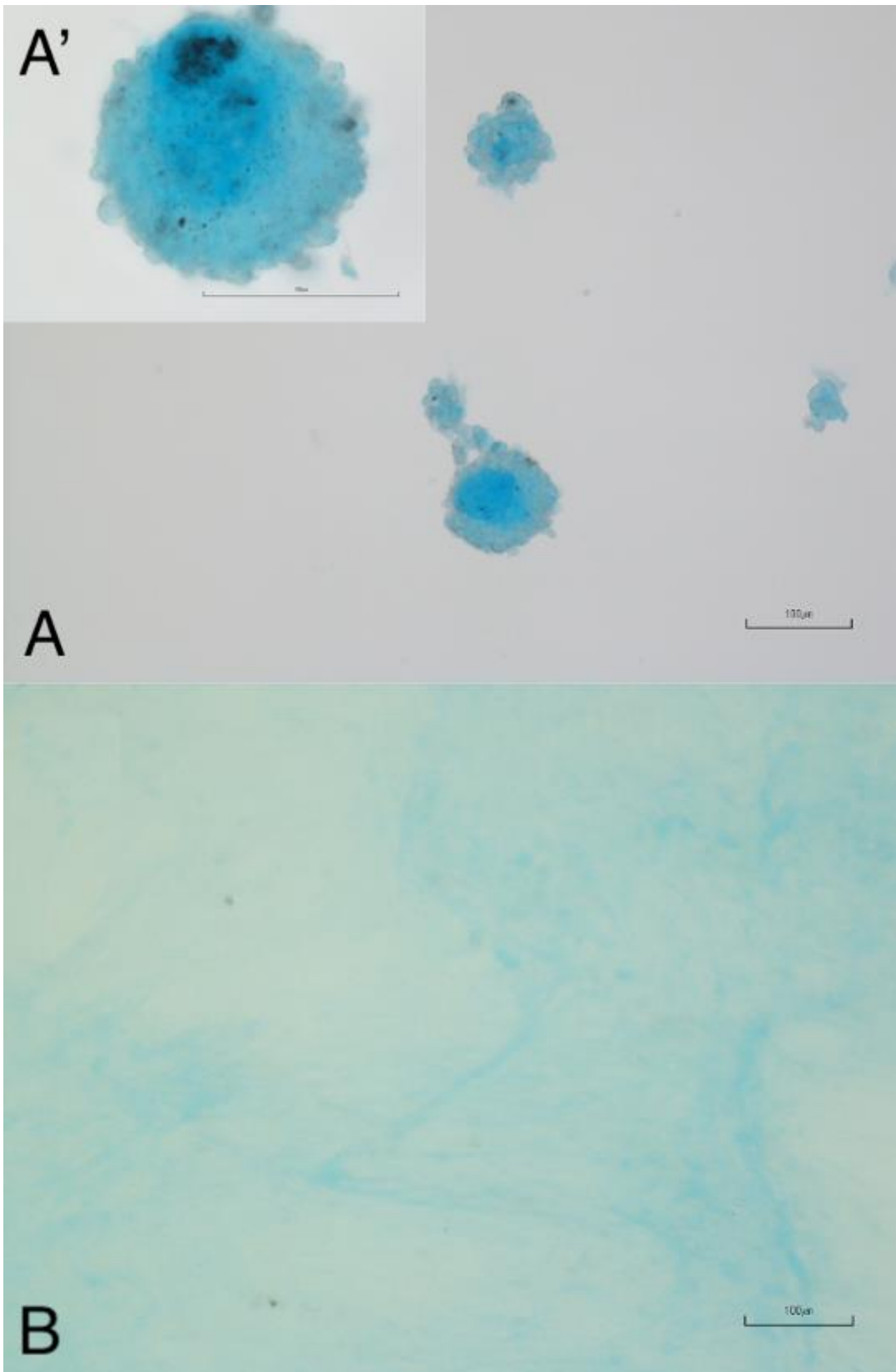


Figura 31. A: depositi di matrice extracellular e segno dell'avvenuta differenziazione di matrice extracellulare ingrandito a 400X. B: controllo. Ingrandimento 100x, colorazione Alcian BI. Scale bar: 100 µm.

Differenziazione in senso osteogenico

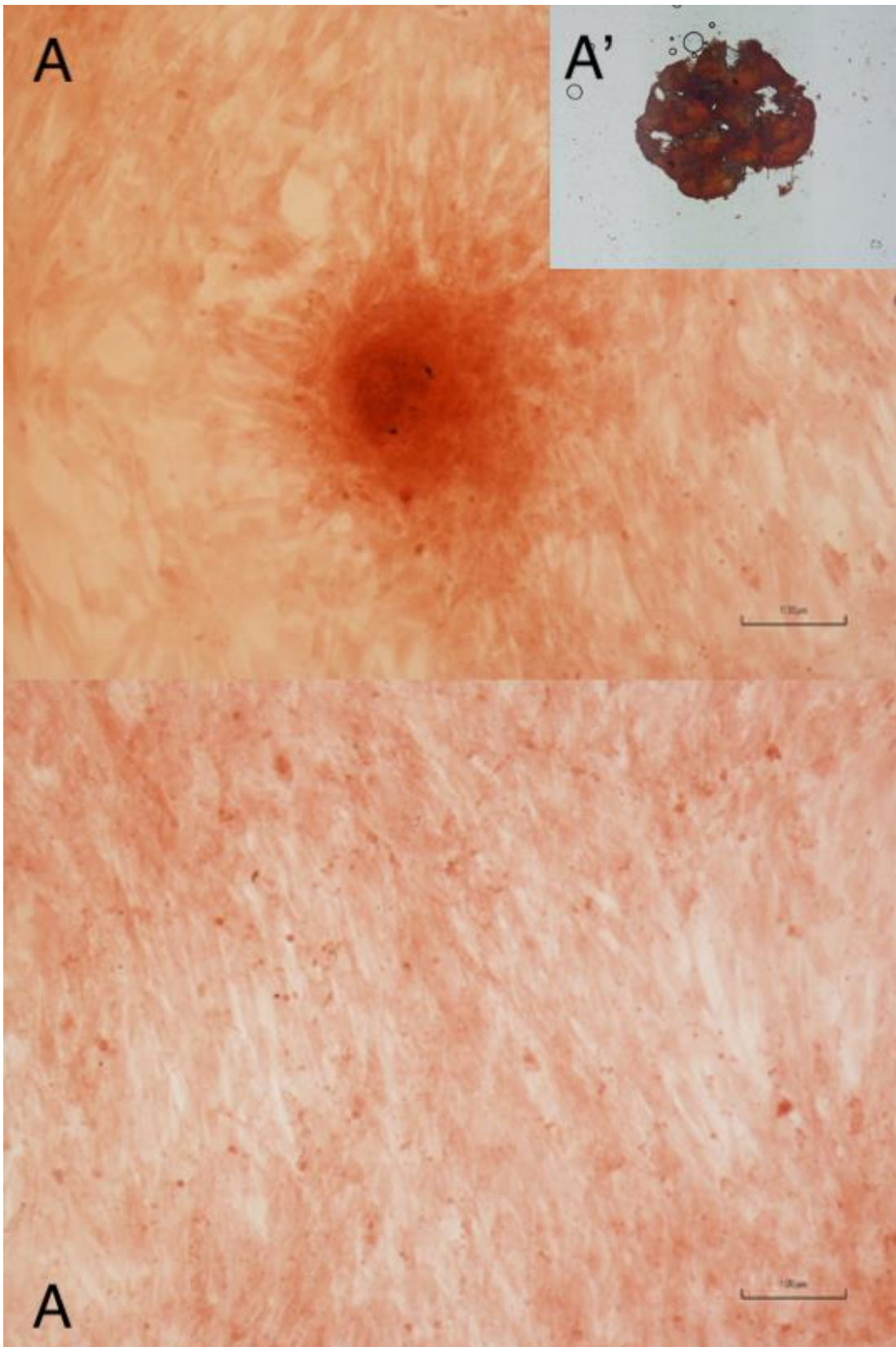


Figura 32. A: deposito di matrice osteoide colorato in rosso con senso osteogenico. A': ulteriore deposito visualizzato a 20x
Scale bar: 100 μ m.

ESPRESSIONE GENICA

La identificazione di popolazioni cellulari di MSC nei mammiferi si basa sull'analisi di espressione genica di un panel di markers identificati dalla International Society for Cellular Therapy (ISCT). Vista la mancanza di anticorpi specifici per cellule di *Trachemy scripta*, di norma utilizzati per questo tipo di analisi è stata analizzata mediante RT-PCR, generando per i diversi markers utilizzati primers specifici, come indicato nella sezione Materiali e Metodi. È stata eseguita la PCR su 4 diversi campioni ai passaggi tra il P4 ed il P8 di cellule e su 3 campioni di leucociti isolati come controllo positivo dei marker negativi delle MSC (figura 33,34).

Gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati per confermare la corrispondenza con la sequenza genica descritta in banca dati. Per i geni non espressi nelle colture di MSC, l'espressione è stata valutata su popolazioni di MSC. L'espressione dovrebbe essere presente.

Le cellule derivate dal tessuto adiposo ed espanse in coltura sono risultate positive a CD90, CD105, CD44 e CD73. Non si è osservata espressione di CD34, mentre la espressione di HLA-DRA è risultata molto debole. La espressione di CD34 e HLA-DRA è stata invece osservata in cellule bianche del sangue, permettendo di validare i primers utilizzati. Per CD45 invece non è stato possibile osservare l'espressione in cellule del sangue, indicando possibili problemi nel funzionamento dei primers utilizzati. Per CD31 è

stata osservata una debole espressione nelle MSC, ma il sequenziamento non ha dimostrato corrispondenza con le sequenze riportate in banca dati. CD 45 non è mai stato identificato né nelle MSC né nei leucociti, non è stato quindi possibile conferirlo al laboratorio per il sequenziamento necessario per la validazione dei primer.

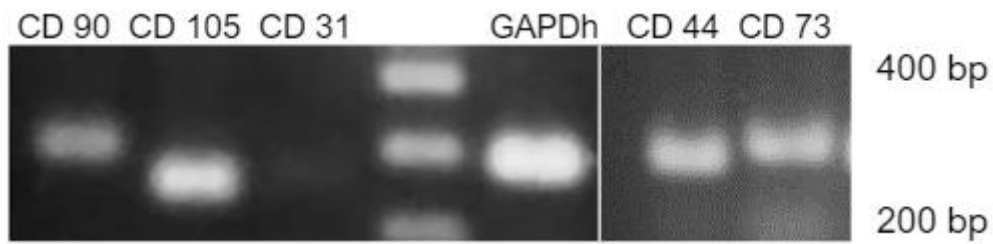


Figura 33: Gel agarosio al termine della corsa elettroforetica. A partire da sinistra si può notare l'espressione di CD 90, CD 105, CD 44, CD 73 da parte delle MSC di *Trachemys scripta*., la mancata espressione di CD 31, l'espressione di GAPDh

Nella tabella 15 sono indicate di tutti i geni e le percentuali di corrispondenza del campione sequenziato rispetto alla sequenza del gene riportata in banca dati.

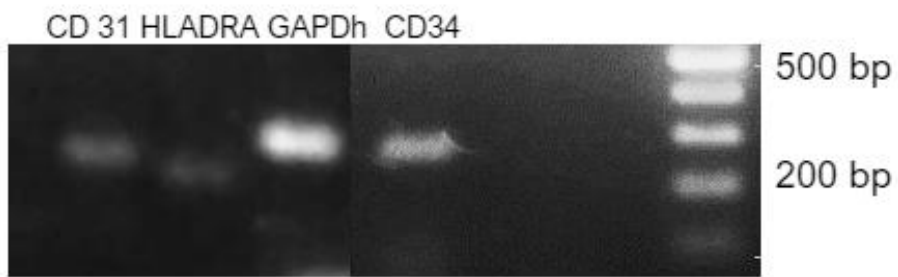


Figura 34: Gel agarosio al termine della corsa elettroforetica eseguita per caratterizzazione fenotipica dei leucociti di *Trachemys scripta*. A partire da sx si nota la mancata espressione di CD 31 da parte dei leucociti e l'espressione di HLADRA, GAPDh e CD 34.

A seguire sono riportate a confronto le sequenze ottenute tramite il sequenziamento (Sbjct) e le sequenze originali del gene (Query) Forward e Reverse per ogni gene.

Tabella 15: geni percentuali di corrispondenza del campione sequenziato rispetto alla sequenza del gene riportata in banca dati.

GENE		CODICE	PESO	% DI CORRISPONDENZA
CD44	F- GCTTCTACAGCCACCAGTTCTA R- CCACCCATCTTCTTGTCGGA	XM_034769691.1 Cd44	263	99%
CD73	F- CTTGGGAAATTTGATTTGTGATGCC R- GTAGACCACATGAATGCCTGC	XM_034766097.1 NT5E transcript variant X2	297	99%
CD90	F- GAACAGCCTCAAGACCCGAT R- CCTTCCCTTCACAGGGACAC	XM_034754732.1 THY1	282	98%
CD105	F- GTGCACAGACGACTCCATTG R- CACTCGAACGGCACCTCAA	XM_034793487.1 Endoglin	243	98.4%
CD31	F- TGAGAAACTGCCATCTGGACC R- CTATTGGCAATGAGGAGGGGG	XM_034789735.1 PECAM1transcrip t variant X1(comp. X4,5,9,10)	278	NON CORRISPONDENTE
CD34	F- GCAGAGTATTGAACGCCACC R- TCTGAGCCCCTCTGTTGAGA	XM_034770555.1 CD34 transcript variant X1	257	100%
CD45	F- TTACGTGTCCGCTTTACGGG R- AGGAGACACCCCTCACCTGTT	XM_034780075.1 PTPRC	269	NON RILEVATO
HLA-DRA	F- CAGGGCGACTTCTACGACTG R- CCCC GCGTTTATAAGGGGC	XM_034789225.1 HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain-like (LOC117886999), transcript variant X1	230	98.2%
GAPDH	F- GAATGGGAAGCTCACTGGAA R- CCAAACCTCATTGTCATACCAGG	XM_034787619.1	285	98%

DISCUSSIONE

In questo studio, sono state isolate MSC da tessuto adiposo di tartaruga palustre americana (*Trachemys scripta*) prelevato durante intervento routinario di castrazione (maschi) o ovariectomia (femmine) il tessuto adiposo è stato reso possibile in quanto sono stati recuperati numerosi esemplari (maschi e femmine) dall'associazione ENPA di Parma, che ha istituito questi animali, che, a causa della loro invasione, sono considerati specie invasive e minacciano la fauna autoctona <https://www.isprambiente.gov.it/it/archivio/notizie-e-novita-normative/notizie-ispra/2020/11/piano-nazionale-per-la-gestione-della-testuggine-palustre-americana>. Tale progetto ha previsto la sterilizzazione e castrazione di 100 esemplari/anno di *Trachemys scripta*, rendendo possibile il recupero di numerosi campioni di tessuto per studi futuri nel medesimo ambito. Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di valutare un possibile utilizzo di questa specie come modello per sviluppare metodi per raccogliere, isolare, espandere e caratterizzare le cellule staminali mesenchimali come applicazione futura in altre specie di rettili. Il processo di ottenimento dei campioni di tessuto adiposo si è dimostrato semplice da eseguire e i depositi adiposi delle tartarughe palustri vengono accumulati a livello sottocutaneo nella regione prefemorale, luogo di accesso elettivo per la procedura di celiotomia laparoscopica (Proenca L et al., 2015).

Per determinare la natura del tessuto adiposo prelevato, un piccolo frammento di campione è stato fissato in formalina e processato per l'analisi istologica. La colorazione con Ematossilina-Eosina (EE) ha rivelato la presenza di numerosi gruppi di adipociti maturi, associati a tessuto fibroso, vasi sanguigni, linfatici e cromatofori. In letteratura, non esiste attualmente una descrizione accurata della struttura dei depositi adiposi sottocutanei nel genere *Trachemys*. La presenza variabile di cromatofori nei campioni evidenti istologico con colorazione EE potrebbe essere indicativa del colore bruno tipico dei depositi adiposi prelevati.

Oltre all'isolamento delle MSC del tessuto a quelli di valutarne la morfologia cellulare, la velocità di crescita, la formazione di CFU, la capacità di differenziazione e l'espressione genica dei marcatori definiti dalla ISCT. È stata inoltre testata la possibilità di conservazione delle cellule ottenute tramite congelamento (crioconservazione).

Il protocollo di estrazione ed espansione in vitro utilizzato in questo studio è stato validato nei mammiferi, ma non nei rettili, in quanto ad oggi, non sono stati pubblicati lavori in materia di isolamento, espansione in-vitro ed identificazione di MCS in questa classe di animali. Essendo i rettili animali eterotermi, ovvero incapaci di regolare la loro temperatura corporea in maniera indipendente rispetto alla temperatura ambientale (Angilletta et al., 2002), non sono stati però utilizzati parametri di incubazione normalmente usati per cellule di mammiferi (T 37°C).

In letteratura, esistono però lavori di tossicologia riguardanti colture cellulari di fibroblasti di tartaruga comune (*Caretta caretta*) (Fukuda T et al., 2018) (Webb SJ et al., 2014). Webb SJ e colleghi sono riusciti ad isolare e tipizzare attraverso tecniche di immunocitochimica, fibroblasti dalla cute di tartaruga comune. Nel loro studio, hanno analizzato diverse temperature di incubazione per le cellule in coltura (25°C, 30°C, 35°C) ed hanno dimostrato come la temperatura di 30°C sia ottimale per la loro proliferazione. In altri lavori, sono indicate per la coltura di cellule di tartaruga marina temperature comprese tra i 26 °C e i 30 °C (Finlayson, Madden Hof, and van de Merwe 2020). Questi dati rafforzano le ipotesi su come la temperatura di incubazione ideale delle cellule (che ne permetta la proliferazione minimizzandone lo stress e garantendone la massima sopravvivenza durante i vari passaggi) sia strettamente variabile non solo nelle varie classi di animali, ma addirittura nelle varie specie. Non sorprende, come ogni specie si sia adattata ed evoluta per occupare diverse nicchie ecologiche dalle temperature medie annuali molto diverse tra loro. In mancanza di protocolli validati per l'ottenimento di MSC di *Trachemys scripta*, abbiamo quindi deciso di utilizzare come temperatura di incubazione, 28°C (parametro medio del range termico ottimale per questa specie (Finlayson, Madden Hof, and van de Merwe 2020)). Non sorprende come tale temperatura di incubazione (28°C) sia stata utilizzata anche per ottenere colture cellulari provenienti da altre classi di animali eterotermi (anfibi e pesci) (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021) (Lund TC et al., 2014). Uno studio recentemente pubblicato da Otsuka Y e colleghi (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021) ha dimostrato la possibilità di ottenere e caratterizzare MSC ottenute dal midollo osseo di

Xenopus laevis, un anfibio utilizzato come modello sperimentale in diversi ambiti della medicina, a causa della facilità di allevamento, prolificità ed ottime capacità rigenerative tissutali (Scheenen WJ et al., 2009).

Nello studio sopra citato, il midollo osseo era estratto direttamente per frammentazione meccanica dalle ossa degli animali sacrificati. Ovviamente, per ragioni di tipo etico, questa metodica è stata scartata. Nei cheloni, il midollo osseo è presente in una matrice spongiosa ossea non solo delle ossa lunghe e delle vertebre, ma anche di carapace, ponte e piastrone (Jacobson ER., 2007) (Skyles IV et al., 2008). Il prelievo di midollo osseo in queste specie richiede quindi una perforazione di tali strutture al fine di raggiungere le lacune ossee ed accedere alle varie componenti cellulari. Tale pratica risulterebbe invasiva e dolorosa. Sarebbe inoltre complesso ottenere una quantità sufficiente di campione da processare al fine di isolare un numero significativo di MSC da applicare in un contesto clinico. Si è scelto quindi di non utilizzare questa metodica.

Per la realizzazione di questo studio, abbiamo utilizzato due metodiche: la digestione enzimatica del tessuto adiposo e la frammentazione. Entrambi questi metodi sono stati validati nei mammiferi ed esistono tecniche sistematiche (Neupane et al. 2008) (Araña et al. 2013) (Ghorbani, Jalali e Varedi 2014). Come notato all'esame istologico, la presenza maggiore di tessuto adiposo potrebbe influire sulla tempistica di frammentazione e digestione, anche se in questo studio, non sono state notate differenze significative rispetto alla processazione di tessuto adiposo di mammifero. Considerate le dimensioni medie di una *Trachemys s.* non è stato possibile ottenere grandi quantità di tessuto adiposo da un singolo soggetto (1 grammo/soggetto). Per questo motivo, le cellule ottenute dalla lavorazione di un grammo di tessuto adiposo sono in numero ridotto e sono necessari diversi giorni prima di raggiungere una densità utile ad una eventuale applicazione in campo terapeutico. Per quanto riguarda il mezzo di coltura, è stato scelto di utilizzare il DMEM in quanto ampiamente utilizzato per la coltura di MSC nei mammiferi, negli zebrafish (Fathi et al., 2019) nelle tartarughe comuni (*Caretta caretta*) (Webb et al. 2014). Webb e colleghi hanno sperimentato diversi mezzi di coltura (DMEM, MEM, RPMI 1640) durante la coltura di fibroblasti di *Caretta caretta*. Non sono state notate differenze statisticamente significative riguardanti la crescita cellulare nei vari mezzi di coltura. Per la realizzazione di questo studio, abbiamo utilizzato inoltre DMEM addizionato con 20% di siero fetale bovino (FBS), in quanto nello studio condotto da Otsuka-Yamaguchi e colleghi (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021) sugli

Xenopus laevis è stato utilizzato questo protocollo. Per quanto riguarda la crescita in coltura, abbiamo notato una differenza significativa nella velocità di crescita delle cellule da noi isolate rispetto a quelle di mammifero, pesce e di anfibio. Il DT medio delle MSC di *Trachemys scripta* da noi isolate al terzo passaggio (P3) è stato di 127.2 ore (5.3 giorni), molto più lento rispetto a quello misurato per le MSC del midollo osseo di *Xenopus laevis* (25.6 ore (1.06 giorni)) (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021) per le MSC isolate dal cuore (50.67 ore (2.11 giorni)) e dal fegato 46.6 (1.94 giorni) degli zebrafish (*Danio rerio*) al P4 (Fathi E et al., 2019) e per le MSC dal tessuto adiposo di cane (circa 36 ore (1.5 giorni) al P3) (Kim JH et al., 2018) (Choi HJ et al., 2014). Questa differenza potrebbe essere correlata ad un metabolismo cellulare più lento del genere *Trachemys* rispetto a quello di altri animali utilizzati nei vari studi, oppure a condizioni di crescita non ottimali riguardanti la coltura cellulare stessa. Non sono state notate invece differenze statisticamente significative nelle potenzialità replicative delle cellule dal passaggio 1 (P1) al passaggio 8 (P8), che hanno mantenuto invariato il CDn ed il DT nei vari passaggi. Nello studio effettuato sugli xenopus, si è registrata una diminuzione della attività replicativa cellulare dal P5 in avanti (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021), mentre negli zebrafish e nel cane dal P4 (Fathi E et al., 2019) (Maccoccia et al. 2021). Alcune variabili possono influenzare la capacità replicativa delle cellule staminali in coltura, come l'età (Alt et al. 2012) ed il suo stato di salute. (Kilnhammer BM et al., 2014). Gli animali utilizzati in questo studio sono stati conferiti da ENPA Parma, recuperati da diverse situazioni (abbandono, ritrovamento in parchi e luoghi pubblici). Non è stato possibile quindi risalire al soggetto, né è possibile stimarla con certezza attraverso indagini morfometriche (Wilson DS., 2003) (Armstrong DP et al., 2014). La crescita dei cheloni è infatti soggetta a numerose variabili, come l'età del soggetto, la dispersione dell'anno, la presenza di patologie sottostanti, per valutare una eventuale correlazione tra età e crescita. Tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati considerati clinicamente sani dopo aver effettuato una accurata visita clinica ed esami di laboratorio, come rettili affetti da patologie subcliniche possano talvolta risultare asintomatici o non presentare alterazioni agli esami di laboratorio. Esistono inoltre numerose variabili (sesso, razza, stagione, stato ormonale, cattività vs stato selvatico etc.) che possono influenzare i valori normali di riferimento per ogni specie (Stacy NI et al., 2011). Anche per questo motivo, non è stato possibile escludere con sicurezza stati patologici sottostanti. Le cellule sono state

differenziate con successo in adipociti, con un
 medium validato per le MSC di mammifero. Questo risultato è particolarmente interessante,
 in quanto ci dimostra come anche le cellule di *Trachemys* siano sensibili ai medesimi fattori
 di differenziazione. D'altronde, anche negli
 delle cellule derivanti dal midollo osseo (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021), dal miocardio e dal
 fegato (Fathi E et al., 2019) hanno risposto positivamente alla differenziazione condrogenica,
 osteogenica e adipogenica a temperatura ambiente. Per quanto riguarda la caratterizzazione fenotipica delle cellule, non è stato possibile
 utilizzare la metodica validata per le MSC di mammifero, ovvero la citofluorimetria a flusso
 (Al-Zahrani e Al-Sharif., 2016) (Khan e Khan., 2015) in quanto non esistono ad oggi anticorpi
 validati per l'idioma *Trachemys scripta*. È stato scelto quindi di valutare
 l'espressione dei geni cPCR, in maniera simile a quanto
 descritto da Otsuka-Yamaguchi e colleghi nel lavoro riguardante il
 midollo osseo negli xenopus (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021). A differenza degli *Xenopus
 laevis*, il cui genoma è stato sequenziato e pubblicato nel 2010 (Xenopus Genome
 Consortium, (2010)), il genoma della *Trachemys scripta* è stato sequenziato più
 recentemente (2016) (Whang Z, Shan S, 2016) ed è meno studiato in quanto la *T. scripta*
 non rappresenta un modello animale di sperimentazione. Nella letteratura scientifica non
 esistono attualmente studi che abbiano misurato l'espressione dei geni di interesse nelle
 cellule o nei tessuti della tartaruga palustre americana. Per questo motivo, i primers utilizzati
 in questo studio sono stati disegnati ex novo, utilizzando come riferimento le sequenze
 geniche disponibili sul sito NCBI. È importante
 sono state ad oggi validate sperimentalmente.

Le coppie di primer utilizzate hanno amplificato con successo i geni di interesse, ad
 eccezione di CD45 e CD31. In particolare, i primer utilizzati per CD31 hanno generato un
 amplicone che non è risultato essere corrispondente alla sequenza desiderata. Tale
 insuccesso potrebbe essere legato ad un errore di disegno degli stessi primers, oppure ad
 errori contenuti nella sequenza pubblicata sul NCBI in quanto, come anticipato
 precedentemente, non è stata ad oggi validata. Entrambi i geni codificanti CD45 e CD31
 sono stati investigati non solo sulle MSC, ma anche sui leucociti isolati dal sangue. Anche in
 questo caso, il risultato è stato negativo. Attualmente, non è chiaro se la mancata
 espressione di CD45 e CD31 sia legata ad una effettiva assenza nei leucociti di *T. scripta* o
 secondaria ad errori analitici. È noto dalla letteratura, che tali geni sono espressi dai leucociti

dei mammiferi, ma attualmente non sono stati pubblicati lavori riguardo alla loro espressione nei leucociti di rettili. Alcuni lavori recenti descrivono l'espressione di marker nei leucociti di uccelli (Vahsen T et al., 2021) (Meyer MM et al., 2020). Essendo gli uccelli filogeneticamente molto vicini ai rettili (Modesto SP, Anderson JS), è possibile che tale espressione rimanga conservata. Saranno necessari quindi ulteriori studi al fine di verificarne la presenza o assenza anche in questa classe di animali. La morfologia cellulare, la capacità di differenziazione in vari tipi cellulari di origine mesenchimale e l'espressione dei marker specifici per le MSC di mammifero, indicano che le cellule isolate dal tessuto adiposo della fossa del fianco di *Trachemys scripta* sono con ogni probabilità un fenotipo cellulare corrispondente alle cellule stromali mesenchimali. Per quanto riguarda l'espressione di marker normalmente espressi dalle cellule staminali mesenchimale di mammifero, è stata ottenuta nel nostro caso una percentuale di omologia maggiore del 98% con le sequenze pubblicate sul sito della NCBI; tale percentuale è stata confermata dal confronto delle sequenze complementari ottenute dal sequenziamento forward e reverse degli ampliconi. Sebbene alcune incertezze persistano riguardo ai risultati relativi a CD45 e CD31, l'espressione genica è risultata sostanzialmente conservata secondo la ISCT.

Alcuni campioni sono stati esclusi dallo studio in quanto entro 5 giorni dalla processazione, è stato notato un inquinamento della coltura cellulare. È stato quindi prelevato un campione di medium contaminato e sottoposto ad esame batteriologico, con conseguente isolamento di *Elizabethkingia meningoseptica*, un batterio GRAM- presente nel suolo e potenzialmente patogeno per i soggetti immunodepressi (Shaw et al., 2015). Considerata l'asepsi rigorosa durante gli interventi chirurgici, risulta improbabile che la contaminazione del campione sia avvenuta in fase di prelievo. Non è da escludere comunque, che i batteri fossero già presenti nel tessuto durante il prelievo, a causa di una batteriemia subclinica non diagnosticata durante lo screening preoperatorio. È stato curioso osservare che non fossero evidenti segni di stress cellulare, in quanto le cellule non diminuivano in numero, né in velocità di replicazione e non si sono osservate alterazioni morfologiche (vacuolizzazioni citoplasmatiche, acquisizione di forma rotondeggiante e successivo distacco dalla piastra). Tra le forme di contaminazione osservate nei campioni coinvolti, è stata inoltre la presenza di muffe, osservabili al microscopio e ad occhio nudo come colonie di organismi filamentosi, visibili sulla superficie del medium di

coltura (figura 35). Per quanto riguarda le muffe, risulta probabile una contaminazione ambientale durante il processo di processazione/incubazione del campione.

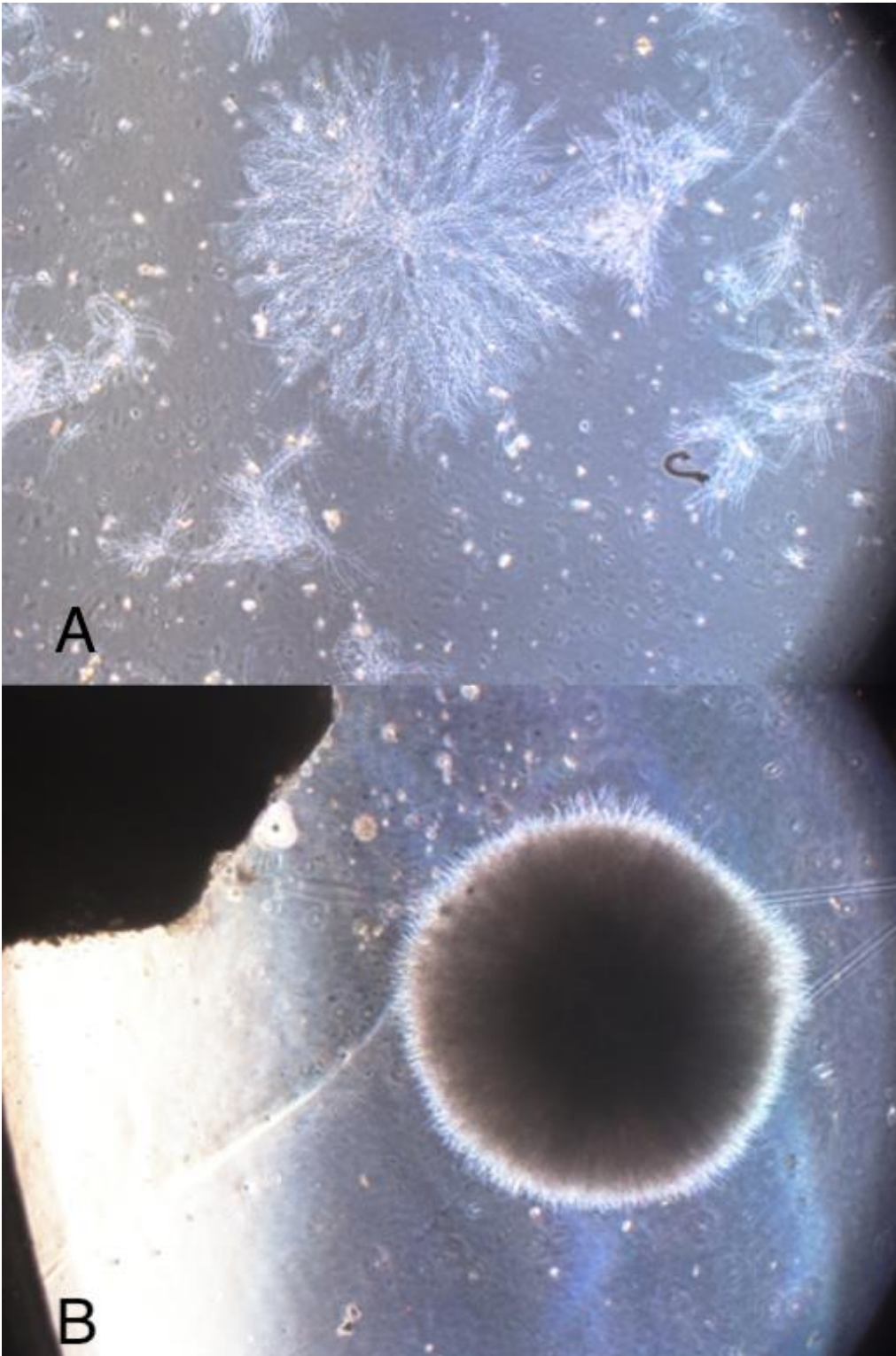


Figura 35: A, B: esempi di contaminazione da muffe riscontrati nei campioni eliminati dallo studio.

CONCLUSIONE

Come obiettivo futuro, sarà sicuramente interessante analizzare le possibili applicazioni cliniche delle MSC ottenute da tessuto adiposo di *Trachemys scripta*. Ogni anno, tartarughe marine di diversi generi (*Caretta caretta*, *Chelonia mydas* e *Dermochelys coriacea*), sono vittime di gravi lesioni traumatiche causate dall'impatto con scafi o eliche di motori di natanti. Tali lesioni sono solitamente molto estese e richiedono lunghi periodi di ospedalizzazione dei pazienti, che talvolta non riescono ad essere più rilasciati nel loro ambiente naturale (Oros J et al., 2005). Una sorte simile vede coinvolte ogni anno migliaia di testuggini terrestri in tutto il mondo, molte delle quali irrimediabilmente (https://www.iucnredlist.org), vittima di investimenti (Tucker-Retter et al., 2022) (Biaggini M et al., 2018) o incidenti domestici causati da tagliaerba o altri attrezzi da giardino (Rowland M et al., 2016). Su tali specie garantire benefici come è stato dimostrato nelle altre specie di animali domestici e sperimentali, come l'incubazione a diverse temperature, e valutazione di differenti tecniche di conservazione al fine di standardizzare una metodica adatta ad ottenere la massima resa cellulare per future applicazioni cliniche. In tale ambito, invece, si potranno valutare eventuali differenze tra le diverse vie di somministrazione, distribuzione delle MSC nell'organismo, proprio il potenziale rigenerativo. Tali prospettive aprono un nuovo capitolo riguardante la medicina rigenerativa e la terapia cellulare nei rettili.

BIBLIOGRAFIA

- Adin CA, Gregory CR, Kyles AE, Cowgill L. Diagnostic predictors of complications and survival after renal transplantation in cats. *Vet Surg.* (2001) 30:515–21. doi: 10.1053/jvet.2001.28418
- Alt EU, Senst C, Murthy SN, Slakey DP, Dupin CL, Chaffin AE, Kadowitz PJ, Izadpanah R. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem cell research.* 2012 Mar 1;8(2):215-25.
- Andreas K, Sittinger M, Ringe J. Toward in situ tissue engineering: chemokine-guided stem cell recruitment. *Trends in biotechnology.* 2014 Sep 1;32(9):483-92.
- Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem cells.* 2019 Jul 1;37(7):855-64.
- Angilletta Jr MJ, Niewiarowski PH, Navas CA. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal Biology.* 2002 Aug 1;27(4):249-68.
- Araña M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. *Cellular Cardiomyoplasty: Methods and Protocols.* 2013:47-61.
- Armstrong DP, Brooks RJ. Estimating ages of turtles from growth data. *Chelonian Conservation and Biology.* 2014 Jul 1;13(1):9-15.

- Barberini DJ, Aleman M, Aristizabal F, Spriet M, Clark KC, Walker NJ, Galuppo LD, Amorim RM, Woolard KD, Borjesson DL. Safety and tracking of intrathecal allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy and diseased horses. *Stem cell research & therapy*. 2018 Dec;9(1):1-1.
- Barussi FC, Bastos FZ, Leite LM, Fragoso FY, Senegaglia AC, Brofman PR, et al. Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respir Physiol Neurobiol*. (2016) 232:35–42. doi: 10.1016/j.resp.2016.07.002
- Behnia A, Haghghat A, Talebi A, Nourbakhsh N, Heidari F. Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect. *World journal of stem cells*. 2014 Sep 9;6(4):505.
- Benson, D. H., & Blackburn, T. M. (2007). The global trade in tortoises and freshwater turtles: trends, issues and welfare concerns. *Animal Welfare*, 16(1), 1-15.
- Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, Trevino M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, Giraldez MJ, Macia M, Lamelas ML, Saa J, Vizoso F. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015 Feb 1;56(2):983-92.
- Besalti O, Aktas Z, Can P, Akpinar E, Elcin AE, Elcin YM. The use of autologous neurogenically-induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of paraplegic dogs without nociception due to spinal trauma. *J Vet Med Sci*. (2016) 78:1465–73. doi: 10.1292/jvms.15-0571
- Bhat IA, T BS, Somal A, Pandey S, Bharti MK, Panda BSK, et al. An allogenic therapeutic strategy for canine spinal cord injury using mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. (2019) 234:2705–18. doi: 10.1002/jcp.27086
- Biaggini M, Corti C. Facing habitat reduction in your own shell: patterns of non-lethal injuries in the endangered tortoise *Testudo Hermanni* in Italy. *Herpetol Conserv Bio*. 2018 Dec 1;13(3):539-50.
- Bonato, L., & Pivato, M. (2013). The invasive red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*) in Italy: a review. *Aquatic Invasions*, 8(3), 353-362.
- Bray ER, Oropallo AR, Grande DA, Kirsner RS, Badiavas EV. Extracellular vesicles as therapeutic tools for the treatment of chronic wounds. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 23;13(10):1543.

- Cabezas J, Lara E, Pacha P, Rojas D, Veraguas D, Saravia F, et al. The endometrium of cycling cows contains populations of putative mesenchymal progenitor cells. *Reprod Domest Anim.* (2014) 49:550–9. doi: 10.1111/rda.12309
- Cabezas J, Rojas D, Navarrete F, Ortiz R, Rivera G, Saravia F, Rodriguez-Alvarez L, Castro FO. Equine mesenchymal stem cells derived from endometrial or adipose tissue share significant biological properties, but have distinctive pattern of surface markers and migration. *Theriogenology.* 2018 Jan 15;106:93-102.
- Cadi A, Joly P. Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity & Conservation.* 2004 Dec;13:2511-8.
- Cahuascanco B, Bahamonde J, Huaman O, Jervis M, Cortez J, Palomino J, et al. Bovine fetal mesenchymal stem cells exert antiproliferative effect against mastitis causing pathogen *Staphylococcus aureus*. *Vet Res.* (2019) 50:25. doi: 10.1186/s13567-019-0643-1
- Can, Alp. 2008. "A Consistent Review and Nomenclature of Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Orthopaedic Research* 26(5):641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
- Canapp SO Jr, Leasure CS, Cox C, Ibrahim V, Carr BJ. Partial cranial cruciate ligament tears treated with stem cell and platelet-rich plasma combination therapy in 36 dogs: a retrospective study. *Front Vet Sci.* (2016) 3:112. doi: 10.3389/fvets.2016.00112
- Caplan, Arnold I. 1991. *Journal of Orthopaedic Research* 9(5):641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
- Caplan H, Olson SD, Kumar A, George M, Prabhakara KS, Wenzel P, Bedi S, Toledano-Furman NE, Triolo F, Kamhieh-Milz J, Moll G. Mesenchymal stromal cell therapeutic delivery: translational challenges to clinical application. *Frontiers in immunology.* 2019 Jul 31;10:1645.
- Caplan, Arnold I. 2008. "Adult Mesenchymal Stem Cell." <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.008>.
- Cerquetella M, Spaterna A, Laus F, Tesei B, Rossi G, Antonelli E, et al. Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans. *World J Gastroenterol.* (2010) 16:1050–6. doi: 10.3748/wjg.v16.i9.1050
- Chawla K, Gopinathan A, Varma M, Mukhopadhyay C. Elizabethkingia meningoseptica outbreak in intensive care unit. *Journal of Global Infectious Diseases.* 2015 Jan 1;7(1):43-4.
- Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co infused with hematopoietic cells to treat a radiation induced multi organ failure

- syndrome. *The Journal of Gene Medicine: A cross disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*. 2003 Dec;5(12):1028-38.
- Chen W, Huang Y, Han J, Yu L, Li Y, Lu Z, Li H, Liu Z, Shi C, Duan F, Xiao Y. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunologic research*. 2016 Aug;64:831-40.
- Choi, H. J., et al. (2014). "Characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from different adipose tissue depots." *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(12), 966-975.
- Chow L, Johnson V, Impastato R, Coy J, Strumpf A, Dow S. Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2020 Feb 1;9(2):235-49.
- Chu PG, Arber DA. CD79: a review. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2001 Jun 1;9(2):97-106.
- Chuang C, Ramaker MA, Kaur S, Csomos RA, Kroner KT, Bleedorn JA, et al. Radiographic risk factors for contralateral rupture in dogs with unilateral cranial cruciate ligament rupture. *PLoS ONE*. (2014) 9:e106389. doi: 10.1371/journal.pone.0106389
- Cogswell JP, Zeleznik-Le N, Ting JP. Transcriptional regulation of the HLA-DRA gene. *Critical reviews in immunology*. 1991 Jan 1;11(2):87-112.
- Cohen JM, Richardson DW, McKnight AL, Ross MW, Boston RC. Long-term outcome in 44 horses with stifle lameness after arthroscopic exploration and debridement. *Vet Surg*. (2009) 38:543-51. doi: 10.1111/j.1532-950X.2009.00524.x
- Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 Jun 1;30(6):1104-9.
- Costa CRM, Feitosa MLT, Rocha AR, Bezerra DO, Leite YKC, Argolo Neto NM, et al. Adipose stem cells in reparative goat mastitis mammary gland. *PLoS ONE*. (2019) 14:e0223751. doi: 10.1371/journal.pone.0223751
- Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva Jr WA, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*. 2008 May 1;36(5):642-54.

- Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes ME. Mesenchymal stem cells empowering tendon regenerative therapies. *International journal of molecular sciences*. 2019 Jun 19;20(12):3002.
- Creane M, Howard L, O'Brien T, Coleman CM. Biodistribution and retention of locally administered human mesenchymal stromal cells: Quantitative polymerase chain reaction-based detection of human DNA in murine organs. *Cytotherapy*. 2017 Mar 1;19(3):384-94.
- Dakin SG, Jespers K, Warner S, O'Hara LK, Dudhia J, Goodship AE, et al. The relationship between *in vivo* limb and *in vitro* tendon mechanics after injury: a potential novel clinical tool for monitoring tendon repair. *Equine Vet J*. (2011) 43:418–23. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00303.x
- Dave M, Menghini P, Sugi K, Somoza RA, Lee Z, Jain M, Caplan A, Cominelli F. Ultrasound-guided intracardiac injection of human mesenchymal stem cells to increase homing to the intestine for use in murine models of experimental inflammatory bowel diseases. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2017 Sep 1(127):e55367.
- de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Gargesha M, Merino A, Korevaar SS, et al. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells. *Stem Cells*. (2018) 36:602–15. doi: 10.1002/stem.2779
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2002 May 15;99(10):3838-43.
- Dominici ML, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Jan 1;8(4):315-7.
- Doneley, Monks, Johnson, and Carmel. 2018. "Rep (VetBooks.Ir)." . "
- Donovan, Jerald A, Gary A Koretzky², J A Donovan Immune Respons <http://journals.wo.com/jash>.
- Dyson SJ. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J*. (2004) 36:415–9. doi: 10.2746/0425164044868422

- EMA. *Questions and Answers on Allogeneic Stem Cell-Based Products for Veterinary Use: Specific Questions on Extraneous Agents*. (2019). Available online at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-allogeneic-stem-cell-based-products-veterinary-use-specific-questions-sterility_en.pdf (accessed February 15, 2020).
- Eshar D, Rooney TA, Gardhouse S, Beaufrère H. Evaluation of the effects of a dexmedetomidine-midazolam-ketamine combination administered intramuscularly to captive red-footed tortoises (*Chelonoidis carbonaria*). *American Journal of Veterinary Research*. 2021 Nov 1;82(11):858-64.
- Fathi E, Farahzadi R, Sheikhzadeh N. Immunophenotypic characterization, multi-lineage differentiation and aging of zebrafish heart and liver tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel approach in stem cell-based therapy. *Tissue and Cell*. 2019 Apr 1;57:15-21.
- Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, et al. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet Surg*. (2014) 43:255–65. doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12100.x
- Ficetola Gentile Francesco, and Scali Stefano. 2010. "Invasive Amphibians
- Finlayson KA, Hof CA, van de Merwe JP. Development and application of species-specific cell-based bioassays to assess toxicity in green sea turtles. *Science of the Total Environment*. 2020 Dec 10;747:142095.
- Francois M, Romieu R, Li M, Galipeau J. IDO Expression in human mesenchymal stromal cells mediates T cell suppression and leads to monocyte differentiation into IL-10 secreting immunosuppressive CD206+ M2 macrophages. *Blood*. 2010 Nov 19;116(21):2784. Fox PR. Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. *J Vet Cardiol*. (2012) 14:103–26. doi: 10.1016/j.jvc.2012.02.001
- Macrophage *Blood* 116 (21): 2784–2784. <https://doi.org/10.1182/blood.v116.21.2784.2784>.
- Friedenstein alexander, petrakova klara, kurolesova alexandra, and frolova galina. 1968. " H E T E R O T O P I C _ T R A N S P L A N T S _ O F _ B O N E _ M A R R O W . 9 . "
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*. 1970 Oct;3(4):393-403.
- Fukuda T, Eitsuka T, Donai K, Kurita M, Saito T, Okamoto H, Kinoshita K, Katayama M, Nitto H, Uchida T, Onuma M. Expression of human mutant cyclin dependent kinase 4, Cyclin D and

- telomerase extends the life span but does not immortalize fibroblasts derived from loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Scientific reports*. 2018 Jun 20;8(1):9229.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001;169(1):12-20
- Gardin C, Ferroni L, Bellin G, Rubini G, Barosio S, Zavan B. Therapeutic potential of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of liver disease. *Int J Mol Sci*. (2018) 19:4064. doi: 10.3390/ijms19124064
- Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue and Cell*. 2014 Feb 1;46(1):54-8.
- Grady ST, Watts AE, Thompson JA, Penedo MCT, Konganti K, Hinrichs K. Effect of intra-ovarian injection of mesenchymal stem cells in aged mares. *J Assist Reprod Genet*. (2019) 36:543-56. doi: 10.1007/s10815-018-1371-6
- Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert opinion on biological therapy*. 2008 Mar 1;8(3):255-68.
- Greer LL, Jenne KJ, Diggs HE. Medetomidine-ketamine anesthesia in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2001 May 1;40(3):8-11.
- Grezzella C, Fernandez-Rebollo E, Franzen J, Ventura Ferreira MS, Beier F, Wagner W. Effects of senolytic drugs on human mesenchymal stromal cells. *Stem cell research & therapy*. 2018 Dec;9:1-6.
- Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Equine embryonic stem like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine veterinary journal*. 2010 Oct;42(7):636-42.
- Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK. 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*. (2012) 44:25-32. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00363.x
- Hall MN, Rosenkrantz WS, Hong JH, Griffin CE, Mendelsohn CM. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Ther*. (2010) 11:E1-14.
- Hamidian Jahromi S, Davies JE. Concise review: skeletal muscle as a delivery route for mesenchymal stromal cells. *Stem cells translational medicine*. 2019 May 1;8(5):456-65.

- Han KH, Kim AK, Kim DI. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells for treating ischemic limb diseases. *Int J Stem Cells*. (2016) 9:163–8. doi: 10.15283/ijsc16053
- Hao Y, Ran Y, Lu B, Li J, Zhang J, Feng C, Fang J, Ma R, Qiao Z, Dai X, Xiong W. Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on canine radiation-induced lung injury. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2018 Oct 1;102(2):407-16.
- Henriksson HB, Papadimitriou N, Hingert D, Baranto A, Lindahl A, Brisby H. The traceability of mesenchymal stromal cells after injection into degenerated discs in patients with low back pain. *Stem cells and development*. 2019 Sep 1;28(17):1203-11.
- Harasen G. Diagnosing rupture of the cranial cruciate ligament. *Can Vet J*. (2002) 43:475–6.
- Hoffman AM, Dow SW. Concise review: stem cell trials using companion animal disease models. *Stem Cells*. (2016) 34:1709–29. doi: 10.1002/stem.2377
- Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *International immunopharmacology*. 2010 Dec 1;10(12):1496-500.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005 Jan 1;7(5):393-5.
- Di Ianni F, Merli E, Burtini F, Conti V, Pelizzone I, Di Lecce R, Parmigiani E, Squassino GP, Del Bue M, Lucarelli E, Ramoni R. Preparation and application of an innovative thrombocyte/leukocyte-enriched plasma to promote tissue repair in chelonians. *PLoS One*. 2015 Apr 22;10(4):e0122595.
- Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, O'Kane CM, Krasnodembskaya AD. Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS. *Stem cells*. 2016 Aug 1;34(8):2210-23.
- Jacobson ER, editor. *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. CRC Press; 2007 Apr 11.
- Jankowski M, Dompe C, Sibiak R, Wsiatycz G, Mo B, Dyszkiewicz-Konwiska M. In vitro derived stem cells: An overview of adipogenic methods, molecular analyses, and clinical applications. *Cells*. 2020 Jul 27;9(8):1783.

- Jean SS, Lee WS, Chen FL, Ou TY, Hsueh PR. Elizabethkingia meningoseptica: an important emerging pathogen causing healthcare-associated infections. *Journal of Hospital Infection*. 2014 Apr 1;86(4):244-9.
- Jimenez-Puerta GJ, Marchal JA, López-Ruiz E, Gálvez-Martín P. Role of mesenchymal stromal cells as therapeutic agents: potential mechanisms of action and implications in their clinical use. *Journal of clinical medicine*. 2020 Feb 6;9(2):445.
- Johnson V, Webb T, Norman A, Coy J, Kurihara J, Regan D, Dow S. Activated mesenchymal stem cells interact with antibiotics and host innate immune responses to control chronic bacterial infections. *Scientific reports*. 2017 Aug 29;7(1):9575.
- Karantalis V, Schulman IH, Balkan W, et al. Allogeneic cell therapy: a new paradigm in therapeutics. *Circ Res* 2015;116(1): 1215.
- Khan SAS, Khan AA. Flow cytometry for the assessment of mesenchymal stem cell quality. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (2015).
- Kim, J. H., et al. (2018). "Comparison of proliferation and differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells from different passages." *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(9), 1219-1226
- Kim EY, Lee KB, Kim MK. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB reports*. 2014 Mar;47(3):135.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109(12):1543-9
- Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012 Apr 1;18(2):129-38.
- Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, Cabral RM, Maranduba C, Gaiad TP, Morini AC, Vieira NM. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic?. *Journal of Translational Medicine*. 2008 Dec;6(1):1-3.
- Kerkis I, Lobo S.E., Kerkis A. DP stem cells and perspectives of future application in cell therapy. In: Deb K.D., Totel S.M., eds. **Stem Cells. Basic and Applications**. New Delhi: Tata McGraw Hill; 2009, pp. 426-438.
- Klinkhammer BM, Kramann R, Mallau M, Makowska A, van Roeyen CR, Rong S, Buecher EB, Boor P, Kovacova K, Zok S, Denecke B. Mesenchymal stem cells from rats with chronic

- kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. *PLoS one*. 2014 Mar 25;9(3):e92115.
- Kooy , Derek Van Der , and Samuel Weiss . *ce.0r0.00* . " W
- Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumor Biology*. 2016 Sep;37:11611-22.
- Maiti SK, Kumar MU, Srivastava L, Ninu AR, Kumar N. Isolation, Proliferation and Morphological Characteristics of Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSC) from Different Animal Species. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*. 2013 Jan 1;27(1).
- Kumar P, Kandoi S, Misra R, Vijayalakshmi S, Rajagopal K, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & growth factor reviews*. 2019 Apr 1;46:1-9.
- Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of bone and mineral research*. 2005 Aug;20(8):1394-402.
- Lanci A, Merlo B, Mariella J, Castagnetti C, Iacono E. Heterologous Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cells application on a large chronic skin wound in a 6-month-old filly. *Front Vet Sci*. (2019) 6:9. doi: 10.3389/fvets.2019.00009
- Lara E, Rivera N, Cabezas J, Navarrete F, Saravia F, Rodriguez-Alvarez L, et al. Endometrial stem cells in farm animals: potential role in uterine physiology and pathology. *Bioengineering*. (2018) 5:75. doi: 10.3390/bioengineering5030075
- Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 383–396, doi:[10.1038/nri3209](https://doi.org/10.1038/nri3209) (2012).
- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*. 2009 Jul 2;5(1):54-63.
- Letouzey V, Tan KS, Deane JA, Ulrich D, Gurung S, Ong YR, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem/stromal cells in the ovine endometrium. *PLoS ONE*. (2015) 10:e0127531. doi: 10.1371/journal.pone.0127531
- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*. 2009 Jul 2;5(1):54-63.

- Li C, Zhao H, Cheng L, Wang B. Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. *Cell & Bioscience*. 2021 Dec;11(1):1-21.
- Li H, Rong P, Ma X, Nie W, Chen C, Yang C, Zhang J, Dong Q, Wang W. Paracrine effect of mesenchymal stem cell as a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy. *Life sciences*. 2018 Dec 15;215:113-8.
- Li, Yan hua, Ling Feng, Guang Xian Zhang, and C
Cells as Therapy for Centr ~~Experimental and Molecular~~ stem
Pathology. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.016>.
- Liu Q, Zhu Y, Qi J, Amadio PC, Moran SL, Gingery A, Zhao C. Isolation and characterization of turkey bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research®*. 2019 Jun;37(6):1419-28.
- Lima MMCC and JRR da Silva. Flow cytometry for the characterization of mesenchymal stem cells. *Journal of Stem Cells* (2017).
- Linon E, Spreng D, Rytz U, Forterre S. Engraftment of autologous bone marrow cells into the injured cranial cruciate ligament in dogs. *Vet J.* (2014) 202:448–54. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.08.031
- Longley, L. 2008. " Cheloni an (Tortoi s An a d s t r A n a e s t h e s i a o f E x o t i c T u r t l e
Pets.
- Lund TC, Patrinostr X, Kramer AC, Stadem P, Higgins LA, Markowski TW, Wroblewski MS, Lidke DS, Tolar J, Blazar BR. sdf1 Expression reveals a source of perivascular-derived mesenchymal stem cells in zebrafish. *Stem Cells*. 2014 Oct 1;32(10):2767-79.
- Macchi S, Scali S, Bisi F, Martinoli A, Alonzi A, Carnevali L. Piano nazionale per la gestione della testuggine palustre americana. *Trachemys scripta*; 2020.
- Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of translational medicine*. 2014 Dec;12(1):1-4.
- Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004;21(1):33-9
- Mäkelä T, Takalo R, Arvola O, Haapanen H, Yannopoulos F, Blanco R, Ahvenjärvi L, Kiviluoma K, Kerkelä E, Nystedt J, Juvonen T. Safety and biodistribution study of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model. *Cytotherapy*. 2015 Apr 1;17(4):392-402.

- Mambelli LI, Winter GH, Kerkis A, Malschitzky E, Mattos RC, Kerkis I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. *Theriogenology*. (2013) 79:744–50. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.030
- Marcoccia R, Nesci S, Merlo B, Ballotta G, Algieri C, Pagliarani A, Iacono E. Biological characteristics and metabolic profile of canine mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue and umbilical cord matrix. *PLoS One*. 2021 Mar 4;16(3):e0247567.
- Marinas-Pardo L, Garcia-Castro J, Rodriguez-Hurtado I, Rodriguez-Garcia MI, Nunez-Naveira L, Hermida-Prieto M. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (horse allo 20) for the treatment of osteoarthritis-associated lameness in horses: characterization, safety, and efficacy of intra-articular treatment. *Stem Cells Dev*. (2018) 27:1147–60. doi: 10.1089/scd.2018.0074
- Martinello T, Gomiero C, Perazzi A, Iacopetti I, Gemignani F, DeBenedictis GM, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells improve the wound healing process of sheep skin. *BMC Vet Res*. (2018) 14:202. doi: 10.1186/s12917-018-1527-8
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *Journal of Neuroscience*. 2004 Feb 18;24(7):1726-33.
- Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine.
- Miernik K, Karasinski J. Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction*. (2012) 143:203–9. doi: 10.1530/REP-11-0202
- Mastrolia I, Foppiani EM, Murgia A, Candini O, Samarelli AV, Grisendi G, Veronesi E, Horwitz EM, Dominici M. Challenges in clinical development of mesenchymal stromal/stem cells: concise review. *Stem cells translational medicine*. 2019 Nov 1;8(11):1135-48.
- Matsuda T, Takami T, Sasaki R, Nishimura T, Aibe Y, Paredes BD, et al. A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. *Hepatol Commun*. (2017) 1:691–703. doi: 10.1002/hep4.1071
- Meyer MM, Fries-Craft KA, Bobeck EA. Composition and inclusion of probiotics in broiler diets alter intestinal permeability and spleen immune cell profiles without negatively affecting performance. *Journal of animal science*. 2020 Jan;98(1):skz383.
- Minor M, Alcedo KP, Battaglia RA, Snider NT. Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5-nucleotidase (CD73). *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2019 Dec 1;317(6):C1079-92.

- Ziolo MS, Bertelsen MF. Effects of propofol administered via the supravertebral sinus in red-eared sliders. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009 Feb 1;234(3):390-3.
- Moghaddam AS, Afshari JT, Esmaeili SA, Saburi E, Joneidi Z, Momtazi-Borojeni AA. Cardioprotective microRNAs: Lessons from stem cell-derived exosomal microRNAs to treat cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2019 Jun 1;285:1-9.
- Molsa SH, Hyytiainen HK, Hielm-Bjorkman AK, Laitinen-Vapaavuori OM. Long-term functional outcome after surgical repair of cranial cruciate ligament disease in dogs. *BMC Vet Res*. (2014) 10:266. doi: 10.1186/s12917-014-0266-8
- Morgan DA, Class R, Violetta G, Soslau G. Cytokine mediated proliferation of cultured sea turtle blood cells: Morphologic and functional comparison to human blood cells. *Tissue and Cell*. 2009 Aug 1;41(4):299-309.
- Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*. 2018 Jan;93(1):19-31.
- Muir P, Hans EC, Racette M, Volstad N, Sample SJ, Heaton C, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate molecular markers of inflammation in dogs with cruciate ligament rupture. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0159095. doi: 10.1371/journal.pone.0159095
- Nam A, Han SM, Go DM, Kim DY, Seo KW, Youn HY. Long-term management with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and conventional treatment in a dog with hepatocutaneous syndrome. *J Vet Intern Med*. (2017) 31:1514–9. doi: 10.1111/jvim.14798
- Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer research*. 2011 Jun 1;31(6):2283-90.
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2006 Aug 15;177(4):2080-7.
- Neupane M, Chang CC, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*. 2008 Jun 1;14(6):1007-15.

- Nicpon J, Marycz K, Grzesiak J. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cell injection in horses suffering from bone spavin. *Pol J Vet Sci.* (2013) 16:753–4. doi: 10.2478/pjvs-2013-0107
- Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science.* 2008 Nov 15;121(22):3683-92.
- Nishimura T, Takami T, Sasaki R, Aibe Y, Matsuda T, Fujisawa K, et al. Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. *PLoS ONE.* (2019) 14:e0210588. doi: 10.1371/journal.pone.0210588
- Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkkonen J, Deten A, Boltze J. Concise review: MSC adhesion cascade—insights into homing and transendothelial migration. *Stem cells.* 2017 Jun 1;35(6):1446-60.
- Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. *Int J Mol Sci.* (2015) 16:25476–501. doi: 10.3390/ijms161025476
- Orós J, Torrent A, Calabuig P, Déniz S. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998–2001). *Diseases of aquatic organisms.* 2005 Jan 25;63(1):13-24.
- Otsuka-Yamaguchi R, Kitada M, Kuroda Y, Kushida Y, Wakao S, Dezawa M. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in *Xenopus laevis*. *Stem Cell Research.* 2021 May 1;53:102341.
- Papa PM, Guasti PN, De Vita B, Nakazato NG, Maia L, Freitas Dell'Aqua CP, et al. Clinical safety of intratesticular transplantation of allogeneic bone marrow multipotent stromal cells in stallions. *Reprod Domest Anim.* (2020) 55:429–37. doi: 10.1111/rda.13624
- Parekkadan B, Tilles AW, Yarmush ML. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells. *Stem cells.* 2008 Jul 1;26(7):1913-9.
- Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, et al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* (2007) 13:2949–55. doi: 10.1089/ten.2007.0108
- Park SE, Jung NY, Lee NK, Lee J, Hyung B, Myeong SH, Kim HS, Suh YL, Lee JI, Cho KR, Kim DH. Distribution of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs) in canines after intracerebroventricular injection. *Neurobiology of Aging.* 2016 Nov 1;47:192-200.

- Penha EM, Meira CS, Guimaraes ET, Mendonca MV, Gravely FA, Pinheiro CM, et al. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem Cells Int.* (2014) 2014:437521. doi: 10.1155/2014/437521
- Petchdee S, Sompeewong S. Intravenous administration of puppy deciduous teeth stem cells in degenerative valve disease. *Veterinary World.* 2016 Dec;9(12):1429.
- Pérez-Merino EM, Usón-Casaús JM, Zaragoza-Bayle C, Duque-Carrasco J, Mariñas-Pardo L, Hermida-Prieto M, Barrera-Chacón R, Gualtieri M. Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Clinical and laboratory outcomes. *The Veterinary Journal.* 2015 Dec 1;206(3):385-90.
- Pérez LM, de Lucas B, Gálvez BG. Unhealthy stem cells: when health conditions upset stem cell properties. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2018 Apr 26;46(5):1999-2016.
- Pires AO, Mendes-Pinheiro B, Teixeira FG, Anjo SI, Ribeiro-Samy S, Gomes ED, Serra SC, Silva NA, Manadas B, Sousa N, Salgado AJ. Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis. *Stem cells and development.* 2016 Jul 15;25(14):1073-83.
- Pogue B, Estrada AH, Sosa-Samper I, Maisenbacher HW, Lamb KE, Mincey BD, et al. Stem-cell therapy for dilated cardiomyopathy: a pilot study evaluating retrograde coronary venous delivery. *J Small Anim Pract.* (2013) 54:361–6. doi: 10.1111/jsap.12098
- Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, Slowik P, Lang SA, Kaspar H, Geissler EK, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transplant immunology.* 2008 Nov 1;20(1-2):55-60.
- Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre-and perinatal neuroregeneration. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2006 Mar 1;194(3):664-73.
- Pratheesh MD, Dubey PK, Gade NE, Nath A, Sivanarayanan TB, Madhu DN, et al. Comparative study on characterization and wound healing potential of goat (*Capra hircus*) mesenchymal stem cells derived from fetal origin amniotic fluid and adult bone marrow. *Res Vet Sci.* (2017) 112:81–8. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.12.009

- Proença LM, Divers SJ. Coelioscopic and endoscope-assisted sterilization of chelonians. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 2015 Sep 1;18(3):555-70.
- Qamar AY, Fang X, Kim MJ, Cho J. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Animals*. (2019) 9:865. doi: 10.3390/ani9110865
- Qazi TH, Mooney DJ, Duda GN, Geissler S. *Biomaterials* that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs. *Biomaterials*. (2017) 140:103–14. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.019
- Qazi TH, Duda GN, Ort MJ, Perka C, Geissler S, Winkler T. Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. (2019) 10:501–16. doi: 10.1002/jcsm.12416
- Qu Y, Zhang Q, Cai X, Li F, Ma Z, Xu M, Lu L. Exosomes derived from miR 181 5p modified adipose derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2017 Oct;21(10):2491-502.
- Quimby, Jessica M., and Dori L. Borjesson. 2019. Current Knowledge a ~~Journal of Feline Medicine and Surgery~~. ISAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1098612X18758590>.
- Quimby JM, Webb TL, Habenicht LM, Dow SW. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res Ther*. (2013) 4:48. doi: 10.1186/scrt198
- Quimby JM, Webb TL, Randall E, Marolf A, Valdes-Martinez A, Dow SW. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. *J Feline Med Surg*. (2016) 18:165–71. doi: 10.1177/1098612X15576980
- Reinholz M, Ruzicka T, Schaubert J. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Annals of dermatology*. 2012 May 1;24(2):126-35.
- Renzi S, Ricco S, Dotti S, Sesso L, Grolli S, Cornali M, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res Vet Sci*. (2013) 95:272–7. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.01.017

- Rivas J, Dubois A, Blanquer A, Gérardy M, Ziegler U, Groschup MH, Grobet L, Garigliany MM. Tendon-Derived Mesenchymal Stem Cells (TDSCs) as an In Vitro Model for Virological Studies in Wild Birds. *Viruses*. 2023 Jun 27;15(7):1455.
- Rocheffort YG, Vaudin P, Bonnet N, Pages JC, Domenech J, Charbord P, Eder V. Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies?. *Respiratory research*. 2005 Dec;6:1-3.
- Rowland M. Common conditions of reptiles. *In Practice*. 2016 Jan;38(1):11-22.
- Rossdale PD, Hopes R, Digby NJ, offord K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and (1983). *Vet Rec.* (1985) 116:66–9. doi: 10.1136/vr.116.3.66
- Sahoo AK, Das JK, Nayak S. Isolation, culture, characterization, and osteogenic differentiation of canine endometrial mesenchymal stem cell. *Veterinary world*. 2017 Dec;10(12):1533.
- Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria de la Torre R, Montero-Vílchez T, Sierra-Sánchez A, Molina-Leyva A, Arias-Santiago S. Biodistribution of mesenchymal stromal cells after administration in animal models and humans: a systematic review. *Journal of Clinical Medicine*. 2021 Jun 29;10(13):2925.
- Sykes IV JM, Klaphake E. Reptile hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 2008 Sep 1;11(3):481-500.
- Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J.* (2003) 35:99–102. doi: 10.2746/042516403775467388
- Sangiorgi B, Panepucci RA. Modulation of immunoregulatory properties of mesenchymal stromal cells by toll-like receptors: potential applications on GVHD. *Stem cells international*. 2016 Sep 21;2016.
- Saulnier N, Loriau J, Febre M, Robert C, Rakic R, Bonte T, Buff S, Maddens S. Canine placenta: a promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells?. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2016 Mar 1;171:47-55.
- Scarabelli S, Di Girolamo N. Chelonian sedation and anesthesia. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 2022 Jan 1;25(1):49-72.

- De Schauwer C, Van de Walle GR, Van Soom A, Meyer E. Mesenchymal stem cell therapy in horses: useful beyond orthopedic injuries?. *Veterinary Quarterly*. 2013 Dec 1;33(4):234-41.
- Scheenen WJ, Jansen EJ, Roubos EW, Martens GJ. Using transgenic animal models in neuroendocrine research: lessons from *Xenopus laevis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009 Apr;1163(1):296-307.
- Secunda R, Vennila R, Mohanashankar AM, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*. 2015 Oct;67(5):793-807.
- Sgrignoli MR, Silva DA, Nascimento FF, Sgrignoli DA, Nai GA, da Silva MG, de Barros MA, Bittencourt MK, de Moraes BP, Dinallo HR, Foglia BT. Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*. 2019 Aug 1;39:101525.
- Meirelles LD, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006 Jun 1;119(11):2204-13.
- de Souza LE, Malta TM, Kashima Haddad S, Covas DT. Mesenchymal stem cells and pericytes: to what extent are they related?. *Stem cells and development*. 2016 Dec 15;25(24):1843-52.
- Spaas JH, Broeckx S, Van de Walle GR, Poletini M. The effects of equine peripheral blood stem cells on cutaneous wound healing: a clinical evaluation in four horses. *Clin Exp Dermatol*. (2013) 38:280-4. doi: 10.1111/ced.12068
- Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2006) 103:1283-8. doi: 10.1073/pnas.0510511103
- Stacy NI, Alleman AR, Saylor KA. Diagnostic hematology of reptiles. *Clinics in laboratory medicine*. 2011 Mar 1;31(1):87-108.
- Stone ML, Zhao Y, Robert Smith J, Weiss ML, Kron IL, Laubach VE, Sharma AK. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate lung ischemia-reperfusion injury and enhance reconditioning of donor lungs after circulatory death. *Respiratory research*. 2017 Dec;18:1-2.
- Suelzu CM, Conti V, Khalidy Y, Montagna S, Strusi G, Di Lecce R, Berni P, Basini G, Ramoni R, Grolli S. Xenobiotic-free medium guarantees expansion of adipose tissue-derived canine

- mesenchymal stem cells both in 3D fibrin-based matrices and in 2D plastic surface cultures. *Cells*. 2020 Dec 2;9(12):2578.
- Suva D, Passweg J, Arnaudeau S, Hoffmeyer P, Kindler V. In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal stromal cells and transmigrate under them. *Journal of Cellular Physiology*. 2008 Mar;214(3):588-94.
- Szydlak R. Biological, chemical and mechanical factors regulating migration and homing of mesenchymal stem cells . *World J Stem Cells* 2021; 13(6): 619-631 [PMID: [34249231](#) DOI: [10.4252/wjsc.v13.i6.619](#)]
- Tamadon A, Mehrabani D, Zarezadeh Y, Rahmanifar F, Dianatpour M, Zare S. Caprine endometrial mesenchymal stromal stem cell: multilineage potential, characterization, and growth kinetics in breeding and anestrous stages. *Vet Med Int*. (2017) 2017:5052801. doi: 10.1155/2017/5052801
- Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of thoracic surgery*. 2005 Jul 1;80(1):229-37.
- Taroni M, Cabon Q, Febre M, Cachon T, Saulnier N, Carozzo C, et al. Evaluation of the effect of a single intra-articular injection of allogeneic neonatal mesenchymal stromal cells compared to oral non-steroidal anti-inflammatory treatment on the postoperative musculoskeletal status and gait of dogs over a 6-month period after tibial plateau leveling osteotomy: a pilot study. *Front Vet Sci*. (2017) 4:83. doi: 10.3389/fvets.2017.00083
- Taylor A, Sharkey J, Harwood R, Scarfe L, Barrow M, Rosseinsky MJ, Adams DJ, Wilm B, Murray P. Multimodal imaging techniques show differences in homing capacity between mesenchymal stromal cells and macrophages in mouse renal injury models. *Molecular imaging and biology*. 2020 Aug;22:904-13.
- Teffen F, Smolders LA, Roentgen AM, Bertolo A, Stoyanov J. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as autologous therapy in dogs with naturally occurring intervertebral disc disease: feasibility, safety, and preliminary results. *Tissue Eng Part C Methods*. (2017) 23:643–51. doi: 10.1089/ten.tec.2017.0033
- Teshima T, Matsumoto H, Michishita M, Matsuoka A, Shiba M, Nagashima T, Koyama H. Allogenic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate acute hepatic injury in dogs. *Stem cells international*. 2017 Dec 28;2017.

- Textor JA, Clark KC, Walker NJ, Aristizobal FA, Kol A, LeJeune SS, et al. Allogeneic stem cells alter gene expression and improve healing of distal limb wounds in horses. *Stem Cells Transl Med.* (2018) 7:98–108. doi: 10.1002/sctm.17-0071
- Trzil JE, Masseau I, Webb TL, Chang CH, Dodam JR, Liu H, et al. Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study. *J Feline Med Surg.* (2016) 18:981–90. doi: 10.1177/1098612X15604351
- Tucker-Retter EK, Lewbart GA. Corticosterone, Lactate, and Injury Severity as Short-Term and Long-Term Prognostic Indicators in Eastern Box Turtles (*Terrapene carolina carolina*) with Traumatic Injuries Admitted to a Wildlife Rehabilitation Clinic. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery.* 2022 Dec 1;32(4):281-90.
- Tropel P, Noel D, Platet N et al . Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004;295:395 406.
- Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *Iscience.* 2019 May 31;15:421-38.
- Vacanti JP, Otte JB, Wertheim JA. Introduction: Regenerative medicine and solid organ transplantation from a historical perspective. In *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation* 2014 Jan 1 (pp. 1-15). Academic Press.
- Van der Kooy D, Weiss AS. Why stem cells?. *Science.* 2000 Feb 25;287(5457):1439-41.
- Vahsen T, Zapata L, Guabiraba R, Melloul E, Cordonnier N, Botterel F, Guillot J, Arné P, Risco-Castillo V. Cellular and molecular insights on the regulation of innate immune responses to experimental aspergillosis in chicken and turkey poults. *Medical Mycology.* 2021 May;59(5):465-75.
- Villatoro AJ, Hermida-Prieto M, Fernandez V, Farinas F, Alcoholado C, Rodriguez-Garcia MI, et al. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. *Vet Rec.* (2018) 183:654. doi: 10.1136/vr.104867
- Voga M, Adamic N, Vengust M, Majdic G. Stem cells in veterinary medicine—current state and treatment options. *Frontiers in veterinary science.* 2020 May 29;7:278.
- Walmsley JR, Phillips TJ, Townsend HG. Meniscal tears in horses: an evaluation of clinical signs and arthroscopic treatment of 80 cases. *Equine Vet J.* (2003) 35:402–6. doi: 10.2746/042516403776014163
- Wang Z, Shan S, Zhang G, Liang X. (2016). The *Trachemys scripta* genome provides insights into turtle evolution and longevity. *Nature Genetics,* 48(5), 573-578

- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS one*. 2010 Apr 26;5(4):e10088.
- Webb SJ, Zychowski GV, Bauman SW, Higgins BM, Raudsepp T, Gollahon LS, Wooten KJ, Cole JM, Godard-Coding C. Establishment, characterization, and toxicological application of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) primary skin fibroblast cell cultures. *Environmental science & technology*. 2014 Dec 16;48(24):14728-37.
- Wernly B, Mirna M, Rezar R, Prodinge C, Jung C, Podesser BK, et al. Regenerative cardiovascular therapies: stem cells and beyond. *Int J Mol Sci*. (2019) 20:1420. doi: 10.3390/ijms20061420
- Webb TL, Webb CB. Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *J Feline Med Surg*. (2015) 17:901–8. doi: 10.1177/1098612X14561105
- Wilson DS, Tracy CR, Tracy CR. Estimating age of turtles from growth rings: a critical evaluation of the technique. *Herpetologica*. 2003 Jun 1;59(2):178-94.
- Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacology & therapeutics*. 2015 Jul 1;151:107-20.
- Xie J, Wang B, Wang L, Dong F, Bai G, Liu Y. Intracerebral and intravenous transplantation represents a favorable approach for application of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rats. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2016;22:3552.
- Xenopus Genome Consortium. (2010). The *Xenopus laevis* genome sequence. *Nature*, 464(7290), 756-764.
- Yang Y, Chen J, Shang X, Feng Z, Chen C, Lu J, Cai J, Chen Y, Zhang J, Hao Y, Yang X. Visualizing the fate of intra articular injected mesenchymal stem cells in vivo in the second near infrared window for the effective treatment of supraspinatus tendon tears. *Advanced Science*. 2019 Oct;6(19):1901018.
- Yan Q, Ruan JW, Ding Y, Li WJ, Li Y, Zeng YS. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011 Jan 1;63(1-2):151-6.
- Yan Y, Fang J, Wen X, Teng X, Li B, Zhou Z, et al. Therapeutic applications of adipose-derived mesenchymal stem cells on acute liver injury in canines. *Res Vet Sci*. (2019) 126:233–9. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.09.004

Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. FASEB J 2007;21(12):3197-207

Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. Immunology today. 1993 Jan 1;14(3):121-5.

[https://www.anmvioggi.it/images/ACCORDO LINEE GUIDA STAMINALI IN MEDICINA VETERINARIA.pdf](https://www.anmvioggi.it/images/ACCORDO_LINEE_GUIDA_STAMINALI_IN_MEDICINA_VETERINARIA.pdf)

<https://www.omnicalculator.com/biology/cell-doubling-time>