



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Medico-Veterinarie

Ciclo XXVIII

**ISOLAMENTO, COLTURA E CARATTERIZZAZIONE DI
CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DALL'APPARATO
GENITALE DELLA CAGNA**

**ISOLATION, CULTURE AND CHARACTERIZATION OF CANINE
GENITAL TRACT MESENCHIMAL STEM CELLS**

**Coordinatore:
Chiar.mo. Prof. Franco Brindani**

**Tutor:
Chiar.mo Prof. Enrico Bigliardi**

**Dottoranda:
Dott.ssa Valeria de Cesaris**

Sommario

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. CELLULE STAMINALI	6
1.1. Definizione e classificazione	6
1.2. Staminalità e caratteristiche fondamentali di una cellula staminale	7
1.3. Congelamento e crioconservazione	12
1.4. Caratterizzazione molecolare	13
1.5. Cellule staminali embrionali (ESC)	23
1.6. Cellule staminali adulte	25
2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	26
2.1 Generalità	26
2.2 Cellule staminali mesenchimali da tessuti extra-embryonali	27
2.3 Cellule staminali mesenchimali da tessuti adulti	29
2.3.1 Midollo osseo	29
2.3.2 Tessuto adiposo	30
3. MEDICINA RIGENERATIVA ED APPLICAZIONI TERAPEUTICHE IN MEDICINA VETERINARIA	32
4. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ISOLATE DA TESSUTO ADIPOSO ADDOMINALE, TESSUTO ADIPOSO DELLA BORSA OVARICA ED ENDOMETRIO NELLA SPECIE CANINA	36

4.1 Materiali e metodi	36
4.2 Prelievo dei campioni	36
4.3 Isolamento cellulare e coltura primaria	38
4.4 Clonogenicità.....	39
4.5 Differenziazione in vitro	40
4.6 Misurazione della proliferazione (Saggio MTT).....	42
4.7 RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)	43
5. RISULTATI.....	45
DISCUSSIONE.....	60
CONCLUSIONE	65
APPENDICE: ISOLAMENTO, COLTURA E CARATTERIZZAZIONE DI MSC DERIVATE DA ENDOMETRIO CANINO DI SOGGETTI AFFETTI DAL COMPLESSO IPERPLASIA ENDOMETRIALE CISTICA –PIOMETRA (CEH)	66
BIBLIOGRAFIA	97
<i>Ringraziamenti</i>	108

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) can be isolated from a variety of adult animal tissues, replicated *in vitro* and induced to differentiate into different cell lineages. In the dog many districts have been investigated for MSC but never the female genital tract.

In the last decade, progenitor cells isolated from dissociated endometrial tissue, have been the subject of many studies in several animal species. Recently, endometrial cells showing characteristics of mesenchymal stem cells (MSC) have been demonstrated in human, pig and cow uterine tissue samples. The aim of the present study was simultaneously studied the tissue collected from three different sites: ovarian bursa adipose tissue, endometrium and abdominal adipose tissue, used as control.

All isolated cells were able to adhere to plastic support, showed similar fibroblastic-like morphology and ability of subculture; MSC isolated from abdominal adipose tissue and endometrium showed ability to generate colony-forming units, plasticity and expressed specific surface antigens. Conversely cells isolated from ovarian bursa adipose tissue did not express specific surface antigens and did not show ability to generate colony-forming units and plasticity.

Multipotent stromal cells could be isolated from all bitches enrolled in the study (n=7).

The multipotency of cells was demonstrated by their capacity to differentiate into adipocytic, osteocytic and chondrocytic lineages. Clonogenicity and cell proliferation ability were also tested. Furthermore, gene expression analysis by RT-PCR was used to compare the expression of a set of genes (CD44, CD29, CD34, CD45, CD90, CD13, CD133, CD73, CD31 CD105, Oct4) with adipose tissue derived MSC. Stromal cells isolated from uterine endometrium showed similar morphology, ability of subculture and plasticity, and also expressed a panel of genes comparable with adipose tissue

derived MSC. These data suggest that endometrial stromal cells fulfill the basic criteria proposed by the “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” for the identification of mesenchymal stem cells. Although endometrial mesenchymal stem cells (EnMSC) showed a lower replicative ability in comparison to adipose tissue derived MSC, they could be considered a cell therapeutic agent alternative to adipose tissue or bone marrow derived MSC in dog.

INTRODUZIONE

Il tessuto endometriale umano è stato studiato per quasi un secolo e molti ricercatori hanno descritto le tecniche di coltura per l'endometrio umano con vari gradi di successo. Negli animali invece, le cellule epiteliali e stromali ottenute da endometrio sono state studiate nei ratti, nei conigli, nei bovini e nei maiali (Donofrio et al 2008; Fortier et al 1988; McCormack e Glasser 1980; Miernik e Karasinski 2012; Ricketts et al 1983) ma mai nella specie canina.

Dalle colture primarie di tessuto endometriale umano possono essere isolate tre tipologie di cellule: cellule epiteliali, cellule stromali e fibroblasti. Le cellule stromali endometriali sono la tipologia numericamente predominante (Varma et al 1982).

Le cellule stromali mesenchimali multipotenti sono state definite nella maggior parte della letteratura come cellule staminali mesenchimali (MSC) (Brooke et al 2007). Le MSC sono cellule stromali non-ematopoietiche che esprimono la capacità di differenziazione multilineare e sono in grado di differenziarsi in diversi tipi di tessuto, tra cui osso, cartilagine e tessuto adiposo (Pountos e Giannouidis 2005).

Nel cane sono stati studiati molti distretti per la presenza di MSC: tessuto adiposo ottenuto da deposito sottocutaneo, omentale ed inguinali, midollo osseo, muscolo, periostio, sangue del cordone ombelicale e da annessi fetali (Filioli et al 2011; Jang et al 2008; Kisiel et al 2012; Neupane et al 2008; Reich et al 2012).

Lo scopo di questa tesi di dottorato è l'isolamento di MSC derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica e da endometrio nella specie canina, la caratterizzazione della loro plasticità e la valutazione di questi due distretti come fonte di cellule staminali.

1. CELLULE STAMINALI

1.1. Definizione e classificazione

Una cellula staminale è definita come una cellula non specializzata in grado di dividersi per un periodo di tempo indefinito, teoricamente coincidente con la vita di un individuo, (auto-rinnovamento) e, sotto appropriate condizioni e segnali specifici, in grado di differenziare in diversi lineage cellulari, con differenti caratteristiche e funzioni specializzate (differenziazione) (Zomer et al, 2015).

In base al potenziale differenziativo le cellule staminali possono essere classificate come totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti ed unipotenti.

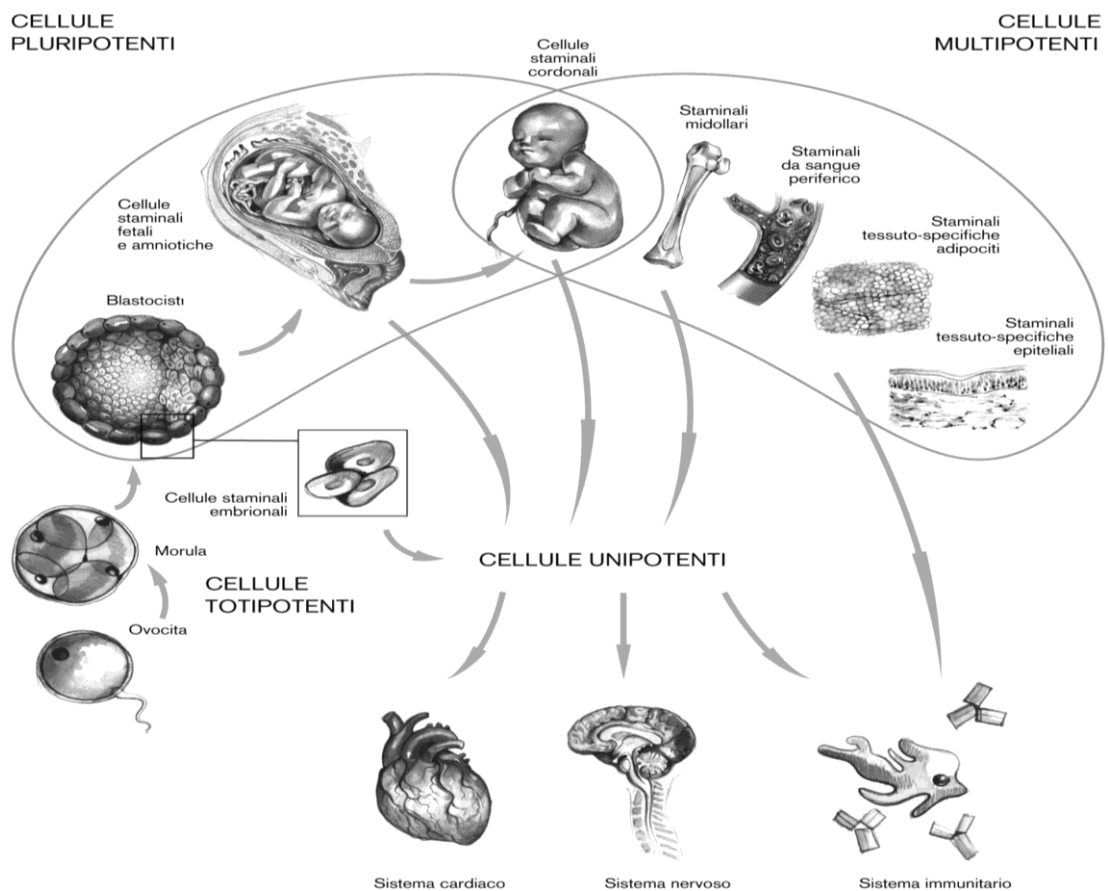


Fig. 1: Fonti di cellule staminali e le loro rispettive potenzialità. (www.accademia-lancisiana.it)

TOTIPOTENTI: le cellule totipotenti costituiscono l'embrione durante i primi stadi di sviluppo (zigote-embrione a 32 cellule). Questo tipo di cellule possono generare tutti i tessuti di un individuo, generano quindi i tre foglietti germinativi (endoderma, mesoderma ed ectoderma) e gli annessi embrionali.

PLURIPOTENTI: analogamente alle cellule totipotenti sono in grado di dare origine ai tre foglietti germinativi ma non agli annessi embrionali. Sono pluripotenti le cellule della massa interna della blastocisti (embrione a 32-64 cellule), rivestita dal trofoblasto, sono dette anche *cellule staminali embrionali*. Queste cellule se coltivate *in vitro* proliferano illimitatamente e opportunamente indirizzate da specifici fattori di crescita possono teoricamente differenziarsi in ogni tipo cellulare.

MULTIPOTENTI: sono cellule maggiormente differenziate rispetto alle precedenti, sono in grado di dare luogo a tutti i tipi cellulari del tessuto di appartenenza. Vengono considerate multipotenti le cellule staminali dell'adulto, come le *cellule ematopoietiche* e le *mesenchimali*.

OLIGOPOTENTI: sono cellule in grado di dar luogo a cellule appartenenti ad un ristretto gamma di linee cellulari (neural stem cells, hair bulge stem cells).

UNIPOTENTI: sono capaci di differenziarsi in un unico tipo cellulare (spermatogonial stem cells)

1.2. Staminalità e caratteristiche fondamentali di una cellula staminale

Caratteristiche delle cellule staminali

La mancanza di un marcatore univoco per le cellule staminali fa sì che queste cellule siano definite tali per le loro proprietà funzionali, tra queste troviamo un elevato

potenziale replicativo, capacità di autorinnovamento attraverso la divisione asimmetrica e la capacità di differenziarsi in una o più linee cellulari (Pittenger et al, 1999).

AUTORINNOVAMENTO

Durante la replicazione asimmetrica ogni divisione di una cellula staminale genera due cellule figlie differenti, una cellula staminale ed una cellula che entra nel percorso di differenziazione che viene definito “amplificazione intransito”. Questo garantisce il mantenimento, nel tessuto, di un numero costante di cellule staminali, uguale a quello di partenza. In base alla prevalenza dei segnali di automantenimento o di differenziazione la divisione di una cellula staminale può avere esito differente e sfociare nella replicazione simmetrica. In questo tipo di replicazione c’è un equilibrio tra le divisioni che generano due cellule figlie uguali tra loro ed in maniera alternata sono due cellule staminali o due cellule chiamate di transito o “differenzianti” che diventeranno due cellule differenziate (Wabik et al, 2015).

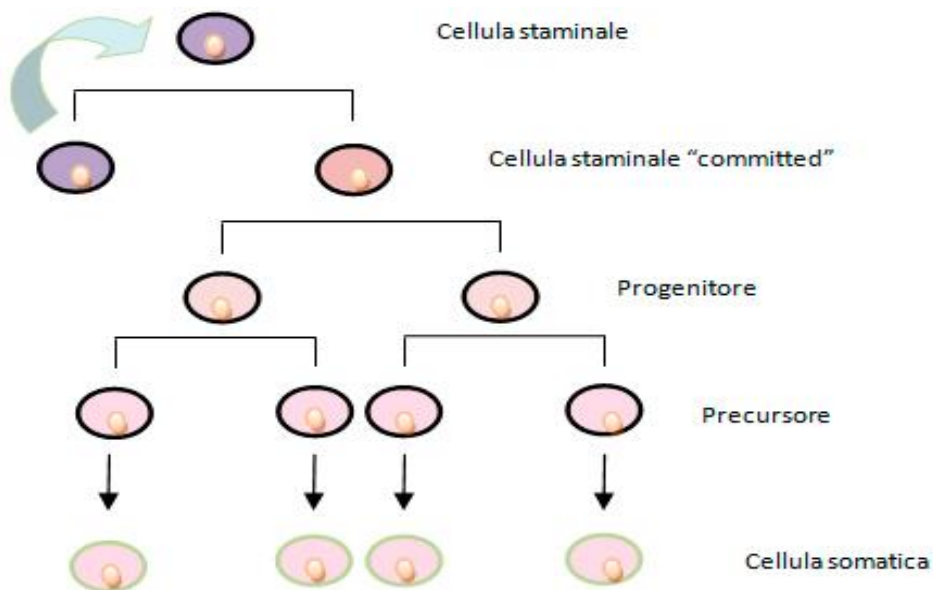


Fig. 2: Divisione asimmetrica delle cellule staminali: originano due cellule figlie, una mantiene la staminalità della cellula madre (autorinnovamento), l'altra differenzia attraverso amplificazione in transito. Tratto da: www.ospedalesanmichele.it

La capacità di differenziazione nelle molte linee cellulari mesenchimali è una componente essenziale del fenotipo delle MSC; generalmente in vitro è valutata la capacità di differenziazione in 3 differenti lineage, osteogenico, condrogenico ed adipogenico.

DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

Il medium induttivo contiene:

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

La colorazione dei lipidi è effettuata mediante coloranti liposolubili ed è basata sulla ripartizione di colore tra il solvente e il lipide. Per le colture cellulari viene usato il colorante Oil Red O che si lega selettivamente alle strutture lipidiche cellulari mentre la successiva colorazione con ematossilina evidenzia i nuclei. Per lo studio della presenza dei lipidi si ricorre a fissazione in formalina o in liquidi contenenti bicromato

e poiché la formalina estrae in una certa misura i lipidi è necessario usare brevi tempi di fissazione e di lavaggio.

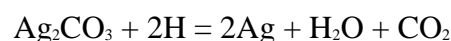
DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENENICO

Il medium induttivo contiene:

- **Acido ascorbico:** funziona come cofattore nell'idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di tutti i tipi di collagene;
- **B-glicerofosfato:** i fosfati organici promuovono la mineralizzazione dal momento che il fosfato viene incorporato nei cristalli di idrossiepatite della matrice.
- **Desametasone:** promuove il differenziamento poiché è un agonista dei glucocorticoidi capace di agire su promotori responsivi dei fattori di trascrizione necessari per il commitment del MCS nel lineage osteogenetico; promuove la calcificazione in vitro.

La colorazione di Von Kossa è usata per quantificare la mineralizzazione nelle colture cellulare e nelle sezioni di tessuti (cioè la presenza di sali di calcio). Il principio alla base di questo metodo è una reazione di sostituzione. Il tessuto è trattato con una soluzione di nitrato d'argento, l'argento cationico presente in soluzione si sostituisce al calcio nel sale originario formando un sale d'argento che viene evidenziato riducendo l'argento ione ad argento metallico.

La reazione è la seguente: $\text{CaCO}_3 + \text{AgNO}_3 = \text{Ag}_2\text{CO}_3 + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$



I sali di calcio in grado di reagire con il nitrato d'argento sono: il carbonato, il fosfato, l'urato, il cloruro, il solfocianato. Poiché il calcio è presente nei tessuti dei mammiferi essenzialmente sotto forma di calcio carbonato e fosfato il metodo è da considerarsi idoneo a rilevarne la presenza (A.F.I.P. 1994; Cameron 1930; McGee-Russel 1958; Von Kossa 1901).

L'alizarina invece è un colorante organico di colore rosso scarsamente solubile in acqua ma è solubile in soluzioni basiche. In condizioni basiche l'alizarina reagisce con il calcio con ottenimento di un colore rosso porpora il cui colore è correlato alla quantità di calcio presente in un campione, di conseguenza oltre che nell'analisi qualitativa del calcio può essere usata, sfruttando tecniche colorimetriche, anche per l'analisi quantitativa.

DIFFERENZIAMENTO CONDROGENICO

Affinché le cellule possano differenziarsi in condrociti devono essere messe in condizioni colturali che mimino la condensazione cellulare che avviene in vivo. Queste condizioni possono essere ricreate in due diversi modi, si possono piastrare le cellule ad alta densità come micro-goccia su piastra oppure si fanno sedimentare le cellule nel fondo conico di una provetta.

Il medium induttivo contiene:

- TGF- β 1: è un fattore di crescita coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare e nel differenziamento ed è importante per la formazione di osso e cartilagine.

- Acido ascorbico: ha la funzione di cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nella molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di collagene.
- Insulina: promuove il differenziamento poiché attiva l'espressione di fattori di trascrizione necessari per il commitment delle MSC nel lineage condrogenetico.
- Poli-lisina: è una poli-cationica che promuove l'interazione tra le cellule.

La produzione delle muco è stabilita con l'aiuto dell'alcian blu.

La reazione Alcian blue è un tipo di colorazione utilizzata per il differenziamento dei mucopolisaccaridi acidi, dei mucopolisaccaridi neutri. L'Alcian Blue è una ftalocianina rameica idrosolubile ed è un colorante cationico che forma legami con i polianioni dei mucopolisaccaridi acidi per mezzo di ponti salini. Questo metodo di colorazione presenta alcuni vantaggi come la forte colorazione, insolubilità e permanenza dei risultati.

1.3. Congelamento e crioconservazione

Questo passaggio è molto importante perché consente di ottenere un elevato recupero delle cellule dopo lo scongelamento, poiché per consentire la sopravvivenza delle cellule sottoposte a congelamento è importante la velocità con cui si abbassa la temperatura. Per la maggior parte delle cellule, la velocità ottimale di raffreddamento è di -1°C al minuto sino al raggiungimento della temperatura di -80°C . Questa velocità consente di preservare le cellule dai danni dovuti all'alterazione dell'equilibrio osmotico ed alla formazione di cristalli di ghiaccio. Una volta raggiunti i -80°C ,

l'acqua presente all'interno ed all'esterno delle cellule è ormai congelata e si può quindi passare allo stoccaggio in azoto liquido. L'utilizzo di crioprotettori (glicerolo, DMSO) permette di minimizzare ulteriormente i danni alle cellule. Inoltre occorre tenere in considerazione un altro fenomeno fisico che si presenta durante il congelamento, la gran parte dell'acqua all'interno delle cellule si trasforma in ghiaccio tra i -2°C ed i -5°C ed il cambio di stato tra la forma liquida e cristallina comporta il rilascio di energia sotto forma di calore che viene chiamato calore di fusione. Se questo aumento di temperatura, talvolta molto rilevante, non viene compensato, si può avere successivamente uno scarso recupero delle cellule. I contenitori contenenti isopropanolo che permettono di ottenere una diminuzione riproducibile di temperatura di -1°C al minuto garantiscono quindi un elevato recupero delle cellule allo scongelamento.

Nel momento in cui occorrerà effettuare lo scongelamento le provette dovranno essere messe subito in bagno alla temperatura di 37°C , una volta scongelate occorre trasferire il loro contenuto in una provetta contenente 8-10 ml di medium per diluire il più possibile il DMSO poiché è tossico per le cellule. Ora è possibile centrifugare per ottenere il pellet, sospendere lo stesso nel medium e seminare le cellule nelle fiaschette.

1.4. Caratterizzazione molecolare

La caratterizzazione molecolare viene eseguita tramite la ricerca di specifiche sequenze di DNA, questo risultato può essere raggiunto utilizzando diverse metodiche:

le più comuni sono la reazione a catena della polimerasi, la citometria a flusso e l'immunoistochimica.

Reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR)

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è un processo di amplificazione che permette di dimostrare la presenza di una sequenza specifica all'interno di una popolazione eterogenea di molecole di DNA.

Per effettuare una PCR è necessario conoscere le estremità della sequenza che si vuole amplificare al fine di poter sintetizzare i primers ad essa complementari che guideranno la sintesi dei nuovi filamenti.

La PCR, quindi è un processo ciclico fatto di tappe che si ripetono molte volte:

1. I filamenti di DNA a doppia elica, sottoposti a riscaldamento, si separano in filamenti singoli (*denaturazione*);
2. Si aggiunge alla soluzione un breve primer sintetizzato artificialmente, insieme ai quattro desossiribonucleosidi trifosfati e alla DNA polimerasi;
3. La DNA polimerasi catalizza la produzione di nuovi filamenti complementari.

Grazie a questo processo, in pochi minuti, un singolo ciclo può raddoppiare la quantità di DNA presente in soluzione e lo riporta allo stato di doppio filamento. La ripetizione del ciclo per molte volte produce una crescita esponenziale del numero di copie della sequenza di DNA che per questo il processo prende il nome di *amplificazione* della sequenza.

La tecnica della PCR richiede la conoscenza delle sequenze di basi all'estremità 3' di ciascun filamento della sequenza bersaglio, in modo da utilizzare il primer

complementare che generalmente ha una lunghezza di 15-20 basi. Data la peculiarità di questa sequenza, nel genoma di un organismo di solito ci sarà una sola regione del DNA a cui potranno legarsi due *primer* di questa lunghezza. Questa specificità, a fronte dell'incredibile diversità del DNA bersaglio, è la chiave funzionamento della PCR (<http://ebook.scuola.zanichelli.it/>).

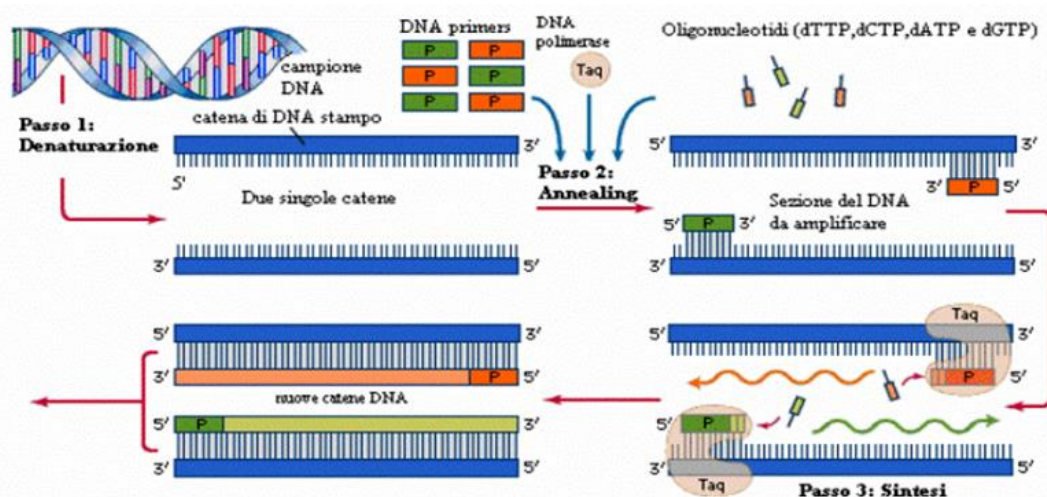
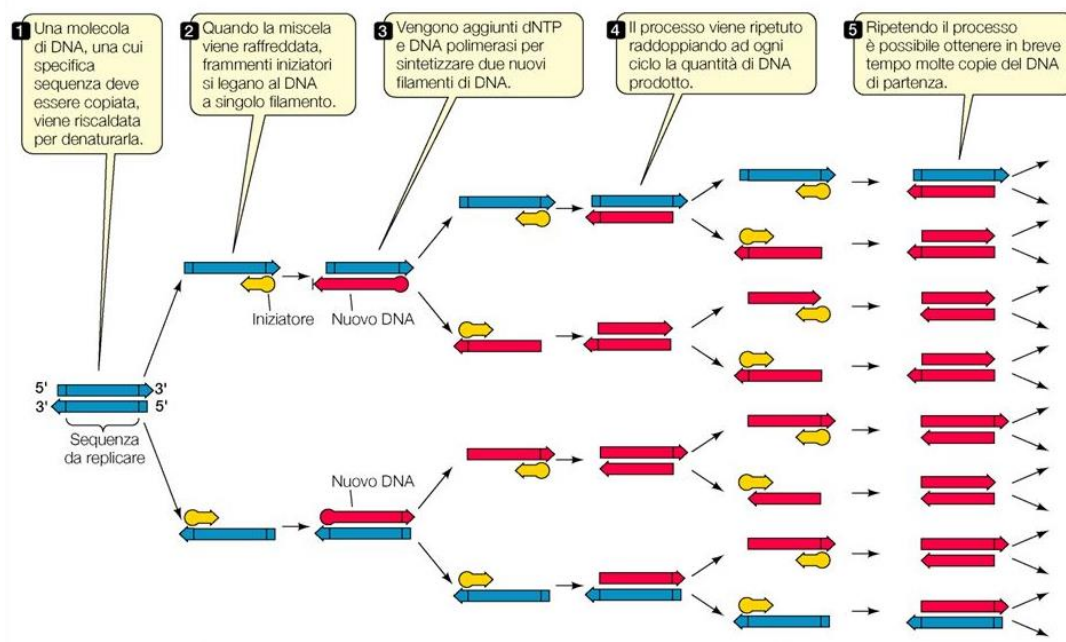


Fig. 3. Meccanismo di funzionamento ed amplificazione della PCR. Tratto da: <http://www.chimicare.org>.

Le 3 tecniche più utilizzate sono:

- PCR convenzionale o tradizionale (RT-PCR): il DNA è amplificato usando una coppia di primers. Il risultato è controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio. Questa permette di separare ed identificare i frammenti di DNA o RNA presenti in un campione in base al loro peso molecolare. I frammenti si muovono nel campo elettrico presente all'interno del gel con velocità diverse a seconda della propria dimensione. Alla miscela viene aggiunto un colorante che emette fluorescenza se esposto a raggi UV che una volta terminata la corsa permette di osservare la posizione relativa raggiunta dei diversi frammenti.

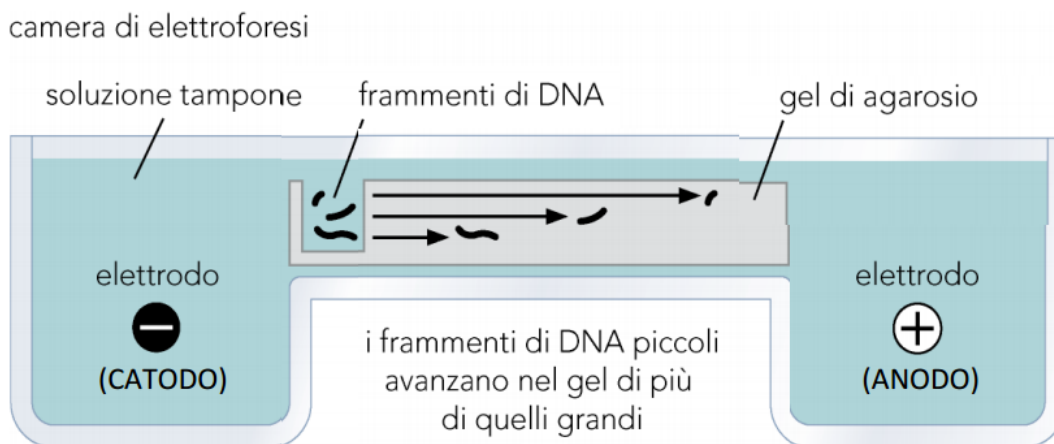


Fig. 4. Elettroforesi su gel di agarosio. Tratto da <http://elettroforesi.weebly.com/>

- PCR “Nested”: è una modificazione della tradizionale è più sensibile ma meno specifica, tende ad aumentare il rischio di risultati falsi positivi (Roura et al, 1999) (Fisa et al, 2001). Questa modificazione consiste in una seconda PCR condotta sui prodotti di una prima PCR usando primer complementari a regioni della stesso segmento di DNA ma più interne rispetto alle regioni

di annealing della prima coppia di primer. E' altamente improbabile che tale coppia di primer possa dare un prodotto di amplificazione se il primo era errato. La presenza di un prodotto di amplificazione dopo la seconda PCR dovrebbe essere segno di specificità della reazione.

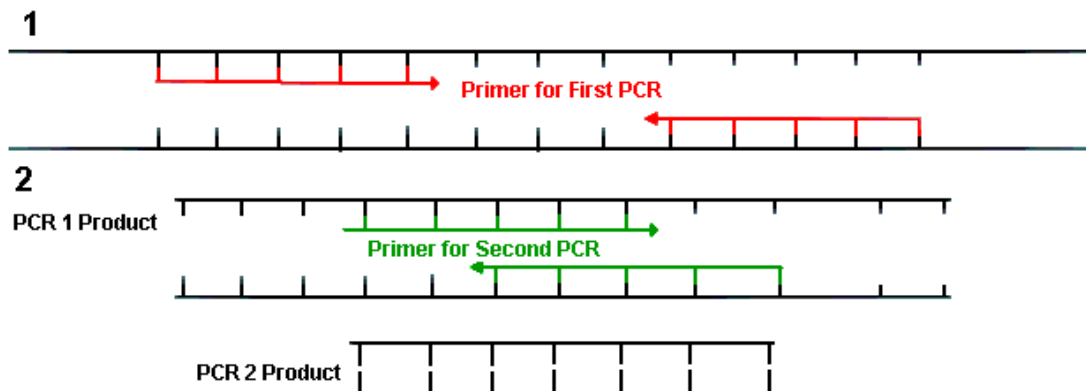
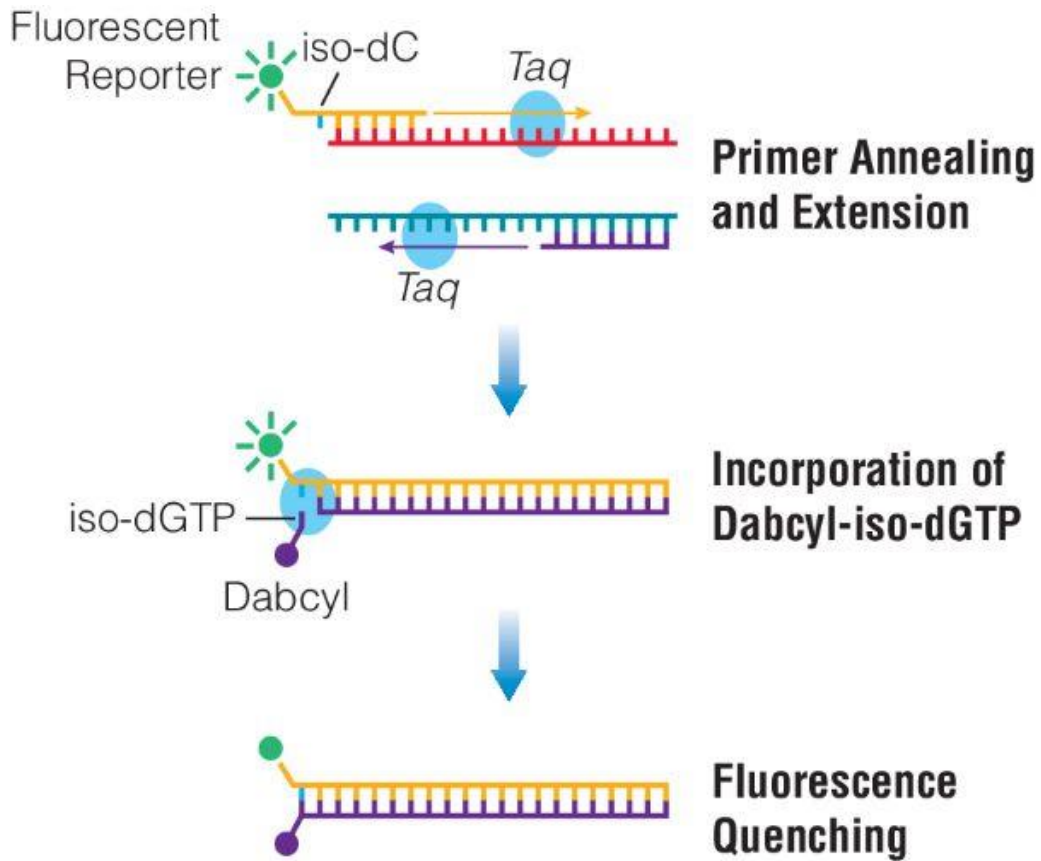


Fig. 5. PCR "nested". Tratto da: <http://www.chimicare.org>.

- PCR "real-time": è denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA. Per prima cosa il DNA è amplificato dalle normali reazioni a catena della DNA-polimerasi ma dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. La fluorescenza incrementerà a ogni ciclo proporzionalmente ed in questo modo l'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando l'incremento di fluorescenza. Ha sensibilità simile alla PCR "Nested" ma è più specifica.



4909MA

Fig. 6. Real-Time PCR. Tratto da www.embed.widencdn.net

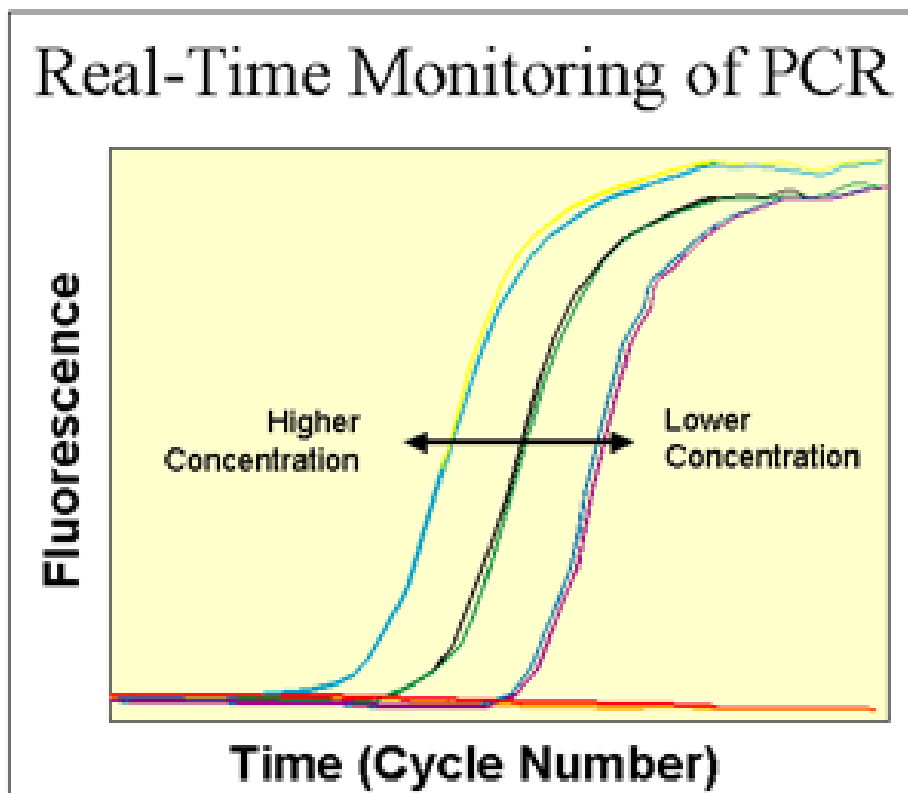


Fig. 7. Curva di quantificazione Real-Time PCR. Tratto da www.dna.utah.edu

Citometria a flusso

La citometria a flusso è, classicamente, la tecnica che permette di misurare le cellule (sospese in un mezzo liquido), ossia calcolarne il numero e alcune caratteristiche fisiche. In un'accezione più moderna, la citometria è la tecnologia che permette di valutare in modo qualitativo e quantitativo le molecole espresse sulla superficie o all'interno della cellula, consentendo un'identificazione precisa del tipo cellulare in esame. Questa tecnica è utilizzata per immunofenotipizzare una vasta gamma di campioni biologici tra cui sangue intero, midollo osseo, fluidi prelevati da cavità sierose, liquido cerebrospinale, urine e tessuti solidi; le caratteristiche che possono essere misurate comprendono la dimensione cellulare, la complessità citoplasmatica, il contenuto di DNA o RNA, ed una vasta gamma di proteine di membrana e proteine intracellulari (Brown and Wittwer, 2000). I parametri biochimici espressi dalla cellula sono qualificati indirettamente per mezzo di marcatori molecolari fluorescenti.

La tecnica è composta da 3 componenti principali: il sistema fluidico che controlla la captazione cellulare ed il flusso cellulare, in questo processo le cellule in sospensione vengono iniettate in singola fila nella camera di flusso; il sistema ottico che interroga le cellule mentre attraversano il raggio laser, ogni singola cellula che attraversa un fascio di luce polarizzata del laser che riflette la luce e genera dei segnali che vengono raccolti, filtrati ed amplificati; ed il sistema elettronico che controlla gli strumenti e raccoglie, raffigura ed analizza i dati, un software che converte i segnali in valori digitali producendo quindi una rappresentazione grafica e statistica (Brown and Wittwer, 2000).

La citometria a flusso multi-color permette di esaminare più marcatori MSC contemporaneamente, e rivelare l'eterogeneità in una popolazione che potrebbe non essere evidente esaminando campioni multipli ma per i singoli marker. Nello specifico,

la citometria a flusso multi-color può rivelare la percentuale di cellule che esprimono i diversi marker tipici delle MSC mentre la citometria single-color può rivelare solo la percentuale di cellule che esprimono il singolo marker (www.rndsystem.com).

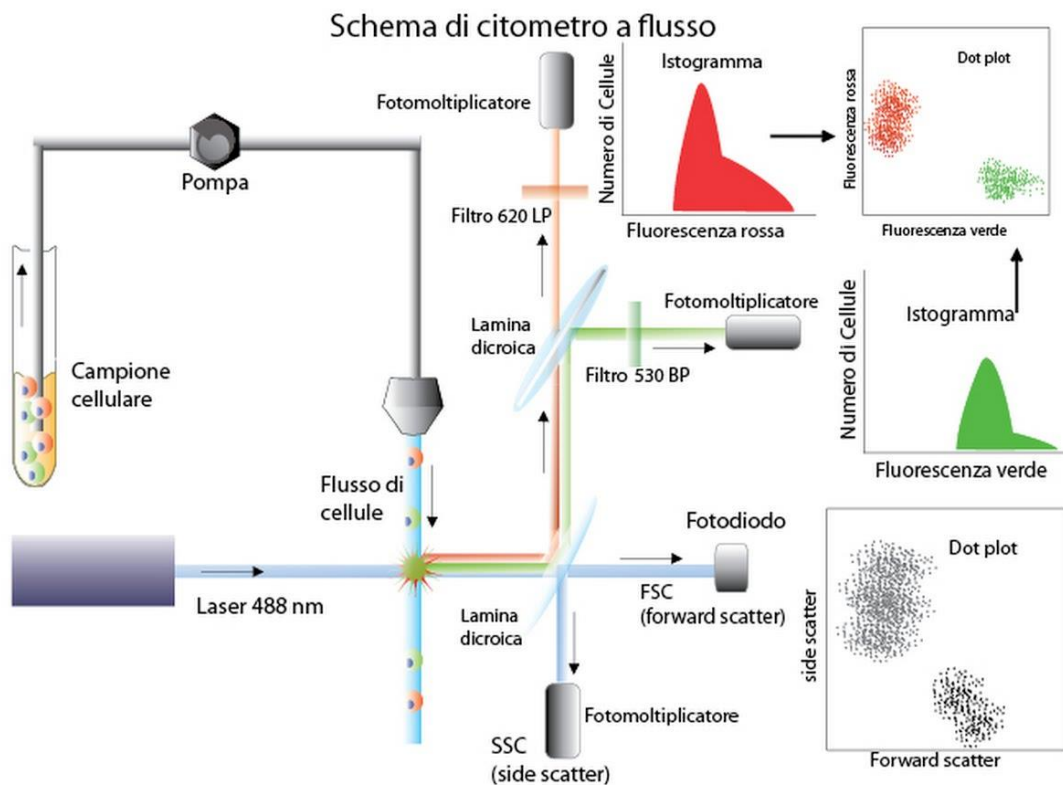


Fig. 8. Schema di citometro a flusso. Tratto da: www.wesapiens.org.

Immunoistochimica

Con i termini immunoistochimica ed immunocitochimica vengono generalmente indicate un insieme di metodologie che per mezzo di anticorpi specifici rendono possibile la visualizzazione di antigeni di varia natura, rispettivamente nei tessuti e nei campioni citologici e similmente alla citometria a flusso, possono essere utilizzate per esaminare il fenotipo cellulare a livello di singola cellula.

La tecnica immunoistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo; l'anticorpo specifico per l'antigene ricercato viene posto su una sezione di

tessuto o su cellule in coltura opportunamente preparate. In questo modo si avrà una reazione immunitaria antigene-anticorpo che sarà successivamente rivelata da un anticorpo secondario coniugato ad un enzima catalizzatore che reagisce con un substrato (cromogeno) formando un prodotto colorato visibile al microscopio ottico. Le reazioni enzimatiche inoltre producono una colorazione permanente che permette la documentazione fotografica anche a distanza di tempo e possono essere combinate con colorazioni istologiche convenzionali per valutare la colorazione specifica nel contesto morfologico (contro-colorazione). Gli enzimi usati più comunemente sono la fosfatasi alcalina, la β -galattosidasi e la perossidasi.

I metodi di immunistochemica utilizzati per localizzare l'antigene possono essere diretti, fare uso di coniugati (indiretti).

Nelle metodiche dirette si utilizza un unico anticorpo diretto contro la molecola da ricercare e questo stesso anticorpo lega una sostanza colorata che ne permette la visualizzazione. Nelle metodiche indirette si utilizzano due anticorpi: il primo diretto contro la molecola da ricercare, il secondo, coniugato con la sostanza colorata, andrà a legarsi al primo anticorpo. La molecola da ricercare nella sezione di tessuto in esame viene riconosciuta da un anticorpo prodotto da un animale immunizzato contro quella molecola. Nelle metodiche indirette è necessario che il secondo anticorpo provenga da specie differenti da quella da cui è stato prodotto il primario perché altrimenti non sarebbe riconosciuto come antigene. In queste metodiche l'anticorpo primario diventa l'antigene che deve essere riconosciuto dall'anticorpo secondario.

L'immunistochemica multicolor invece consente di evidenziare l'eterogeneità in una popolazione cellulare che altrimenti potrebbe non essere rilevata effettuando la colorazione delle cellule per i singoli marcatori delle MSC (www.rndsystems.com).

Altre tecniche immunologiche simili per la colorazione dei vetrini allestiti con sezioni di tessuto sono; l'immunofluorescenza che usa Ig marcate con fluorocromi anziché con un enzima e come per l'immunoistochimica è possibile utilizzare il metodo diretto o quello indiretto; la coniugazione degli anticorpi con sostanze radioattive, questa tecnica ormai viene poco usata poiché le metodiche chimiche sono più sensibili, meno pericolose ed inoltre non richiedono personale specializzato nel maneggiare radioisotopi; e per la microscopia elettronica è possibile coniugare le Ig con particelle di oro colloidale che al microscopio elettronico risultano radiopache, ma anche questa tecnica è poco usata.

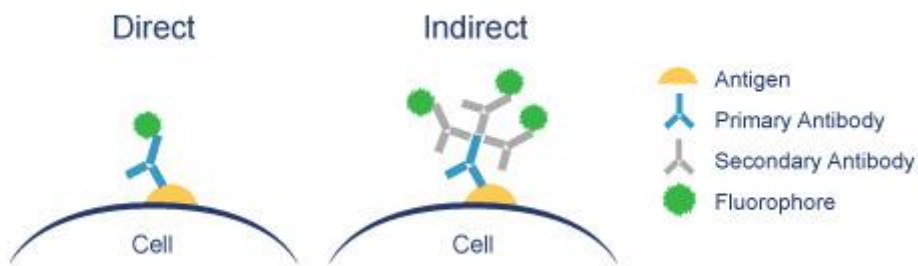


Fig. 9. Schema a confronto della tecnica diretta ed indiretta per l'immunofluorescenza. Tratto da: <http://www.abcam.com/>.

1.5. Cellule staminali embrionali (ESC)

Costituiscono la massa cellulare costituiscono la massa cellulare interna della blastocisti la quale durante l'embriogenesi dà origine a due strati cellulari distinti, l'epiblasto e l'ipoblasto; mentre il primo si differenzia nei tre classici foglietti embrionali (endoderma, mesoderma, ectoderma) dal secondo origina il sacco vitellino (Bajada et al 2008).

La caratteristica più interessante delle ESC, che rende le cellule staminali embrionali particolarmente adatte all'uso terapeutico, è la loro capacità di differenziarsi, in specifiche condizioni di coltura, in quasi tutti i tipi cellulari dell'organismo e per questo sono definite cellule pluripotenti. Inoltre, *in vitro*, utilizzando fattori per prevenire la differenziazione possono essere espanse nelle quantità desiderate senza perdita di pluripotenza a capacità di autorinnovamento (Gianaroli et al 2009; Zomer et al 2015).

Tuttavia in medicina la loro applicazione è pressoché stata accantonata a seguito delle notevoli implicazioni etiche che accompagnano l'impiego di tali cellule dovute alla distruzione della blastocisti per il loro isolamento (Towns et al 2004).

Cellule staminali fetali

Le cellule staminali fetali si trovano negli stadi tardivi dell'embrione e nel feto e vengono ricavate da aborti naturali (nella specie umana) o indotti (in campo veterinario). Queste cellule sono multipotenti e possiedono caratteristiche intermedie tra le cellule staminali embrionali e le cellule staminali adulte.

Similmente alle staminali embrionali sono caratterizzate da una proliferazione elevata, poiché devono creare un tessuto ex novo e non mantenerlo; e come le staminali adulte

sono specializzate nella creazione di un tessuto, quindi non occorrono interventi esterni per “convincerle” a produrre un determinato tipo di cellule. Il loro utilizzo non presenta problemi etici in quanto per reperirle si possono utilizzare i feti abortiti spontaneamente (<http://www.staminafoundation.org/>).

1.6. Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte (ASC) sono cellule indifferenziate collocate in particolari “nicchie ambientali” presenti in diversi tessuti/organi il cui ruolo principale è quello di mantenere l’integrità del tessuto di residenza. Questi tipi di cellule sono presenti in particolare modo nei tessuti con turnover cellulare molto elevato; infatti il tasso di proliferazione delle cellule staminali in un tessuto adulto è correlato al tasso di perdita delle cellule differenziate che lo costituiscono (Wabik et 2015).

Le ASC sono cellule che possiedono già un certo grado di differenziazione e di conseguenza sono caratterizzate da una inferiore plasticità differenziativa rispetto alle cellule staminali embrionali.

All’interno di questa categoria (cellule staminali adulte) rientrano anche le cellule staminali mesenchimali (MSC) che possono essere isolate da tessuti come il midollo osseo, il sangue cordonale, il muscolo scheletrico ed il tessuto adiposo (Uzbas et al 2014).

2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

2.1 Generalità

Costituiscono una popolazione residente nei tessuti mesenchimali, capace di differenziare in cellule del tessuto adiposo, del tessuto cartilagineo, del tessuto osseo e nello stroma che supporta l'ematopoiesi.

I criteri originali utilizzati per identificare le MSC prevede loro capacità di aderire a substrati in plastica, la capacità di sostanziale espansione clonale e la capacità di differenziarsi nelle varie lineage (Steward and Steward, 2011).

L'aderenza della coltura di MSC alla plastica è una caratteristica cellulare molto aspecifica, di conseguenza l'adesione non esclude che possano aderire contemporaneamente differenti sottopopolazioni di cellule.

La capacità di proliferazione è la base per l'isolamento di routine delle MSC mediante espansione clonale in vitro; nei campioni biologici prelevati per l'isolamento MSC potrebbero essere inclusi tipi di cellule più differenziate che sono in grado di contribuire alla popolazione cellulare aderente, effettuando più passaggi in vitro queste popolazioni vanno perse man mano, di conseguenza nella preparazione finale si avrà una predominanza di cellule staminali.

Sebbene le MSC siano in grado mantenere una considerevole divisione cellulare, questa capacità non è illimitata; in vivo, le cellule staminali adulte si trovano in uno stato quasi di riposo, al contrario l'espansione in vitro costituisce per le MSC un aumento marcato e sostenuto nella proliferazione, con conseguente senescenza replicativa. La velocità e la persistenza della proliferazione sembra variare

sia tra i diversi tessuti e sia tra le diverse sedi anatomiche dello stesso tessuto. In generale, progenitori derivate dal midollo osseo hanno capacità inferiore proliferativa di cellule staminali mesenchimali derivate da altri tessuti.

Nelle MSC la senescenza replicativa è associata ad una perdita di multipotenza ed influenza la capacità critica delle cellule staminali per la sede dei siti di lesione e infiammazione. Questo fenomeno è fondamentale per le applicazioni che richiedono una vasta espansione ex vivo MSC prima del reimpianto. L'insorgenza e gli effetti della senescenza replicativa possono essere attenuati espandendo le MSC in presenza del fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF2), il quale è ormai viene aggiunto di routine al MSC media. La crescita in condizioni di coltura ipossiche può anche accelerare la proliferazione delle cellule staminali, mentre l'espansione in terreno di coltura con contenuto ridotto di glucosio riduce l'apoptosi delle MSC ed aumenta la formazione delle colonie e le loro dimensioni (Steward and Steward, 2011).

2.2 Cellule staminali mesenchimali da tessuti extra-embryonari

Cellule staminali placentari

Le cellule staminali placentari possono essere estratte dai villi coriali placentari o da altri frammenti placentari (Igura et al, 2004). Il vantaggio di utilizzare la placenta come fonte cellulare è che contiene diverse linee cellulari, come il lignaggio ematopoietico che proviene dal corion, allantoide e sacco vitellino e il lignaggio mesenchimale che proviene dal corion e amnios (Antoniadou, David 2016)

Le cellule staminali dei villi coriali sono staminali mesenchimali con prospettive applicative in medicina rigenerativa, avendo buone capacità riproduttive e ottima stabilità genomica (Igura et al, 2004). È possibile conservare le cellule staminali

presenti in un frammento dei villi coriali prelevati durante l'esecuzione della villocentesi oppure da un frammento di placenta prelevato subito dopo il parto: in entrambi i casi una cellula staminale originata da villo coriale conserva le proprie capacità riproduttive tipiche delle staminali embrionali insieme alla stabilità genomica delle cellule staminali adulte ed all'assenza di complicazioni etiche (Fauza 2004; Igura et al, 2004)

Cellule staminali da liquido amniotico

Sono le cellule staminali che provengono dal liquido amniotico e possono essere ottenute tramite amniocentesi (la procedura viene effettuata per via eco-guidata durante la gestazione). Queste cellule hanno caratteristiche biologiche molto simili alle cellule staminali embrionali, ma non presentano le controindicazioni di tipo etico legate alla distruzione dell'embrione.

Sono molte le patologie per le quali è prevista l'applicazione sull'uomo delle cellule staminali amniotiche e vanno dalle malattie della retina, al diabete, alle malattie degenerative, alla chirurgia ricostruttiva, alle malattie genetiche (Loukogeorgakis, De Coppi 2016; Kaviani et al, 2001; Walther et al, 2009; Siegel et al, 2008; Steigman et al, 2008; Abdi et al, 2008; Centeno et al, 2008; Caplan 2009; Antonucci et al, 2016). Inoltre è stato dimostrato che le cellule staminali amniotiche possono ridiventare cellule staminali embrionali, con tutte le loro caratteristiche biologiche ma senza i problemi etici e di stabilità genomica delle embrionali stesse (Kaviani et al, 2003; De Coppi et al, 2007; Slamecka et al, 2015)

Cellule staminali da sangue cordonale

Il sangue residuo della placenta e del cordone ombelicale costituisce una fonte alternativa al midollo osseo di cellule progenitrici ematopoietiche (cellule staminali da cui originano tutte le cellule del sangue) e di cellule staminali emopoietiche adulte.

Dal 1988 queste cellule staminali da cordone ombelicale sono impiegate, oltre alle malattie ematologiche, in molti ambiti della medicina rigenerativa ed attualmente sono in fase di sperimentazione studi clinici prevalentemente nel campo dei disturbi neurologici, tra cui paralisi cerebrale, l'autismo, encefalopatia ipossico-ischemica, ictus e perdita di udito (Chow et al, 20016).

Il sangue è raccolto dal cordone ombelicale, sia in caso di parto spontaneo che di taglio cesareo, effettuando il prelievo dalla vena ombelicale. Una volta raccolto, viene calcolato il volume e la quantità di globuli bianchi e se risponde ai requisiti minimi richiesti viene conservato in banche pubbliche ed utilizzato per l'uso allogenico.

2.3 Cellule staminali mesenchimali da tessuti adulti

2.3.1 Midollo osseo

La presenza di cellule non ematopoietiche nel midollo osseo fu suggerito per la prima volta circa 130 anni fa da un patologo tedesco, Cohnheim, il quale ipotizzò che il midollo osseo potesse essere una risorsa di fibroblasti implicati nella riparazione di numerosi tessuti periferici (Schipani e Kronenberg 2009).

L'evidenza definitiva della presenza nel midollo osseo adulto di cellule aderenti in grado di crescere in forma di fibroblasti e di differenziare in vari elementi mesenchimali, si deve ai lavori della metà degli anni '60-'70 che dimostrarono prima come il midollo osseo di roditori contenesse cellule fibroblastoidi in grado di formare

colonie se coltivate *in vitro*. E poi come queste cellule una volta impiantate sotto cute fossero in grado di formare tessuto osseo o ricostruire il microambiente ematopoietico (Friedenstein e Petrokova 1966; Friedenstein et al 1976).

Inizialmente Friedenstein e Owen chiamarono queste cellule “cellule staminali osteogeniche” o “cellule stromali del midollo osseo” e successivamente Caplan introdusse il termine “cellule staminali mesenchimali” riferendosi a cellule progenitrici adulte del midollo osseo con proprietà simili ossia l’aderenza alla plastica, la capacità di formare CFU a partire da una singola cellula e la capacità *in vivo* di differenziarsi verso lignaggi scheletrici.

Tutt’oggi però l'utilizzo di MSC derivate da midollo osseo è limitato principalmente a causa di due problematiche: la procedura invasiva del prelievo di midollo e l'esiguo numero di cellule staminali che si ottengono da ogni prelievo (Harvey et al 2007). Questo ha fatto sì che fosse necessaria la ricerca di nuove fonti.

2.3.2 Tessuto adiposo

Il tessuto adiposo rappresenta nei vertebrati il principale deposito di trigliceridi, molecole che possiedono elevata quantità di energia e che vengono immagazzinate negli adipociti. L’adipogenesi, cioè il processo differenziativo che porta alla formazione di adipociti maturi a partire da precursori, inizia nel periodo fetale e prosegue nel corso della vita adulta. Nel tessuto adiposo è nota la presenza di cellule staminali, esse sono contenute nella frazione stromale vascolare.

Al contrario del midollo osseo che può essere ottenuto solo in quantità limitata, il tessuto adiposo normalmente può essere ottenuto in abbondanza ed inoltre a parità di

volume lavorato è possibile ottenere un numero di MSC da 100 a 300 volte superiore rispetto al midollo osseo (Fraser et al 2006).

Le MSC da tessuto adiposo rappresentano quindi una valida alternativa a quelle derivate da midollo osseo, potendo essere ottenute rapidamente ed in numero elevato mediante digestione enzimatica con collagenasi (Dicker et al 2005). Queste cellule esprimono i markers di superficie stabiliti dalla International Society for Cytotherapy, ma è stato dimostrato come alcune di queste molecole siano maggiormente espresse con l'aumentare dei passaggi di coltura *in vitro*: infatti l'espressione di CD44, CD29, CD73, CD90 e CD105 al passaggio di coltura P4 raggiunge il 90% (Gronthos et al 2001; Katz et al 2005). Altri markers invece, come quelli ematopoietici quali CD11, CD14, CD35 e CD44 che si riducono o vengono persi con l'aumentare dei passaggi colturali, portano alla selezione di una popolazione cellulare omogenea (Puissant et al 2005).

3. MEDICINA RIGENERATIVA ED APPLICAZIONI TERAPEUTICHE IN MEDICINA VETERINARIA

La medicina “rigenerativa” è quella branca della medicina che ha come scopo quello di riparare organi o tessuti danneggiati da malattie, traumi oppure dal “semplice” invecchiamento. L’obiettivo finale quindi è quello di ripristinare la funzionalità di questi organi/tessuto o quantomeno di migliorarla.

Con il termine “Medicina rigenerativa” viene dunque identificato l’insieme delle ricerche e delle terapie che, nel perseguire l’obiettivo della rigenerazione, utilizzano le cellule staminali o altri approcci quali l’uso di molecole solubili, la terapia genica, l’ingegneria tissutale e la riprogrammazione cellulare, che stimolano e supportano le capacità di auto-guarigione intrinseche dell’organismo (Daar et al 2007).

La medicina rigenerativa è oggi all’inizio del suo percorso e le attese nel futuro sono grandissime, ma già oggi patologie fino ad ora incurabili hanno dimostrato di rispondere a questo tipo di terapia ed i risultati clinici ottenuti sono di notevole interesse (Caplan et al 2015).

Come in medicina umana, diversi protocolli terapeutici in medicina veterinaria usano le MSC per le malattie non-ematopoietiche. In campo clinico, patologie dell’apparato muscolo-scheletrico (tendiniti, osteoartriti, artrosi del gomito, displasia dell’anca), ma anche rigenerazione dei tessuti molli (guarigione delle ferite) o malattie dermatologiche (dermatite atopica) sono i principali campi di applicazione di queste terapie (Black et al 2008; Marx et al 2014; Marx et al 2015; Uzbas et al 2015; Zubin et al 2015). Inoltre, soprattutto nel cane le applicazioni di MSC riportate dalla letteratura scientifica relative a patologie sperimentali, hanno interessato anche ambiti

non ancora coperti dalle applicazioni cliniche (ossia pazienti in cui la patologia si è sviluppata spontaneamente), come la rigenerazione dei tessuti cardiaci o del tessuto nervoso (Marx et al 2015).

Le funzioni principali delle MSC associate ai loro effetti terapeutici sono 3: il turnover tissutale attraverso la differenziazione multipotente, gli effetti antiinfiammatori ed immunomodulatori e la secrezione di molecole che inducono od assistono la riparazione tissutale (attività paracrina) (Waszak et al 2012; Lavoie et al, 2013; Du et al 2013).

Inoltre le MSC mostrano la capacità di fare “homing”, cioè mostrano la capacità di migrare spontaneamente verso i siti di lesione e di conseguenza possono contribuire alla riparazione del tessuto anche quando non sono iniettate direttamente in situ. Questa caratteristica è stata ben documentata in vari modelli di patologie (Liang et al, 2014).

Precedentemente, a partire dal 1995 diversi studi tra cui Caplan et al (2006) avevano riportato che MSC ottenute da diverse fonti, sia autologhe che allogene, sono state iniettate in tessuti come il cuore o somministrate mediante infusione venosa ed è stata osservata la loro tendenza a localizzarsi nei tessuti siti di lesione con presenza di vasi sanguigni lesi o infiammati.

Per ottenere la riparazione dei tessuti utilizzando le MSC possono essere utilizzate due strategie differenti. La prima opzione è quella di usare MSC amplificate in coltura nel loro stato indifferenziato. In risposta ai segnali ambientali locali, le MSC subiranno poi la differenziazione nella opportuna lineage cellulare e che sarà responsabile del processo di rigenerazione dei tessuti. In alternativa, le MSC amplificate possono

essere differenziate in linee specifiche prima dell'impianto, accelerando così il processo di guarigione (Kadiyala et al, 1997).

USO AUTOLOGO

Per uso autologo delle MSC si intende il trapianto di cellule staminali appartenenti allo stesso soggetto in cui quindi il donatore coincide con il ricevente.

Il principale vantaggio dell'uso di una preparazione autologa è che non implica alcun problema di compatibilità in quanto le cellule trapiantate vengono riconosciute come "self" dal sistema immunitario dell'ospite senza quindi dare adito a fenomeni di rigetto. Invece il principale svantaggio consiste nel fatto che la terapia non può essere somministrata al conferimento del paziente dal medico essendo necessaria la preparazione delle cellule (Marx et al, 2015)

USO ALLOGENICO

Sfruttando le proprietà immunoregolatrici ed immunosoppressive delle MSC queste cellule possono essere impiegate anche per l'uso allogenico; in questo caso le cellule vengono isolate ed amplificate a partire da soggetti diversi (donatori) rispetto a quelli su cui verranno utilizzate per la terapia (riceventi).

Questo dà la possibilità di conservare le cellule fino al momento dell'utilizzo, l'applicazione di una terapia allogenica ha quindi il vantaggio di permettere l'utilizzo di MSC specie-specifiche crioconservate (Marx et al, 2015).

Al contrario della terapia autologa in questo caso vi è l'eventuale rischio di trasmissione di malattie dal donatore al ricevente.

In Italia però, la normativa però non prevede la possibilità somministrazione della terapia allogenica in campo veterinario se non all'interno di progetti sperimentali

autorizzati dal ministero (Accordo Governo-Regioni e Province di Trento e Bolzano,
17 ottobre 2013).

4. ISOLAMENTO, DIFFERENZIAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ISOLATE DA TESSUTO ADIPOSO ADDOMINALE, TESSUTO ADIPOSO DELLA BORSA OVARICA ED ENDOMETRIO NELLA SPECIE CANINA

4.1 Materiali e metodi

All'interno del mio studio sono state incluse 7 cagne intere i cui proprietari hanno richiesto l'intervento di ovarioisterectomia, per l'inserimento nello studio era obbligatoria la firma di un apposito consenso informato.

Criteri di inclusione dei soggetti: essere primipara o nullipara in fase del ciclo diestrarre terminale (dal 30° al 50° giorno del ciclo estrale), avere un'età compresa tra 1 e 3 anni, essere clinicamente sane, avere un peso compreso tra 10 e 30 kg ed avere valori degli esami emato-biochimici nella norma.

Tutte le cagne arruolate nello studio si trovavano nella fase diestrarre terminale del ciclo, con un livello di progesterone inferiore a 2 ng/ml. Di conseguenza, anche se questo momento coincide con l'inizio della fase anestrarre, tutti i soggetti si trovavano alla fine della fase progestinica e di conseguenza con profilo endocrino omogeneo.

4.2 Prelievo dei campioni

Anestesia

Ogni soggetto è stato sedato mediante somministrazione intramuscolare di butorfanolo (0,2 mg/kg, Dolorex®, MSD Animal Health, Germania) e dexmedetomidina (25 mg/kg, Dexdomitor®, Orion Corporation). La fluido terapia

di mantenimento è stata effettuata somministrando Ringer lattato (50 ml/kg/die EV) attraverso un catetere venoso posizionato nella vena cefalica. Come profilassi antibiotica preoperatoria è stata somministrata cefazolina (30 mg/kg, EV), mentre per l'analgesia preventiva è stato somministrato robenacoxib (2 mg/kg Onsior®, SC). Successivamente l'anestesia generale è stata indotta con propofol (2 mg/kg Rapinivet®, Schering-Plough SpA, UK) e mantenuta con isofluorano 2% (ISOFLO®, Esteve Spa, Italia).

Chirurgia

Inizia con l'incisione della cute e del sottocute sul piano mediano, prosegue con incisione dei muscoli dell'addome a livello della linea alba e per ultimo il peritoneo. A questo punto, si procede all'esteriorizzazione delle ovaie. I peduncoli ovarici sono stati legati con filo EP 3.5 o 4 assorbibile multifilamento polyglactin 910 (Vicryl®, Ethicon Inc., Johnson & Johnson, Belgio), e le ovaie sono state isolate; sull'utero è stata eseguita una legatura a livello cervicale sempre con filo EP 3,5 o 4 assorbibile multifilamento polyglactin 910 (Vicryl®, Ethicon Inc., Johnson & Johnson, Belgio). L'utero e le ovaie sono quindi state rimosse.

La ricostruzione della parete addominale è stata eseguita in accordo con le tecniche standard, ed è stata realizzata una sutura per piani con EP 3,5 o EP 4 assorbibile multifilamento polyglactin 910 (Vicryl®, Ethicon Inc., Johnson & Johnson, Belgio). L'intervento è stato eseguito in 30 minuti.

All'interno della sala chirurgica, subito dopo la rimozione del tratto genitale, sono stati raccolti i campioni della porzione centrale del corno uterino (lunghezza di circa 2 cm) e la borsa ovarica. Inoltre, durante laparotomia, un campione di tessuto adiposo addominale di origine omentale è stato raccolto da ciascun soggetto. I tre campioni di

tessuto sono stati conservati in separate Falcon da 50 ml contenenti tampone fosfato salino (PBS) sterile e processati entro 1 ora dal prelievo. Tutti i campioni raccolti non pesavano più di 5 gr ciascuno. L'isolamento e colture cellulari sono stati preparati dai tessuti derivati da sette animali. La crescita cellulare, fenotipo cellulare e capacità di differenziazione sono stati analizzati per ciascun animale.

4.3 Isolamento cellulare e coltura primaria

Per ciascun campione tutte le procedure sono state eseguite cappa a flusso laminare al fine di conservare il campione e prevenire contaminazioni. Ogni campione è stato quindi pesato per raccogliere due grammi di tessuto i quali sono stati sminuzzati con una lama di bisturi. Successivamente, il tessuto è stato immerso in soluzione digestiva sterile (5 ml per g di tessuto), preparata sciogliendo 75 mg di collagenasi I in DMEM senza siero supplementato con 50 IU/ml di penicillina, 50 mg/ml di streptomina e 2,5 ug/mL di amfotericina B (Gibco®, UK).

Dopo 1,5 h di incubazione in agitazione a 37°C, la sospensione cellulare è stata filtrata con un filtro di nylon sterile da 40 micron (Fisher Scientific®) per rimuovere il materiale non digerito e successivamente è stata centrifugata a 210 g per 10 min. Il pellet risultante è stato risospeso in un medium di mantenimento contenente DMEM, 10% siero fetale bovino (FBS), 100 IU/ml di penicillina, 100 ug/ml di streptomina, 100 ug/ml di gentamicyn e 2,5 mg/ml di amfotericina B (Gibco®, UK). Dopo l'isolamento, ogni campione è stato seminato in due fiaschette (25 cm²). Tutte le colture sono state mantenute in un incubatore a 37°C con 5% di CO₂.

Le colture cellulari sono state osservate due volte al giorno con un microscopio invertito a contrasto di fase (Olimpus IX50).

Il medium è stato rimosso ed è stato aggiunto terreno fresco solo quando le singole cellule si erano chiaramente attaccate. Dopo questa fase il medium di coltura è stato cambiato ogni 48-72 ore finché le cellule hanno raggiunto il 90% di confluenza (circa 10 giorni). A questo punto il medium di coltura è stato rimosso e sostituito con un piccolo volume di PBS sterile riscaldato. Successivamente al lavaggio PBS, le cellule sono state staccate dal fondo delle fiaschette con una soluzione di tripsina-EDTA allo 0,05%.

Le cellule così ottenute sono state contate usando l'emocitometro (camera di Burkner) e seminate nuovamente a 5000 cellule/cm². Una porzione è stata amplificata a P3, mentre un'ulteriore porzione è stata congelata e conservata in azoto liquido. La crioconservazione delle cellule è stata effettuata in azoto liquido dopo la sospensione delle cellule ad una densità di 1x10⁶ cellule/ml in medium di congelamento costituito da 10% DMSO, 20% FBS, 70% DMEM.

Cellule a P3 sono stati usati per misure di proliferazione cellulare, differenziazione e la capacità di espressione genica mediante RT-PCR.

4.4 Clonogenicità

Per questo test le cellule sono state seminate in piastre da sei pozzetti ad una densità di 50 cellule/pozzetto. Le cellule sono state poi coltivate per 9 giorni in medium di mantenimento che è stato cambiato ogni 48-72h. Le piastre sono state esaminate al microscopio tutti i giorni; al giorno 9 le unità formanti colonie (CFU) formatesi sono state fissate con formaldeide al 10% per 30 min e poi lavate con PBS. La morfologia delle colonie è stata valutata dopo aver effettuato la colorazione ad ematosilina di Mayer. I CFU sono stati quindi contati considerando come colonie gli aggregati

formati da più di 50 cellule. Questo esperimento è stato condotto con cellule a P3 su tutti e sette i soggetti.

4.5 Differenziazione in vitro

Differenziazione adipogenica in vitro

Le cellule sono state piastrate ad una densità di 2 a $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ e sono state portate a 80% di confluenza con di mantenimento, a questo punto sono state incubate in un medium adipogenesi-induttore (AIM) (DMEM, 10% FBS, 0,05 U/mL di penicillina, e 0,05 mg/ml di streptomina, $1 \mu\text{M}$ desametasone, 0,2 mM indometacina, $1,7 \mu\text{M}$ insulina, 0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina) per 3 giorni. Successivamente sono state incubate 1 giorno in medium di mantenimento adipogenico (AMM) (DMEM, 10% FBS, 0,05 U/ml di penicillina, e 0,05 mg/ml di streptomina, $1,7 \mu\text{M}$ insulina) e poi mantenute nuovamente con AIM. Dopo il terzo ciclo, le cellule sono state alimentate con AMM per un massimo di 21 giorni di differenziazione (Giovannini et al, 2008). La differenziazione adipogenica è stata confermata al giorno 21 tramite il rilevamento intracellulare di vacuoli ricchi di lipidi colorabili con la metodica Oil Red O (Sigma®). Per questa colorazione, le cellule sono state fissate con formaldeide al 10% per 30 minuti, lavate con PBS, e colorate con una soluzione 0,16% Oil Red O per 20 minuti (Veiera et al, 2010).

Il colorante “Oil Red O” agisce legandosi ai lipidi intra-citoplasmatici prodotti dalle cellule differenziate e la positività alla colorazione può essere verificata al microscopio, i vacuoli lipidici assumono colorazione rossa mentre i nuclei si colorano di blu.

Differenziazione osteogenica in vitro

L'osteogenesi è stata indotta con medium di coltura integrato con 1 nM desametasone, 10 mM β-glicerolo e 50 μg/ml ascorbato-2-fosfato. Le cellule sono state mantenute in questo terreno per circa 14 giorni e medium osteogenico è stato sostituito ogni 2-3 giorni. La mineralizzazione è stata valutata mediante colorazione delle cellule con Alizarina Red, dopo fissazione in etanolo (70%). Le cellule quindi sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in una soluzione contenente Alizarina Red 1% ed idrossido di ammonio 1%, successivamente le cellule sono state lavate due volte con PBS e lasciate asciugare completamente (Zucconi et al. 2010). Come ulteriore prova di differenziazione il fenotipo osteogenico è stato identificato mediante colorazione Von Kossa utilizzando il kit Von Kossa Bio-Optica®. Le cellule positive sono state identificate con Alizarina Red, una colorazione che identifica la deposizione di sali di calcio, ed anche con colorazione Von Kossa, in cui gli ioni d'argento reagiscono con il fosfato di calcio producendo argento metallico. Le piastre contenenti le cellule di controllo sono state coltivate in terreno di mantenimento e colorate con Alizarina Red nello stesso momento delle colture differenziate.

Differenziazione condrogenica in vitro

La condrogenesi è stata indotta utilizzando il kit di differenziazione StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco®), seguendo le istruzioni specifiche indicate dal produttore. Questo test di differenziazione è stato eseguito sia con colture in monostrato che con coltura delle micro masse. La prova è stata ripetuta tre volte su campioni provenienti da diversi animali. Per generare culture micro masse è stata preparata una sospensione cellulare di 1×10^7 cellule/ml in terreno di mantenimento secondo le istruzioni del kit. Le goccioline (5 μl) della sospensione sono stati poi

seminate su una piastra Petri di tre centimetri e mantenute in condizioni di umidità elevata per 2 ore, quando è stato aggiunto il medium condrogenetico. Dopo 12 giorni in condizioni di differenziazione, le piastre sono state lavate una volta con PBS e poi le cellule sono state fissate con una soluzione di formaldeide 4% per 30 minuti a 37°C. Dopo la fissazione, il differenziamento è stato dimostrato mediante colorazione cellulare con soluzione Alcian Blu 1% preparata in 0.1N HCL, per 30 minuti; la colorazione blu indica la sintesi di proteoglicani da parte dei condrociti. Le piastre contenenti le colture di controllo, coltivati in terreno di mantenimento, sono state colorate Alcian blu nello stesso momento delle colture differenziate.

4.6 Misurazione della proliferazione (Saggio MTT)

Per valutare la capacità replicativa è stato utilizzato il test MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromuro), questo test metabolico permette di valutare la capacità replicativa misurando il numero di cellule vive. Per questo test sono state utilizzate delle piastre da 96 pozzetti.

Cellule a P3 sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pozzetto e mantenute in un medium di amplificazione per 48 ore. Poi colture cellulari sono state incubate per 4 ore con 100 μ l/pozzetto di una soluzione XY di MTT, prima è stata aggiunta di 100 μ l di una soluzione di solubilizzazione (10% SDS in HCl 0,01 M), ed in seguito in incubazione a 37°C durante la notte per solubilizzare i cristalli di formazano. Il sale giallo di tetrazolio MTT è stato ridotto dalle cellule metabolicamente attive per formare cristalli insolubili di formazano viola, che vengono solubilizzati con l'aggiunta del detergente (Donofrio et al. 2008). La densità ottica è stata misurata a 540 nm, usando 690 nm come lunghezza d'onda di riferimento in un microReader SLT-Lab

(Salisburgo, Austria); per ogni tipo di cellula, la relazione lineare tra il numero di cellule e la densità ottica era stato precedentemente stabilito. Il test MTT è stato eseguito su colture cellulari derivate da sette animali ed ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software SPSS Statistics versione 20, utilizzando la procedura di modello lineare multivariata generalizzata. La significatività statistica è stata accettata per $P < 0,05$.

4.7 RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

L'analisi dell'espressione genica RT-PCR è stata utilizzata per caratterizzare le cellule derivate dai campioni di tessuto adiposo e di corno uterino. L'elenco dei geni da testare è stato deciso basandosi su Dominici et al. (2006), su documenti pubblicati in precedenza che descrivono il profilo di espressione genica delle MSC canine (Screven et al. 2014; Takemitsu et al. 2012) o MSC umane derivate dall'endometrio (Gargett et al. 2009). L'elenco è costituito da CD44, CD29, CD 34, CD45, CD90, CD13, CD133, CD73, CD31 CD105, Oct4. Per ogni gene il numero di accesso GeneBank, il primer specifico e le dimensioni dell'amplificato è riportato nella Tabella 1.

Ciascuna serie di primer attraversato tra i diversi esoni per evitare indesiderate amplificazione del DNA genomico. L'RNA totale è stato estratto da cellule a P3 utilizzando il kit Nucleo Spin RNAII® (Macherey-Nagel) con le condizioni consigliate dal produttore, mentre il cDNA è stato sintetizzato a partire da 2 mg di RNA totale utilizzando il kit Reverter Aid™ Premium First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). La PCR è stata quindi effettuata utilizzando 2 µl di cDNA. La miscela finale per PCR conteneva un buffer di amplificazione 1x con 2.5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific), 0.25µM specifica, i due primer (0.65 µl di primer

Forward e 0.65 µl di primer Reverse), 1U Dream Taq (Thermo Scientific) in un volume finale di 25µl. Tutte le PCR sono state eseguite applicando le seguenti condizioni per 35 cicli: denaturazione a 94°C per 30 sec; annealing a 55°C per 30 sec; estensione a 72°C per 30 sec. Gli amplificati sono stati poi separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.5%, colorati con bromuro di etidio e visualizzati sotto luce UV. Le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale Canon.

Gene	Accession Number	Sequenza (5' →3')	Bp
CD44	NM_00119702.1	Frw: CCCATTACCAAAGACCACGA (21) Rev: TTCTGCAGGTTCCGTGTCTC (20)	408
CD29	XM_005616949.1	Frw: AGGATGTTGACGACTGCTGG (20) Rev: ACTTTGCATTCAGTGTGTGC (21)	356
CD34	NM_001003341.1	Frw: GAGATCACCCCTAACGCCTGG (20) Rev: GGCTCCTTCTCACACAGGAC (20)	383
CD45	XM_005622282.1	Frw: TGTTTCCAGTTCTGTTTCCCA (22) Rev: TCAGGTACAAAGCCTTCCCA (20)	432
CD90	NM_001287129.1	Frw: AAGCCAGGATTGGGGATGTG (20) Rev: TGTGGCAGAGAAAGCTCCTG (20)	285
CD13	NM_001146034.1	Frw: GGTCTTACCATCACCTGGC (20) Rev: CCTAAGGCCATCCATCGTCC (20)	335
CD133	XM_005618556.1	Frw: ACTGGAGGACCAAGCTCAGA (20) Rev: GGAGTCCTCCTTTTCCTGGC (20)	283
CD73	XM_532221.4	Frw: GATGGGAAAGGCAAGAGGCT (20) Rev: TTCCTGGCATCTTGCTACGG (20)	317
CD31	XM_848326	Frw: GCCCGAAGTTCACTCTCAAG (20) Rev: CACTCCTTTGACCCACACCT (20)	410
CD105	XM_005625330.2	Frw: GCTGAGGACAGAGATGACCA (20) Rev: CACGGAGGAGGAAGCTGAAG (20)	421
OCT4	XM_538830.1	Frw: AAGCCCTGCAGAAAGACCTG (20) Rev: GTTCGCTTTCTCTTTCGGGC (20)	286
GAPDH	NM_001003142.1	Frw: TTCACCACCATGGAGAAGGC (20) Rev: ACTGATACATTGGGGGTGGG (20)	422

Table 1: Gene name, accession number, specific primers and amplicon length (Bp) of the genes analyzed by RT-PCR.

5. RISULTATI

Colture cellulari

La coltura primaria è stata ottenuta con successo da tutti i campioni di tessuto ottenuti da sette animali arruolati. Cellule con morfologia “Fibroblastic-like” hanno aderito alla superficie plastica delle fiaschette dopo 24-48 ore, ed hanno raggiunto il 70-80% di confluenza in circa 10-12 giorni. Tutte le cellule coltivate derivate dai campioni di tessuto adiposo addominale, tessuto adiposo della borsa ovarica ed endometrio uterino hanno mantenuto la loro morfologia fibroblastic-like da P1 a P3. Durante i primi giorni di coltura (P0) sono stati osservati alcuni cluster formati da cellule con aspetto endoteliale, ma sono stati persi nei passaggi successivi.

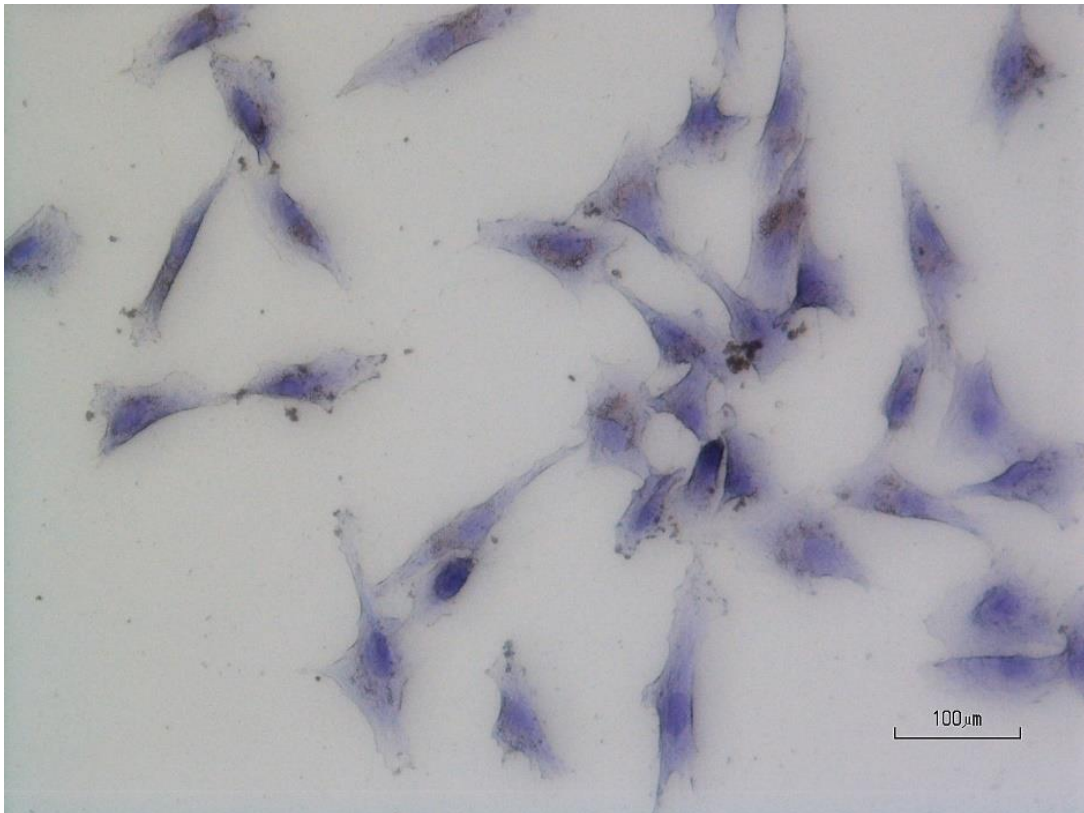


Fig. 10. Cellule ottenute da tessuto adiposo della borsa ovarica a P3 hanno mantenuto la morfologia fibroblastic-like. EE 20x.

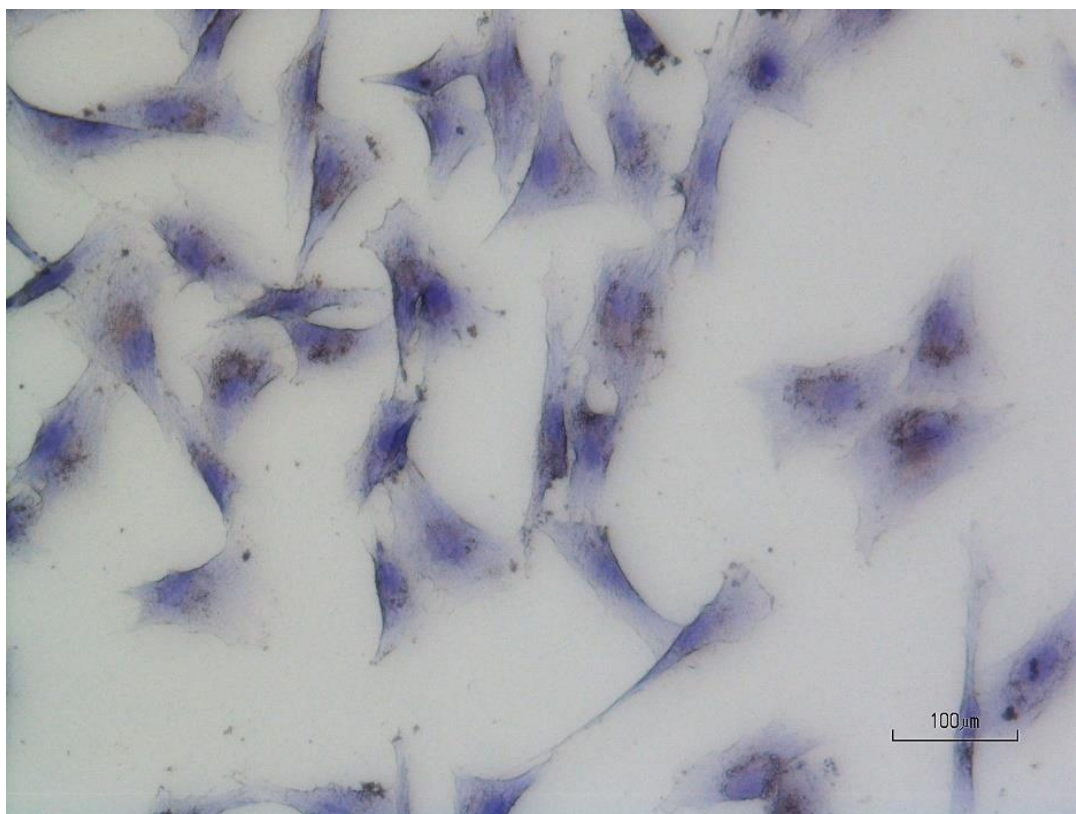


Fig. 11. Cellule ottenute da tessuto adiposo da tessuto endometriale a P3 hanno mantenuto la morfologia fibroblastic-like. EE 20x.

Clonogenicità

La capacità di formare CFU è stata verificata per tutti i tipi di cellule; le cellule derivate da campioni di tessuto adiposo della borsa ovarica non hanno mostrato capacità clonogenica mentre le cellule provenienti dagli altri due tessuti hanno mostrato la capacità di formare CFU quando seminate ad una densità di 50 cellule/pozzetto. Il numero di CFU al giorno 9 dalla semina è stato in media 11.6 ± 1.2 per cellule derivate da tessuto endometriale, e 37 ± 10.2 per cellule derivate del tessuto adiposo. La differenza nel numero di CFU era statisticamente significativa ($P < 0.05$).

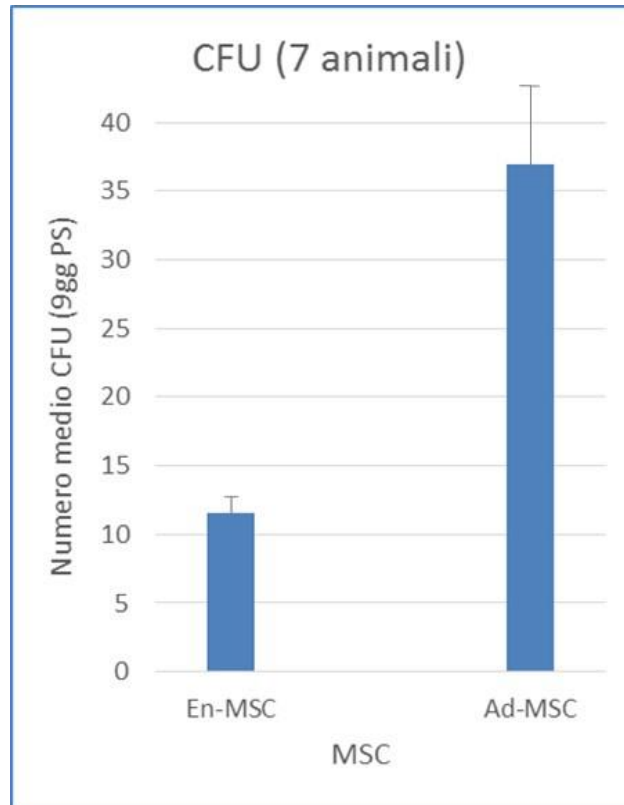


Fig. 12. La capacità clonogenica delle due popolazioni cellulari (MSC derivato da tessuto endometriale e MSC derivate da tessuto adiposo) è stata valutata confrontando il numero medio di CFU formati 9 giorni dopo semina. La prova è stata eseguita su campioni di 7 animali differenti.

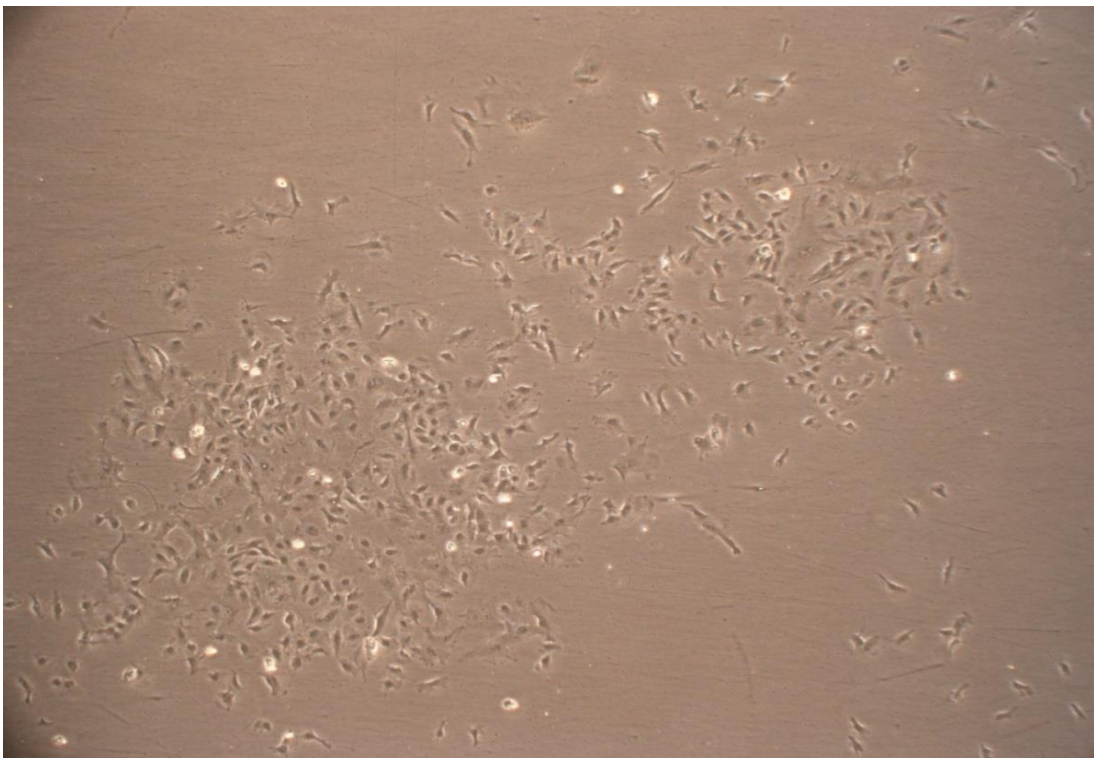


Fig. 13. CFU confluenti ottenuti da cellule derivanti dal tessuto endometriale. 4x.

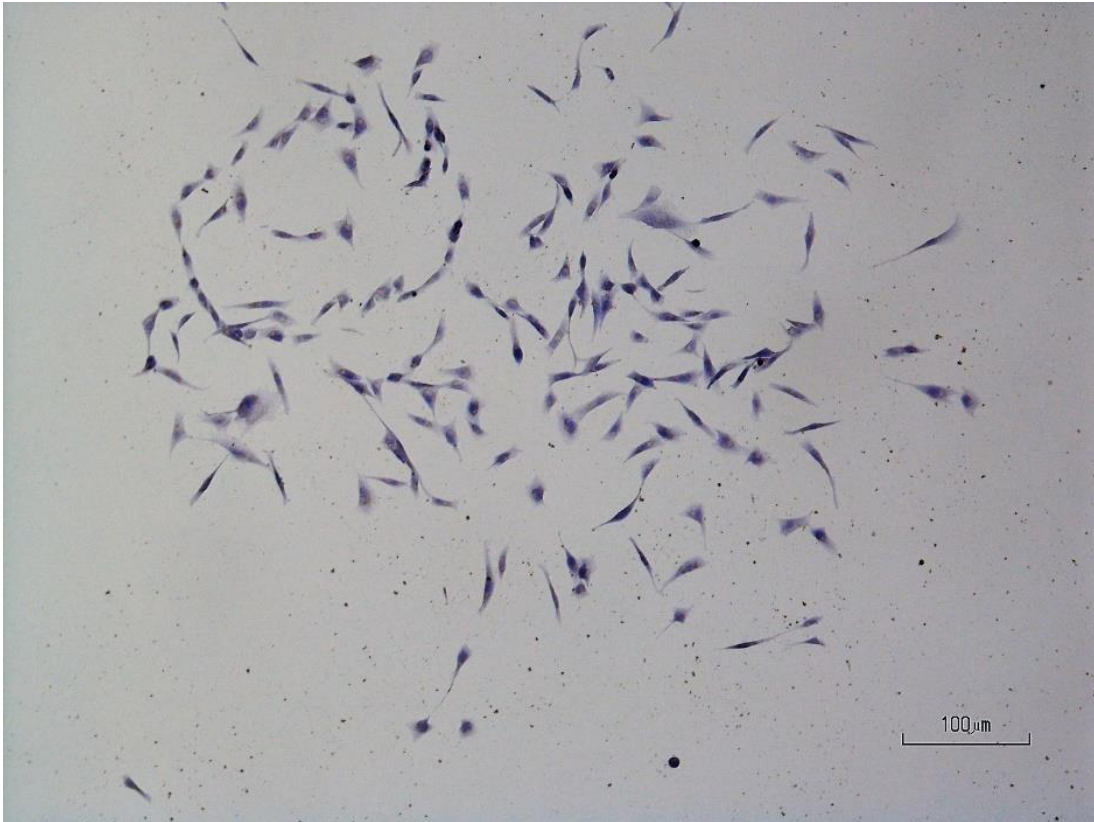


Fig. 14. Valutazione morfologia CFU ottenuti da cellule derivanti dal tessuto endometriale, dopo fissazione e colorazione di Mayer. 4x.

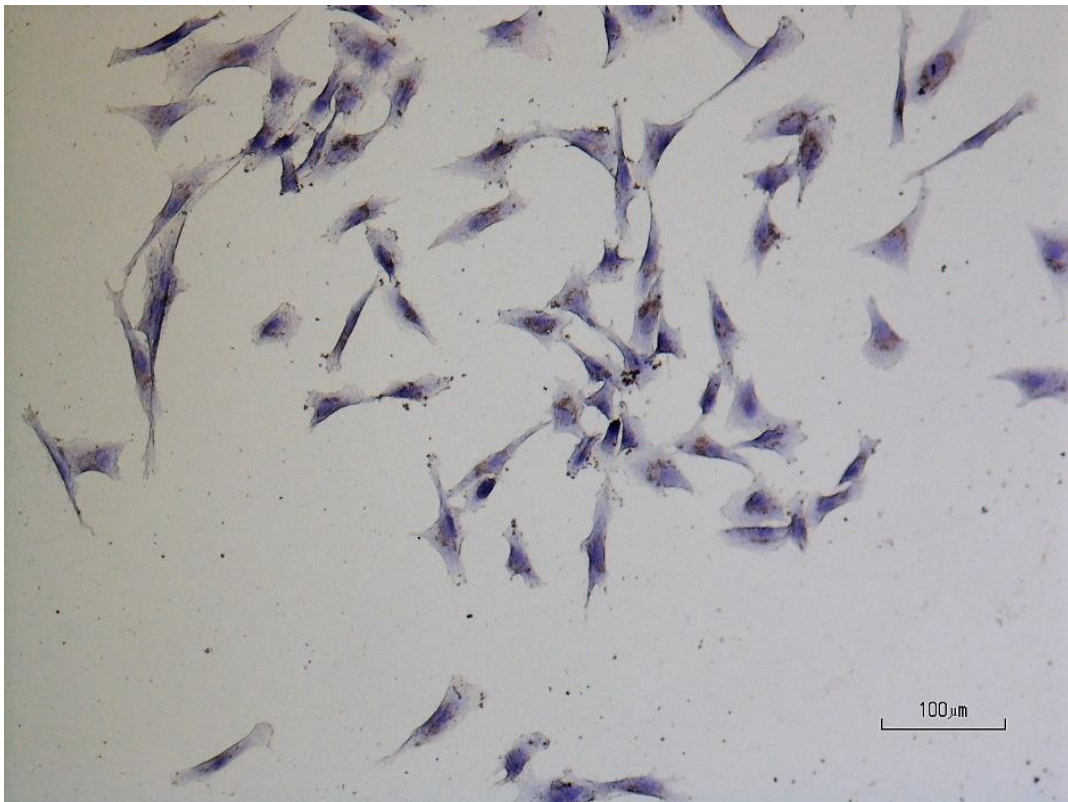


Fig. 15. Valutazione morfologia CFU ottenuti da cellule derivanti dal tessuto endometriale, dopo fissazione e colorazione di Mayer. 10x.

Differenziazione

La differenziazione in adipociti è stata dimostrata dopo l'esposizione delle colture cellulari al medium adipogenico valutando la formazione di vacuoli lipidici intracitoplasmatici. Al termine del periodo di differenziazione durato rispettivamente 21 giorni per le cellule derivate da tessuto endometriale e 20 giorni invece per le cellule derivate dal tessuto adiposo della borsa ovarica, solo le cellule trattate di derivazione endometriale sono risultate positive alla colorazione Oil Red O (Fig 16). Tutti e tre gli altri campioni, endometriale di controllo ed i campioni del tessuto adiposo ovarico sia quello trattato che il controllo, sono invece risultati negativo alla colorazione ORO.

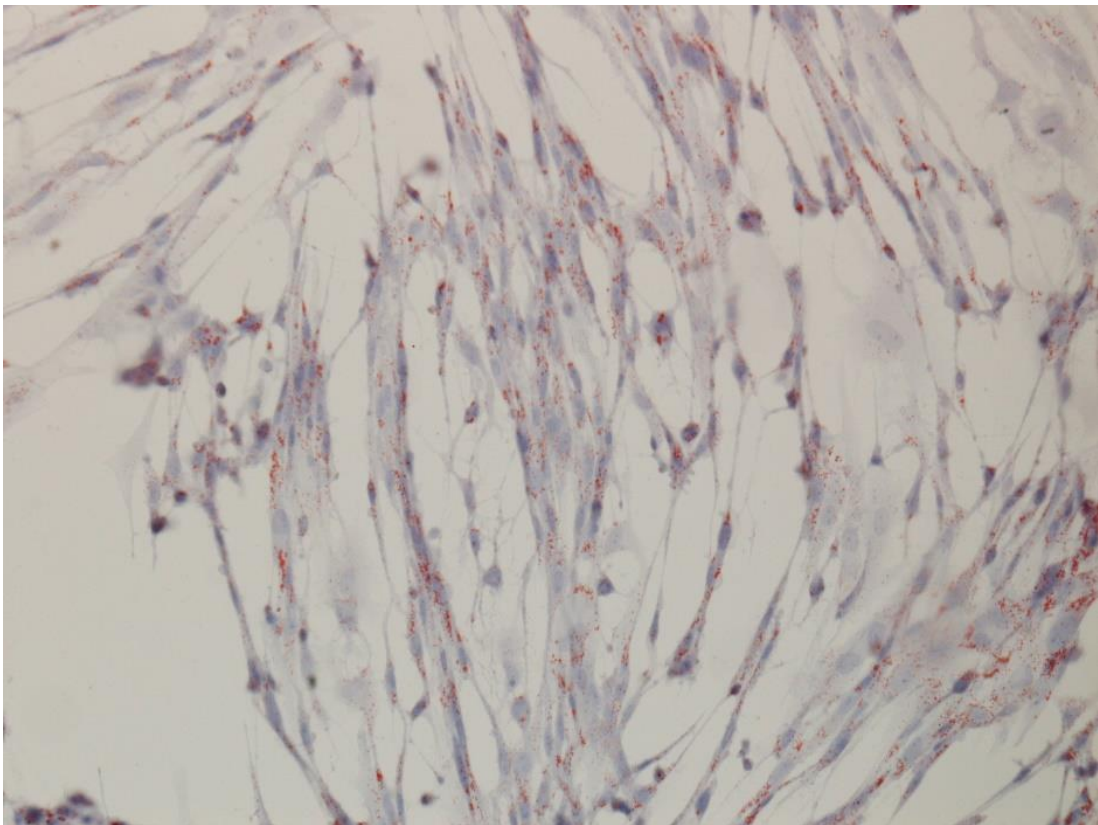


Fig. 16. Differenziazione adipogenica in vitro. EnMSC. 10x. Campione trattato a piccolo ingrandimento. Dopo 21 giorni in medium induttivo adipogenico, l'avvenuta differenziazione è stata confermata da accumulo intracellulare di vacuoli ricchi di lipidi colorati con Oil Red O.

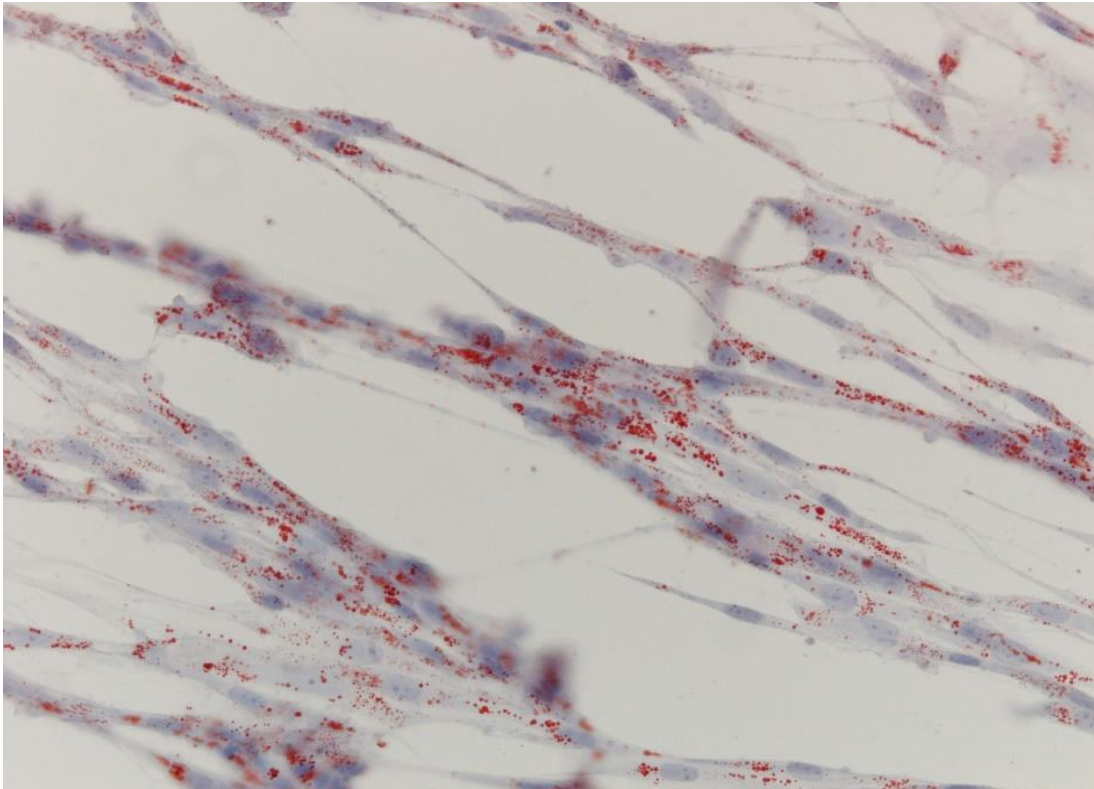


Fig. 17. Differenziazione adipogenica in vitro. EnMSC. 20x. Campione trattato a medio ingrandimento mostra l'elevata quantità di vacuoli lipidici formatisi all'interno delle cellule.

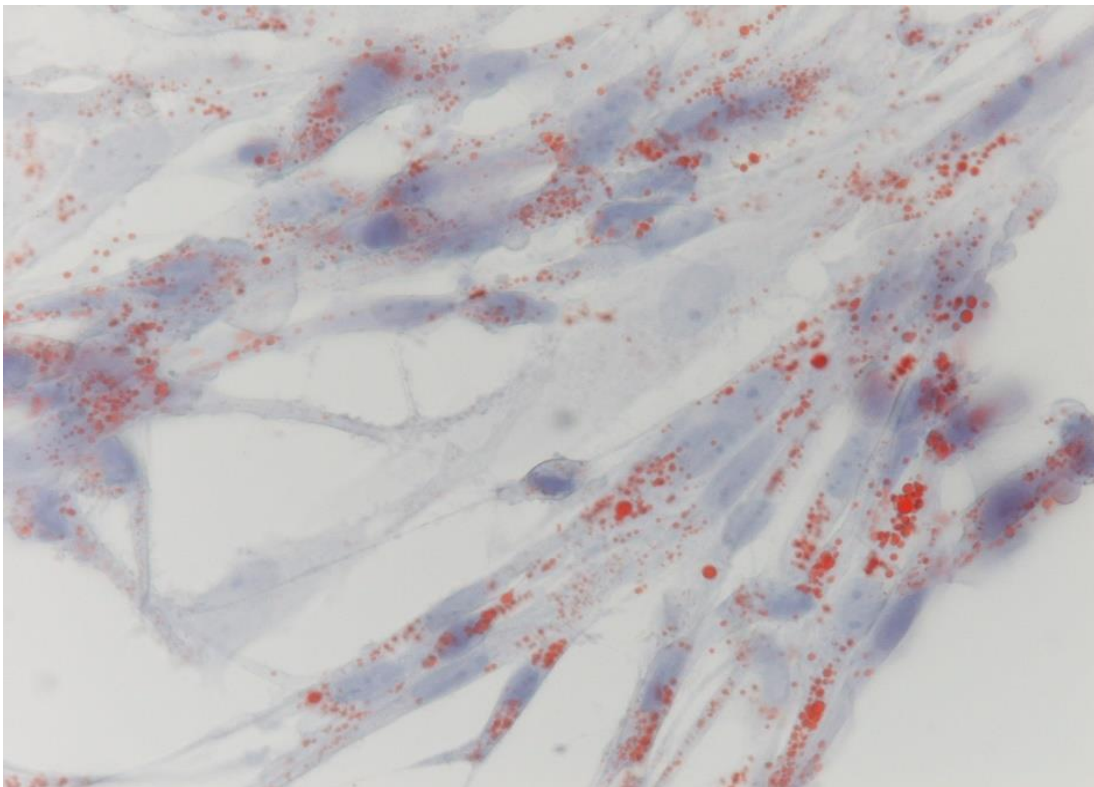


Fig. 18. EnMSC. ORO 40x. Campione trattato ad alto ingrandimento mostra chiaramente la localizzazione intracitoplasmatica dei vacuoli lipidici.

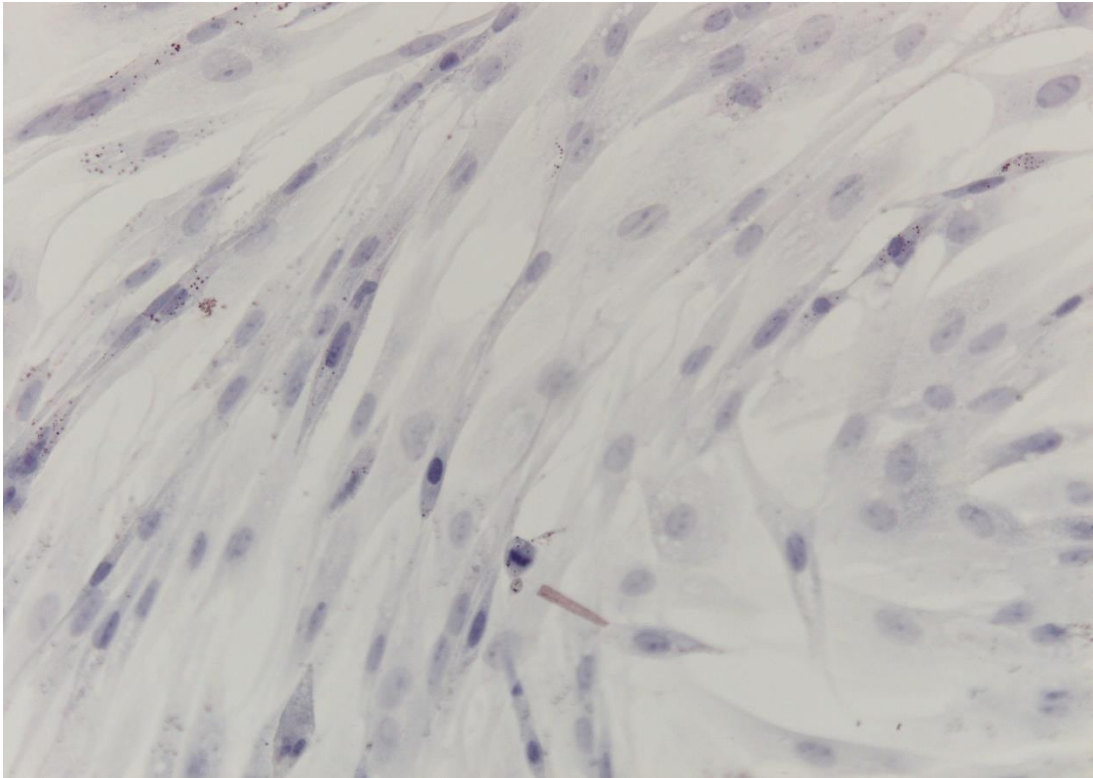


Fig. 19. Differenziazione adipogenica in vitro. EnMSC. 20x. Campione di controllo, dopo 21 giorni di coltura in medium di mantenimento risulta negativo per la colorazione OIL Red O.

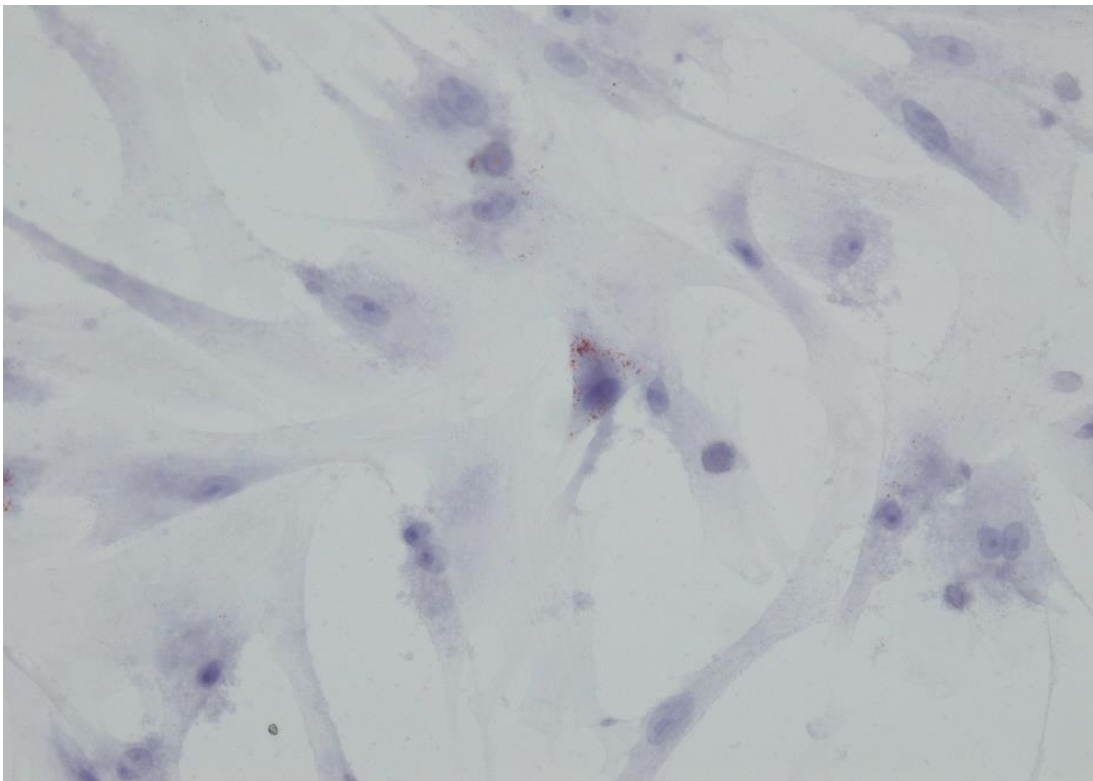


Fig. 20. Cellule derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica risultano negative alla differenziazione adipocitica dopo 20 giorni di trattamento con medium induttivo. Colorazione Oil Red O. 20x

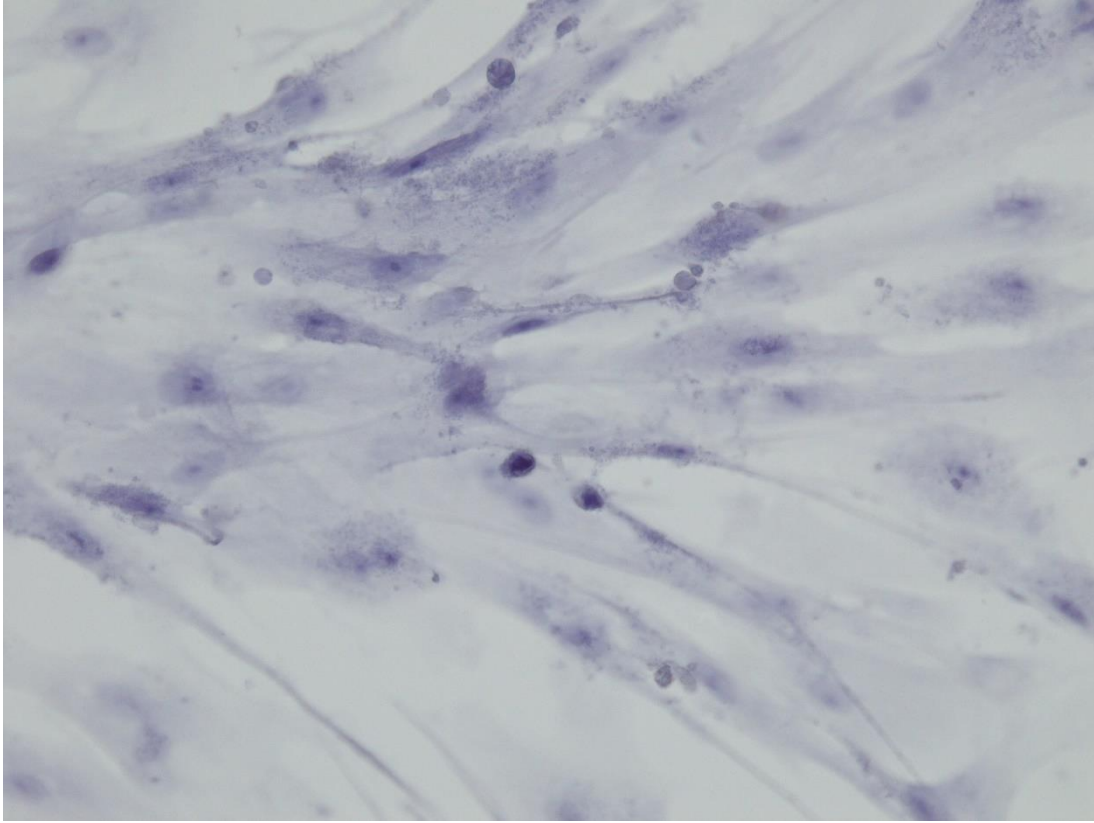


Fig. 21. Cellule derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica. Differenziazione in adipocitociti, 20 gg post trattamento, il campione trattato risulta negativo alla colorazione ORO e quindi negativo per la differenziazione adipogenica. 20x.

Per quanto riguarda la differenziazione osteogenica solamente le cellule derivate da tessuto endometriale hanno mostrato cambiamenti morfologici dopo circa 15 giorni di esposizione al medium osteogenico quando è stata eseguita colorazione. Durante l'esposizione al medium di differenziazione, le cellule si sono gradualmente aggregate ed hanno formato dei noduli. Queste cellule hanno reagito positivamente sia alla colorazione con Alirazin Red S sia a quella Von Kossa, al contrario le cellule di controllo erano negative per la stessa colorazione (Figura 22). Al contrario le cellule derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica non hanno mostrato differenze tra i campioni trattati con medium induttivo osteogenico ed i campioni di controllo.

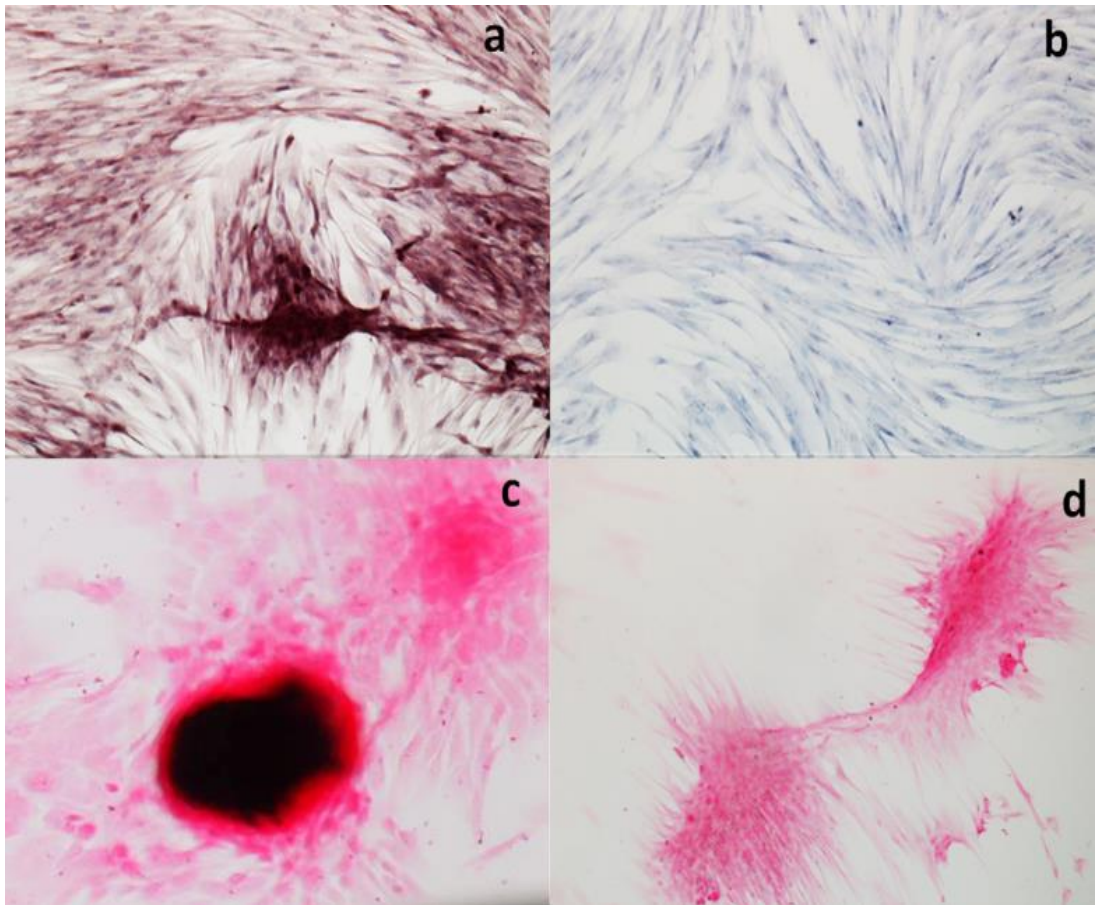


Fig. 22. Differenziazione osteogenica in vitro. EnMSC. 20x. a) Dopo 14 giorni sotto condizione di differenziazione; il campione trattato ha reagito positivamente alla colorazione con Alizarina b) Campione di controllo colorato con Alizarina c) Campione trattato, dopo colorazione Von Kossa è stato possibile osservare la tipica colorazione nera acquisita dai depositi di calcio extracellulare. d) Campione di controllo, colorazione Von Kossa.

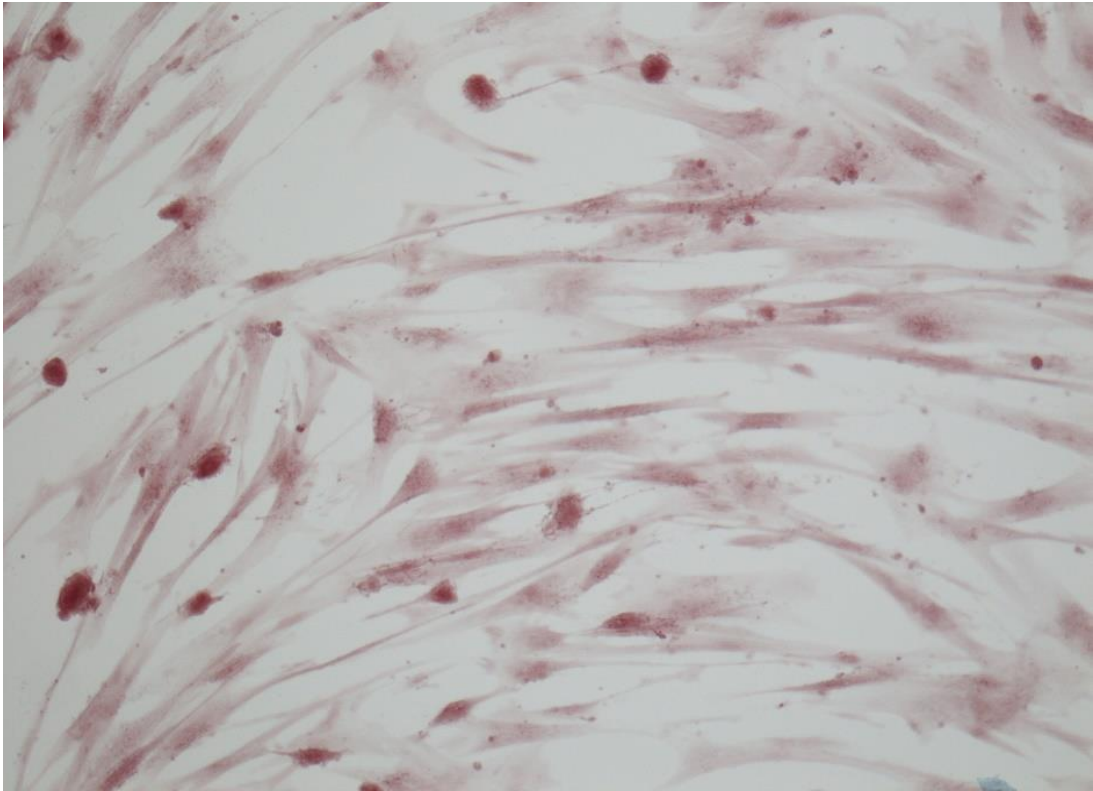


Fig. 23. Cellule derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica. Differenziazione in osteociti, 17 gg post trattamento, colorazione Alizarina Red. Campione trattato risulta negativo alla colorazione. 10x.

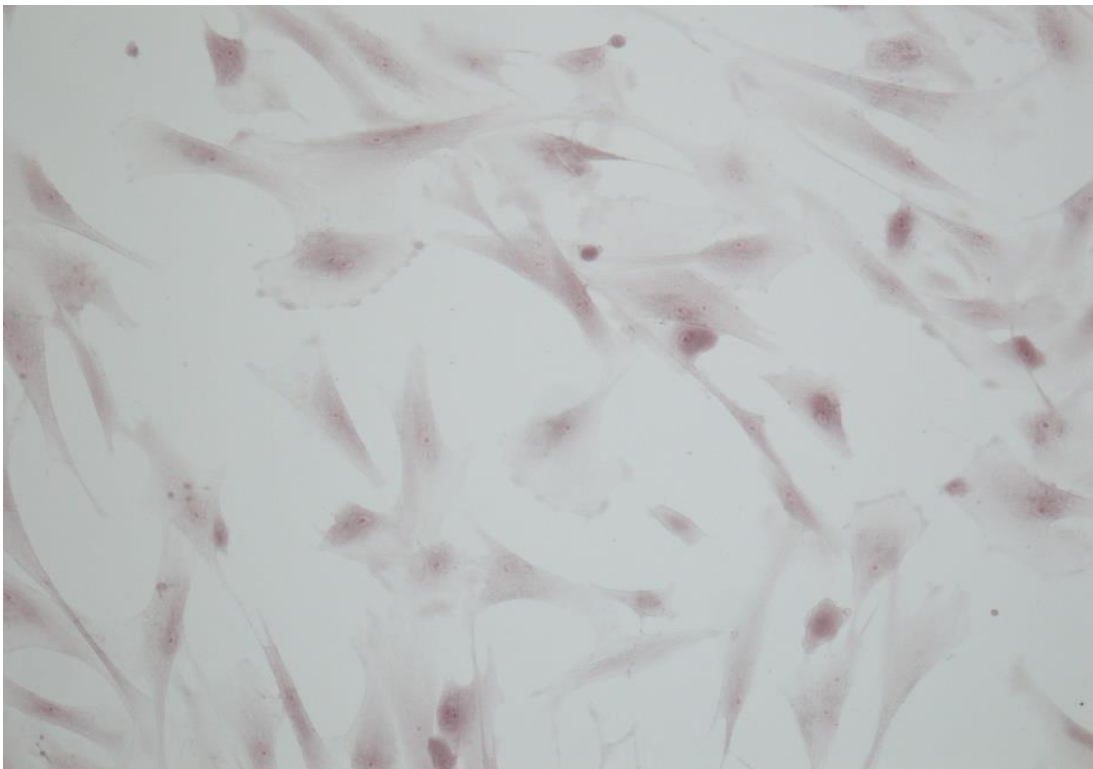


Fig. 24. Cellule derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica. Campione di controllo per il lineage osteogenico, 17 gg post trattamento, colorazione Alizarina Red negativa. 10x.

Poiché le cellule derivate dal tessuto adiposo della borsa ovarica non hanno mostrato plasticità differenziativa, sia per il lineage adipogenico che per quello osteogenico, la capacità di differenziativa condrocitaria è stata valutata solamente per le cellule derivate da tessuto endometriale. Le cellule derivate da quest'ultimo tessuto hanno prodotto proteoglicani dopo 12 giorni di esposizione al medium condrogenico come dimostrato tramite colorazione con Alcian blu (Fig 3).

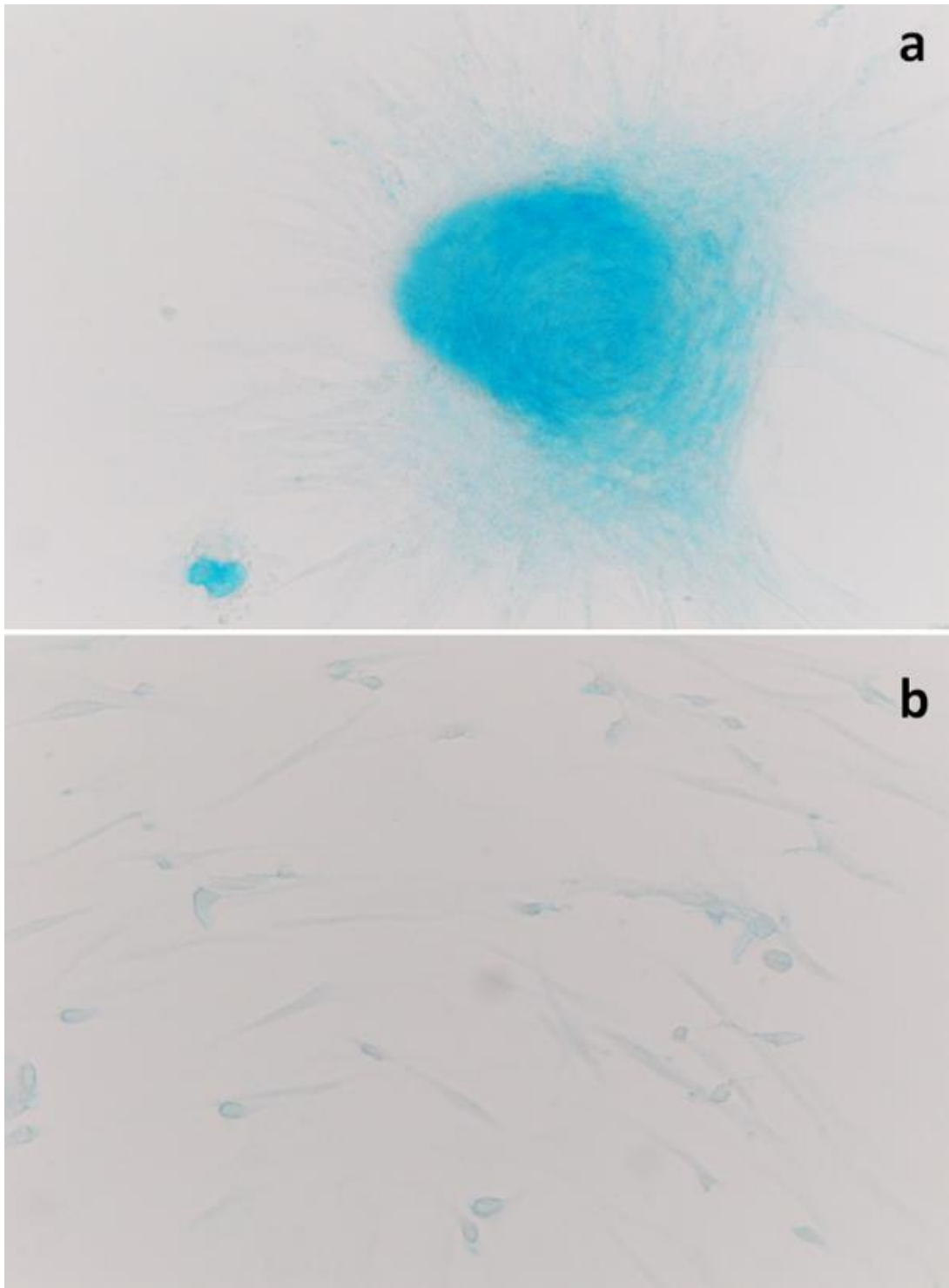


Fig. 25. Differenziazione condrogenica in vitro. EnMSC. 20x a) Dopo 12 giorni in condizioni di differenziazione, la differenziazione è stata dimostrata con la colorazione delle cellule con soluzione Alcian blu; questa colorazione è indicata per i proteoglicani, perché i mucoproteine assumono colore blu. Nel campione trattato è stata ottenuta la formazione di noduli tridimensionali. b) Campione di controllo, al contrario, rimane in monostrato.

Proliferazione cellulare

La capacità proliferativa delle due popolazioni cellulari (cioè MSC derivato da tessuto endometriale e adiposo derivato MSC) è stata valutata mediante saggio MTT. In questo test, le cellule vitali convertono l'MTT, un substrato metabolico, in un prodotto colorato: il formazano. La conversione da MTT a sale di formazano è in funzione del numero di cellule vitali per pozzetto e del loro metabolismo. Precedentemente era stata stabilita una relazione lineare tra il numero di cellulare e la densità ottica per ciascuna popolazione delle cellule testate. Per le colture cellulari endometriali dopo 48 or solubilizzato e di coltura, l'assorbanza del formazano era inferiore; questo implica un minor numero di cellule ed un tasso proliferativo più basso per le cellule derivate dall'endometrio. La differenza era statisticamente significativa ($p < 0.05$) ed è stata osservata in tutti gli animali testati ($n=7$). Inoltre, è stato osservato un tasso di proliferazione diverso per le cellule dello stesso tipo nei diversi animali ($p < 0,05$) (Figura 4). Al contrario invece quando le colture cellulari ottenute da tessuto adiposo periovarico sono state confrontate con le cellule ottenute da tessuto adiposo addominale, campione di riferimento, i risultati indicano che esiste una differenza nella capacità proliferativa dei due tessuti. Le cellule derivate dal tessuto adiposo della borsa ovarica replicano più velocemente ($p < 0,001$) rispetto alle altre. Esiste inoltre una significatività legata all'animale donatore: la capacità delle due popolazioni di replicare varia da animale ad animale ($p < 0,001$).

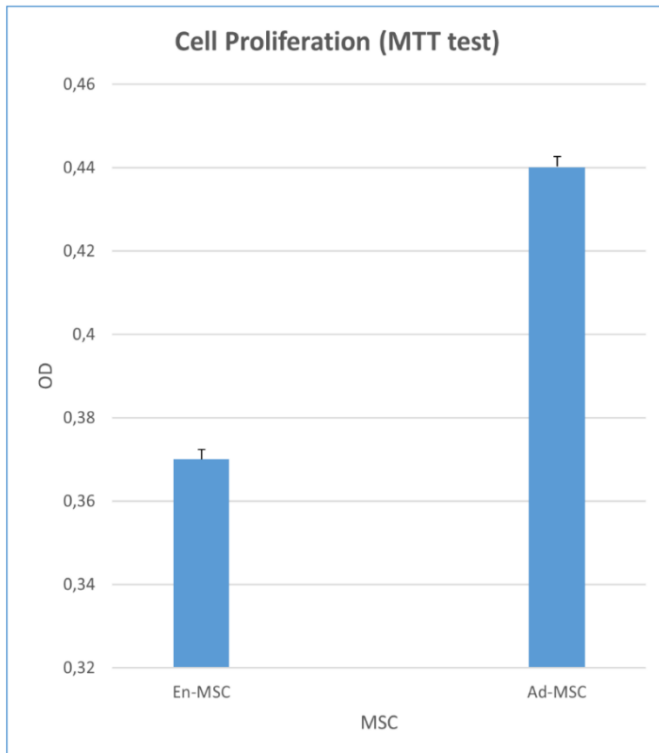


Fig. 26. MTT. La capacità proliferativa delle due popolazioni cellulari (MSC derivato da tessuto endometriale e MSC derivate da tessuto adiposo) è stata valutata confrontando i risultati ottenuti dal test MTT. La prova è stata eseguita su campioni di 7 animali differenti.

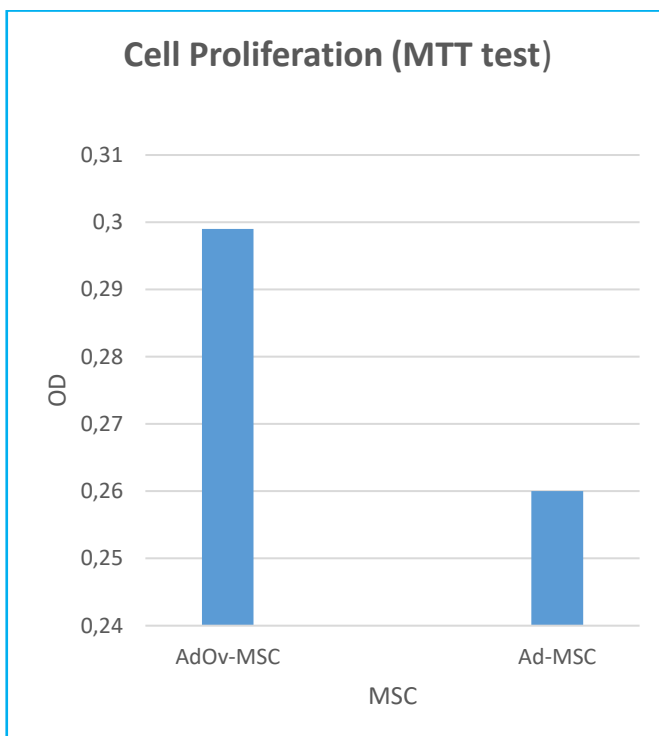


Fig. 27. Risultati MTT su MSC derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica ed MSC derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica. La prova è stata eseguita su campioni di 7 animali differenti.

Le cellule di derivazione endometriali, coltivate a P3, analizzate mediante RT-PCR hanno dimostrato che queste cellule hanno un profilo di espressione dei marker simile a quello delle AdMSC. Le cellule isolate dall'utero infatti hanno espresso CD44, CD29, CD90, CD13, CD133, CD73, CD105, Oct4; ma sono risultate negative per CD45 ed hanno mostrato, a seconda dei campioni, un basso o nessun segnale per CD31 e CD34 (Tabella 2). Invece le cellule derivate dal tessuto adiposo della borsa ovarica, quando analizzate tramite RT-PCR, hanno prodotto risultati contrastanti riguardanti il profilo dei marker espressi sia da campioni ottenuti dai diversi soggetti sia da cellule derivate dallo stesso animale.

	AdMSC	EnMSC
CD 44	+	+
CD 29	+	+
CD 34	-	+/-
CD 45	-	-
CD 90	+	+
CD 13	+	+
CD 133	+	+
CD 73	+	+
CD 31	+/-	+/-
CD 105	+	+
Oct4	+	+

Tabella 2. Risultati RT-PCR. Comparazione tra i marker di superficie espressi dalle MSC derivate da tessuto adiposo addominale e MSC derivate da tessuto endometriale.

DISCUSSIONE

Il tessuto endometriale è caratterizzato dalla capacità di modificare e rigenerare suo strato funzionale ciclicamente. Questo potenziale rigenerativo permane per tutta la durata di vita riproduttivo della femmina, coinvolgendo epiteliali, stromali ed elementi vascolari dell'organo.

Recentemente, le cellule mesenchimali che mostrano proprietà simili alle cellule staminali sono state isolate dal comparto rigenerativo dell'endometrio (MSC endometriali, EnMSC) (Gargett et al 2009; Gargett e Masuda 2010; Wang et al 2012). Queste cellule sono coltivate su superfici plastiche, hanno capacità clonogenica, si differenziano in molteplici tipi cellulari (osteoblasti, condrociti e adipociti) ed esprimono il pattern tipico dei marcatori di superficie espressi da MSC derivate da midollo osseo e da tessuto adiposo.

In medicina umana, è stata dimostrata la possibilità di ottenere EMSC da tessuto endometriale digerito mediante tecniche enzimatiche, biopsia endometriale ed anche dal sangue mestruale. L'isolamento e la caratterizzazione di MSC è stata dimostrata anche su campioni uterini sia nella specie bovina che in quella suina, mentre nella specie canina non ci sono dati disponibili.

Nel cane la preparazione di MSC ottenute da tessuto uterino potrebbe essere interessante per diversi motivi; infatti al pari della donna (Emmerson e Gargett, 2016) e della cavalla (Ferris et al 2014), si potrebbe prevedere un potenziale ruolo di queste cellule nella terapia di patologie uterine.

Nelle cavalle, una condizione dell'utero infiammatoria non infettiva che si riscontra comunemente è l'endometrite persistente accoppiamento indotto (PMIE). Attualmente

il trattamento per questa patologia (lavaggio uterino e terapia con ossitocina) si concentra su come favorire la rimozione dei prodotti infiammatori dall'utero e non sulla promozione della modulazione della risposta infiammatoria. Al contrario sono stati recentemente proposti trattamenti, basati sulle proprietà immunomodulanti di queste cellule, in grado di modulare la risposta infiammatoria dell'utero agli spermatozoi (Ferris et al 2014).

Nella cagna le patologie degenerative dell'utero, come ad esempio il complesso iperplasia cistica-piometra (CHE), e le alterazioni metaboliche che ne possono derivare, come ad esempio la resistenza all'insulina (Bigliardi et al 2014), sono frequenti.

L'iperplasia endometriale cistica nella cagna è una malattia multifattoriale che compromette la fertilità e che può evolvere in una forma infettiva con effetti gravi per la salute dell'animale. Attualmente non esiste una terapia farmacologica risolutiva per questa patologia. Infatti i protocolli terapeutici comunemente usati sono basati sulla somministrazione di anti-progestinici, prostaglandine ed antibiotici per il controllo della fase infiammatoria acuta, anche se è riportata un'alta frequenza di recidive nelle femmine di età superiore ai cinque anni. La degenerazione del tessuto (iperplasia endometriale e cisti endometriali) può persistere e determinare recidive al momento della comparsa dei nuovi cicli estrali (Linnea et al 2014). Tra i principali fattori eziologici è stato ampiamente dimostrato il ruolo della somministrazione di progesterone esogeno, dell'ormone della crescita (GH) e di alcune somatomedine (Bigliardi et al 2004; De Bosschere et al 2001), anche se questa condizione patologica è stata anche riscontrata anche in pazienti che non hanno mai ricevuto progestinici esogeni.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di dimostrare la presenza di una popolazione di cellule staminali stromali nell'endometrio canino e valutare la possibilità di isolamento ed espansione di queste cellule al fine di valutare il loro possibile coinvolgimento nella patogenesi dell'iperplasia endometriale cistica ed un potenziale ruolo terapeutico.

Inoltre, le MSC derivate dall'endometrio potrebbero rappresentare una fonte alternativa di cellule per le terapie rigenerative nel cane, data l'elevata incidenza di ovarioisterectomia nella cagna anche considerando che l'utero al termine dell'intervento viene eliminato.

Le EnMSC potrebbero essere coltivate, stoccate ed utilizzate in un secondo momento per la terapia rigenerativa con cellule autologhe. Un approccio simile è stata recentemente proposto nell'uomo per le cellule rigenerative endometriali (Sun et al 2016).

Negli ultimi anni in medicina veterinaria l'applicazione di MSC derivate da midollo osseo o da tessuto adiposo ha visto un notevole sviluppo soprattutto nella specie canina ed in quella equina. I risultati sono stati talvolta contrastati a causa della mancanza di controlli appropriati, anche se in letteratura sono stati riportati molti risultati positivi come ad esempio nella terapia della tendinite (Frisbie et al 2010; Riccò et al 2013) e dell'osteoartrite (Jo et al 2014) nel cavallo, nell'artrosi cronica delle articolazioni del gomito (Black et al 2008), HYP displasia (Marx et al 2014), e nella guarigione del tessuto molle (Zubin et al 2015) nel cane.

E' possibile ottenere colture primarie da tutti e tre i campioni di tessuto, sia dal tessuto adiposo della borsa ovarica, dal corno uterino e dal tessuto adiposo addominale. Le cellule isolate dalle tre diverse fonti sono state in grado di aderire alla superficie di

plastica ed hanno mostrato morfologia cellulare simile, capacità di subcultura, ma solamente le cellule derivate dall'endometrio e quelle derivate dal tessuto adiposo addominale hanno mostrato plasticità differenziativa quando coltivate in vitro con medium induttivo per lineage osteogenico, condrogenico e adipogenico ed hanno espresso anche i tipici antigeni di superficie espressi generalmente dalle MSC.

Pertanto le cellule derivate da tessuto adiposo della borsa ovarica, in base alle caratteristiche osservate, non rispondono criteri proposti dal "Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy" che ha stabilito i criteri per la definizione per cui una popolazione selezionata di cellule può essere definita come cellule mesenchimali stromali multipotenti (Dominici et al 2006).

I tre criteri proposti sono:

- Aderenza alla plastica
- Espressione di specifici antigeni di superficie (Ag)
- Potenziale differenziativo multipotente

In primo infatti luogo le MSC devono aderire alla plastica quando sono mantenute in condizioni di coltura standard utilizzando fiasche per colture cellulari ed in secondo luogo più del 95% della popolazione di MSC deve esprimere CD105, CD73 e CD90. Inoltre, queste cellule devono mancare espressione ($\leq 2\%$ positivo) di CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 e HLA di classe II. (Dominici et al 2006).

Le cellule endometriali che sono state isolate rispondono a tutti e tre i criteri proposti e, per gli antigeni di superficie testati, mostrano l'espressione antigenica corretta.

La principale differenza osservata tra MSC derivate da tessuto adiposo ed EnMSC, è stata l'inferiore tasso di proliferazione delle EnMSC valutato con il test MTT. Tuttavia queste cellule possono essere ampliate con successo e crioconservate e si potrebbe

ipotizzare di utilizzare il tessuto endometriale come fonte autologa di MSC da utilizzare successivamente per il trattamento di diverse patologie.

In linea di principio, le cellule staminali utilizzate per le terapie mediche rigenerative devono soddisfare i seguenti criteri: devono essere presenti in quantità elevate ed essere ampliate facilmente; possono essere ottenute con una procedura mini-invasiva; possono essere differenziate verso linee cellulari differenti, i.e lineage adipogenico, osteogenico e condrogenico (Bunnell et al. 2008).

Tutti questi criteri sono stati soddisfatti dalle EnMSC canine anche se hanno mostrato un basso tasso di replicazione implicazione, infatti questo implica soltanto un tempo maggiore per ottenere il numero di cellule necessarie all'applicazione terapeutica.

CONCLUSIONE

I dati hanno evidenziato che le cellule derivate dal tessuto adiposo dalla borsa ovarica non possono essere definite cellule staminali poiché non rispondono ai requisiti minimi richiesti mentre le cellule staminali endometriali canine mostrano caratteristiche tipiche delle MSC e possono essere isolate dal campione di tessuto endometriale.

Per quanto riguarda la possibilità di applicazione clinica delle cellule staminali endometriali nelle specifiche patologie uterine, devono essere eseguiti ulteriori studi al fine di verificare se le cellule endometriali isolate da animali con patologie uterine mostrano le stesse caratteristiche di quelle osservate in animali sani e valutare se queste cellule hanno un ruolo nella prevenzione della patologia oppure possono contribuire/contribuiscono alla sua comparsa.

Tutti gli animali utilizzati per l'isolamento di EnMSC si trovavano nella fase terminale del diestro, con un livello di progesterone inferiore a 2 ng/ml. La presenza, la frequenza e le caratteristiche di EnMSC nelle diverse fasi ormonali non sono state valutate in questo studio, ma potrebbero un argomento interessante per una ricerca futura.

I dati ottenuti durante questa ricerca possono essere visti come uno studio preliminare per la caratterizzazione completa di MSC derivate da endometrio canino le quali potrebbero giocare un ruolo nella omeostasi dell'organo così come nello sviluppo di condizioni patologiche.

APPENDICE: ISOLAMENTO, COLTURA E CARATTERIZZAZIONE DI MSC DERIVATE DA ENDOMETRIO CANINO DI SOGGETTI AFFETTI DAL COMPLESSO IPERPLASIA ENDOMETRIALE CISTICA –PIOMETRA (CEH)

L'iperplasia endometriale cistica (CEH) è un disturbo comune dell'utero delle cagne che porta ad infertilità a causa dei fenomeni lesivi che interferiscono sull'impianto e sulla formazione della placenta (Bhatti et al 2007).

La CEH è una condizione ormone-dipendente che si osserva nella cagna e deriva da ripetuti cicli di stimolazione da parte del progesterone, ha inizio con un'iperplasia endometriale ghiandolare, progredisce con la trasformazione cistica delle ghiandole e può anche evolvere in una forma infettiva con gravi effetti per la salute dell'animale (Nelson et al 2015; Bhatti et al 2007).

La CEH si sviluppa dopo ripetuti cicli estrali, di conseguenza il complesso CEH-piometra generalmente è una malattia riscontrata nei soggetti anziani, ma sono riconosciuti fattori predisponenti come l'uso di progestinici, anomalie dell'apparato riproduttore, razza e fattori di crescita cellulare. Infatti questa condizione patologica presume, da parte dell'utero, una risposta esagerata alle stimolazioni progestiniche croniche durante la fase luteale con accumulo di liquido all'interno del lume uterino dovuto all'attività delle ghiandole endometriali ed alla loro proliferazione (De Boschere et al, 2001).

L'esame ecografico è molto utile per diagnosticare l'iperplasia endometriale cistica, in quanto permette di valutare con chiarezza l'integrità endometriale, la variazione dello spessore della parete uterina, la distensione dell'utero e l'iperplasia cistica delle ghiandole endometriali.

Una delle classificazioni spesso utilizzata per la stadiazione della gravità durante l'esame ecografico è la seguente:

- Grado 1°. Assenza di cisti, superficie endometriale normale e contenuto uterino anecogeno.
- Grado 2°. Presenza di poche cisti di piccole dimensioni, superficie endometriale normale, contenuto uterino anecogeno.
- Grado 3°. Presenza di molte cisti di grandi dimensioni, superficie endometriale irregolare, endometrio ipertrofico.
- Grado 4°. Presenza di molte cisti di grandi dimensioni disseminate in tutto l'utero, superficie endometriale irregolare ed ipertrofica oppure endometrio atrofico, contenuto uterino iperecogeno (Bigliardi et al 2004).

E' importante però ricordare che la diagnosi ecografica non sempre permette di differenziare se un soggetto è affetto da CEH di 1° o 2° grado, poiché le lesioni sono spesso di grado modesto e non sempre identificabili, mentre sono ben individuabili i soggetti che presentano CEH di 3° e 4° grado, data l'entità dei cambiamenti all'interno dei tessuti interessati (Bigliardi et al 2004).

Istologicamente invece tale complesso si delinea con quattro tipologie, associate per lo più alla presenza o meno di batteri nell'essudato:

- Grado 1. Iperplasia endometriale cistica senza endometrite;
- Grado 2. Iperplasia endometriale cistica e diffusa infiltrazione di plasmacellule, linfociti e macrofagi;
- Grado 3. Iperplasia endometriale cistica, endometrite acuta, infiltrazione di plasmacellule e neutrofilo;
- Grado 4. Endometrite cronica spesso accompagnata da metaplasia squamosa dell'endometrio e del miometrio ed infiltrazione linfoplasmocitaria (Marcato 2015).

Attualmente non esiste una terapia farmacologica risolutiva per questa patologia, i protocolli terapeutici comunemente usati sono basati sulla somministrazione di anti-progestinici come l'aglepristone (un antagonista competitivo indicato oltre che per il trattamento del CEH anche di altre condizioni patologiche progesterone-dipendente, come il diabete mellito gestazionale), prostaglandine ed antibiotici per il controllo della fase infiammatoria acuta (Callegari et al 2015). Inoltre i fenomeni lesivi che interessano l'endometrio (iperplasia endometriale e cisti endometriali) possono persistere e determinare recidive al momento della comparsa dei nuovi cicli estrali; la percentuale di recidive è elevata nelle cagne anziane (Linnea et al 2014).

Lo scopo di queste ulteriori indagini è stato di valutare la possibilità di isolamento, coltura e caratterizzazione di MSC, derivate da endometrio canino in soggetti affetti

dal complesso iperplasia endometriale cistica-piometra, a vari stadi di sviluppo ed inoltre, se possibile, verificare se le cellule staminali mesenchimali endometriali isolate da animali con questa patologia uterina, evidenziano caratteristiche culturali e morfologiche analoghe a quelle osservate in animali sani.

Materiali e Metodi

Sono state selezionate 3 cagne di razza barbone nano, tutte di circa 13 anni, che presentavano il complesso iperplasia endometriale cistica-piometra a tre diversi stadi (1° stadio Praline; 2° stadio Anais, 3° stadio Molly) diagnosticati attraverso l'esame ecografico. Le cagne sono state sottoposte ad intervento di ovarioisterectomia in accordo con i proprietari, i quali hanno firmato un apposito consenso informato.

I campioni di parete endometriale sono stati raccolti e trattati secondo quanto riportato da De Cesaris et al (2016); prelevato il campione per le colture cellulari, la parte rimanente dell'utero è stata fissata in formalina e sottoposta ad indagini anatomopatologiche per confermare la diagnosi ecografica.

Colture cellulari

Successivamente all'isolamento ed alla coltura primaria, sono state analizzate solo le cellule derivanti dai campioni di Anais e Praline, mentre non è stato possibile per contaminazione batterica, ottenere una coltura primaria dal tessuto endometriale di Molly, che macroscopicamente evidenziava quadri di endometrite purulenta. E' stata quindi valutata la capacità di aderire alla plastica e la morfologia cellulare delle cellule

ottenute da Anais e Praline; inoltre le cellule ottenute da questi due soggetti sono state portate a P3 ed è stata valutata la loro capacità differenziativa utilizzando per la coltura medium induttivi per i tre lineage classici (adipogenico, osteogenico, condrogenico).

Colorazioni istologiche e caratterizzazione immunofenotipica

Subito dopo l'asportazione chirurgica e il prelievo di cellule dalla tonaca endometriale i campioni di utero sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per 48 ore, quindi processati, inclusi in paraffina e sezionati al microtomo per ottenere sezioni istologiche di 5µm di spessore.

Le sezioni sono state successivamente colorate con ematossilina-eosina e, previa adesione a vetrini pretrattati, sottoposti a colorazioni immunohistochimiche con diversi markers.

La diagnosi istopatologica delle lesioni uterine in esame è stata effettuata al microscopio ottico, seguendo la classificazione delle patologie endometriali della cagna proposte da Schlafer et al (2008).

La valutazione della positività alle colorazioni immunocito e istochimiche è stata effettuata mediante analisi delle immagini fotografate al microscopio ottico a diversi ingrandimenti (NIKON Eclipse 800); per i markers si è scelto di effettuare una valutazione qualitativa, osservando la corretta localizzazione del marker e l'intensità della colorazione immunocito o istochimica.

Colorazione ematossilina eosina

La colorazione ematossilina-eosina (EE), è la colorazione di base dell'istologia utilizzata per distinguere sia organuli intracellulari sia la matrice extracellulare. La colorazione si basa sulla capacità dei due coloranti di differenziare molte strutture, per la diversità chimica e di affinità per gli elementi endocellulari. L'ematossilina è un colorante basico, che colora il nucleo di un colore tendente al bluastro; l'eosina è, invece, acida e per questa ragione colora il citoplasma di una tonalità tendente al rosa.

L'ematossilina non è direttamente coinvolta nella colorazione del campione, il cromoforo attivo è l'emateina che deriva dall'ossidazione dell'ematossilina. In base al tipo di miscela è possibile utilizzare differenti tipi di soluzione ematossilinica, la più utilizzata è l'emallume di Mayer, una miscela formata da allume di potassio, ematossilina, iodato di sodio, acido citrico e tricloroacetaldeide (cloralio).

Protocollo per colorazione ematossilina-eosina:

1. Due o tre passaggi in xilolo per quindici minuti;
2. Due o tre passaggi in alcol etilico assoluto per cinque minuti;
3. Alcoli decrescenti fino al 70° per cinque minuti;
4. Due passaggi in acqua distillata per circa un minuto;
5. Colorazione con ematossilina di Mayer per cinque minuti;
6. Lavaggio in acqua corrente per circa 10 minuti;
7. Colorazione con eosina per circa un minuto;
8. Passaggio veloce in acqua distillata;
9. Disidratazione, con i alcoli crescenti;

10. Diafanizzazione con xilolo;
11. Montaggio, con eukitt;
12. Asciugatura e osservazione al microscopio ottico.

Antigeni di superficie e citoplasmatici utilizzati per la caratterizzazione fenotipica delle cellule in coltura e dei preparati istologici di parete uterina.

CD31: è un membro della superfamiglia delle immunoglobuline, una glicoproteina transmembrana di 130 kDa designato anche come (molecola di adesione delle cellule endoteliali delle piastrine 1) PECAM-1. Questa glicoproteina è espressa su tutti gli endoteli continui, inclusi quelli delle arterie, arteriole, vene, venule e capillari non-sinusoidali, ma non è espresso dagli endoteli discontinui come ad esempio la polpa rossa della milza. Inoltre CD31 è espresso diffusamente sulla superficie dei megacariociti, delle piastrine, cellule mieloidi, cellule natural killer, alcuni sottoinsiemi di cellule T così come sui precursori delle cellule B. Essa svolge un ruolo importante nella cascata di adesione tra cellule endoteliali e cellule infiammatorie durante l'infiammazione, nel facilitare la migrazione dei leucociti durante l'angiogenesi ed è stato riconosciuto per il suo ruolo angiogenico (Pusztaszeri et al 2006). In immunoistochimica, CD31 viene utilizzato principalmente per dimostrare la presenza di cellule endoteliali in sezioni di tessuto istologico.

CD34: è un 110-kDa glicoproteina transmembrana, è espressa sulla superficie delle cellule staminali linfematopoietiche (è espresso anche dalle cellule staminali del

cordone ombelicale e del midollo osseo) e sulle cellule progenitrici, cellule endoteliali dei piccoli vasi e fibroblasti embrionali ed alcune cellule del tessuto nervoso fetale ed adulto. L'antigene CD34 è presente anche sulle cellule endoteliali dei capillari e sulle cellule stromali del midollo osseo, follicoli piliferi, fasci muscolari, e ghiandole sudoripare (Jennings et al 2012; Pusztaszeri et al 2006). L'espressione di questo antigene è più alta nelle cellule staminali più primitive e viene progressivamente perso man mano che le cellule progenitrici si differenziano nei vari lineage. In immunocistochemica, CD34 viene utilizzato principalmente per dimostrare la presenza di cellule endoteliali in sezioni di tessuto istologico.

CK19: Le Citocheratine sono proteine dei filamenti intermedi contenenti cheratina, localizzate a livello del citoscheletro intracitoplasmatico dei tessuti epiteliali. I gruppi di citocheratine espressi da una cellula epiteliale dipendono principalmente dal tipo di epitelio al quale appartiene la cellula e dal suo stadio di sviluppo. Di conseguenza il tipo di citocheratina specifica espressa consente la classificazione di tutti gli epiteli in base al profilo di espressione delle citocheratine; il profilo espresso viene evidenziato tramite le tecniche di immunocistochemica. In particolare la CK19 appartiene al gruppo delle citocheratine acide.

Colorazione immunocistochemica delle cellule endometriali

I preparati di cellule endometriali canine in coltura (P3) sono state fissate in acetone per 10 minuti a 4°C, lasciate asciugare all'aria per 30 minuti e successivamente reidratate in PBS.

Per l'immunocitochimica sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: **CD31** (mouse anti human antibody della Dako); **CD34** (rabbit policlonal antibody della Santa Cruz); **CK 19** (mouse monoclonal antibody della Millipore) ed è stato seguito il seguente protocollo:

1. Inibizione della perossidasi endogena con H₂O₂ allo 0,3% in PBS per 12 minuti,
2. Lavaggio in tampone PBS, pH 7.4 (Sigma®)
3. Anticorpi primari (CD31 diluizione 1:50; CD34 diluizione 1:100; CK19 diluizione 1:100); diluiti in BSA all'1% in PBS, Sigma, incubati per 1 ora a temperatura ambiente;
4. Lavaggio in PBS;
5. Applicazione del sistema di rivelazione avidina-biotina-perossidasi (LSAB, DAKO);
6. Lavaggio in PBS;
7. Substrato cromogeno (DAB, DAKO) per 2-3 minuti;
8. Lavaggio in acqua distillata;
9. Contro colorazione con ematossilina di Mayer per 3 minuti;
10. Disidratazione in alcol, diafanizzazione in xilene e montaggio dei vetrini con Eukitt.

Per l'immunoistochimica sulle sezioni istologiche è stato seguito il seguente protocollo:

1. Sezioni in H₂O distillata;
2. Immersione delle sezioni in tampone citrato a pH 6.2 pre-riscaldato;
3. 3 cicli di 5 minuti a 360Watt in MW;
4. Raffreddamento delle sezioni per 20 minuti a temperatura ambiente;
5. Lavaggio in H₂O distillata;
6. Inibizione della perossidasi endogena con H₂O₂ al 3% in PBS per 12 minuti;
7. Lavaggio in tampone PBS, pH 7.4 (Sigma®)
8. Incubazione delle sezioni da sottoporre a immunocolorazione con il marker CD34, in siero non immune di capra diluito 1:10 in PBS per 20 minuti, utilizzando il siero della stessa specie in cui è prodotto l'anticorpo secondario;
9. Incubazione dell'anticorpo primario in camera umida overnight a 4°C; CD31, CD34, CK19 sono stati utilizzati alla diluizione di 1:50 per il CD31, 1:100 per CK19, 1:200 per CD34 in BSA all'1% in PBS;
10. Riportate le sezioni a temperatura ambiente, dopo un'ora sono stati eseguiti 3 lavaggi seriali in PBS per 5 minuti;
11. Anticorpo secondario goat anti-rabbit biotinilato (diluito 1:200 in PBS) per 30 minuti per il marker CD34;
12. Anticorpo secondario goat anti-mouse biotinilato (diluito 1:200 in PBS) per 30 minuti per i markers CD31 e CK19;

13. Lavaggio in PBS;
14. Applicazione del sistema di rivelazione avidina-biotina-perossidasi (ABC, Vector);
15. Lavaggio in PBS;
16. Soluzione cromogenica DAB (DAKO) per 2-3 minuti;
17. Lavaggio in acqua distillata;
18. Contro colorazione con ematossilina di Mayer per 3 minuti;
19. Disidratazione, diafanizzazione in xilene e montaggio dei vetrini con Eukitt.

RISULTATI

Le indagini istopatologiche hanno permesso di confermare la diagnosi ecografica dei tre campioni di utero in esame; nelle sezioni istologiche di Praline si evidenziano lievi fenomeni di iperplasia endometriale cistica, caratterizzata da ectasia ghiandolare che interessa poche unità ghiandolari e scarsi infiltrati di linfociti e plasmacellule nella zona funzionale e basale dell'endometrio. Anche Anais mostra il coinvolgimento non generalizzato delle ghiandole endometriali (iperplasia endometriale cistica localizzata), con presenza di infiltrati di linfomononucleati nella zona funzionale e basale dell'endometrio. Nelle sezioni della parete uterina di Anais si osservano anche fenomeni di adenomiosi con presenza di strutture ghiandolari nello spessore del miometrio (Schlafer et al, 2008). Infine le sezioni istologiche della parete uterina di Molly evidenziano fenomeni di iperplasia endometriale cistica localizzata, infiltrati di linfociti e plasmacellule nella zona funzionale e basale dell'endometrio e un essudato caratterizzato da granulociti neutrofili e detriti cellulari nel lume uterino.

Le indagini immunohistochimiche condotte sui campioni istologici di utero hanno evidenziato positività degli epitelii, sia ghiandolari sia di rivestimento, al marker CK19 e positività a livello degli endoteli vascolari dei marker CD31 e CD34.

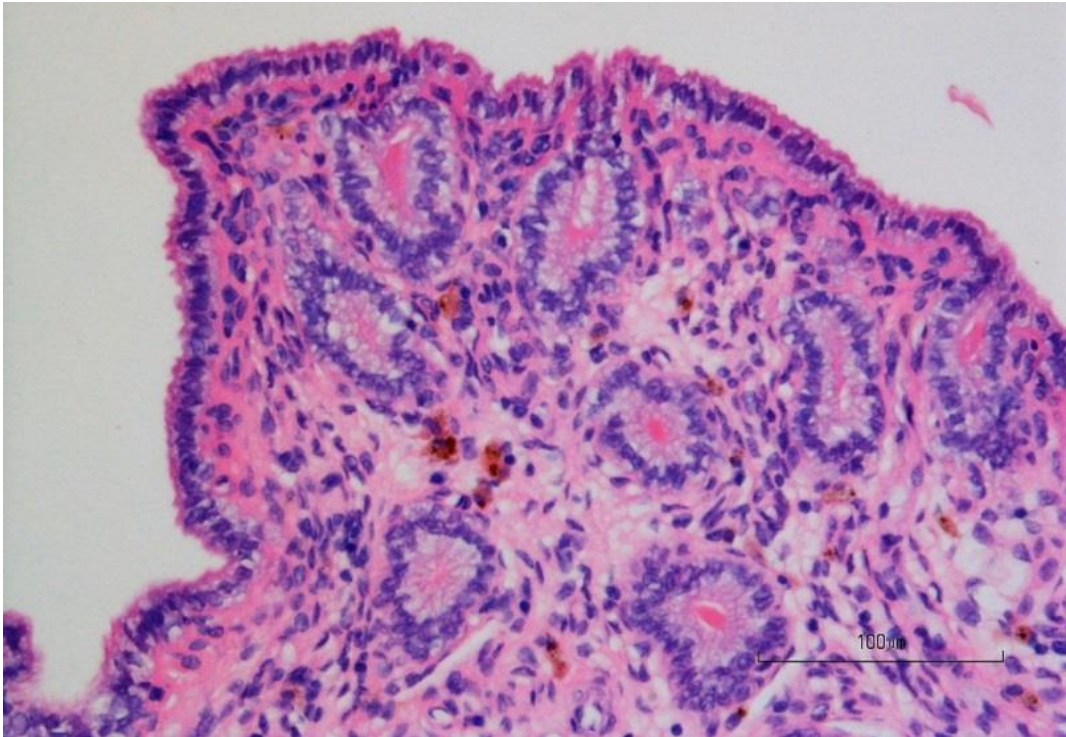


Fig. 28. 10x EE. Cellule epiteliali che rivestono l'endometrio normo-strutturato.

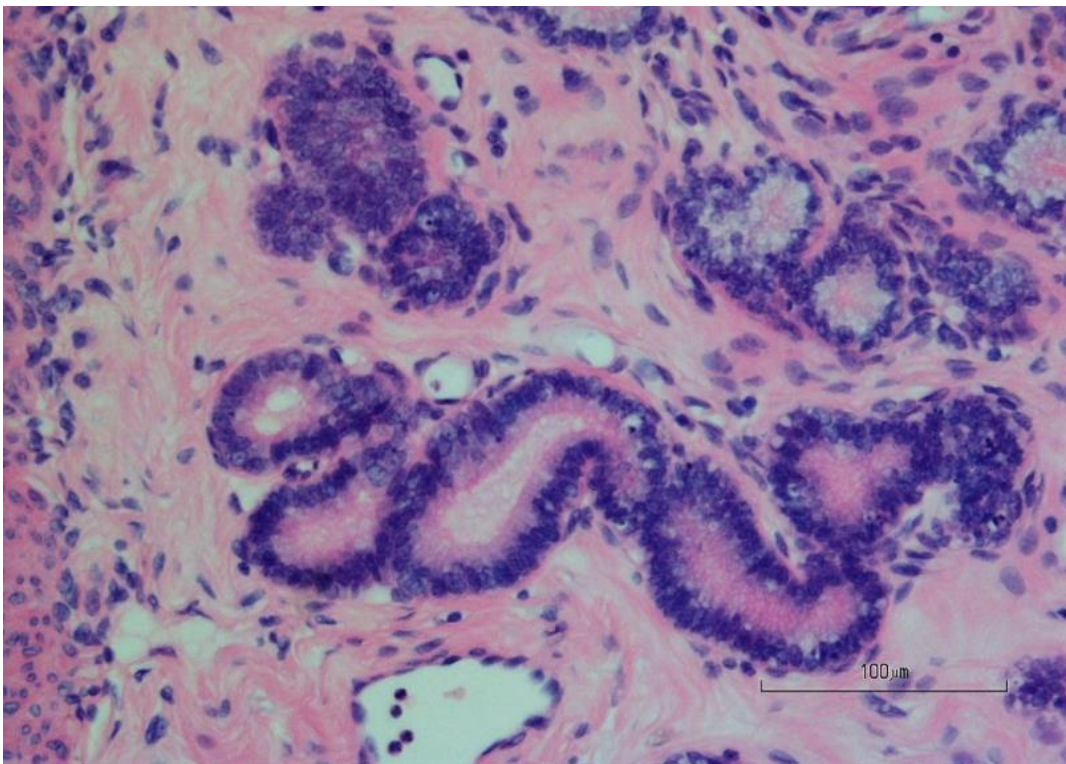


Fig. 29. 20x EE. Particolare figura precedente, presenza di diverse formazioni ghiandolari nella zona basale endometriale.

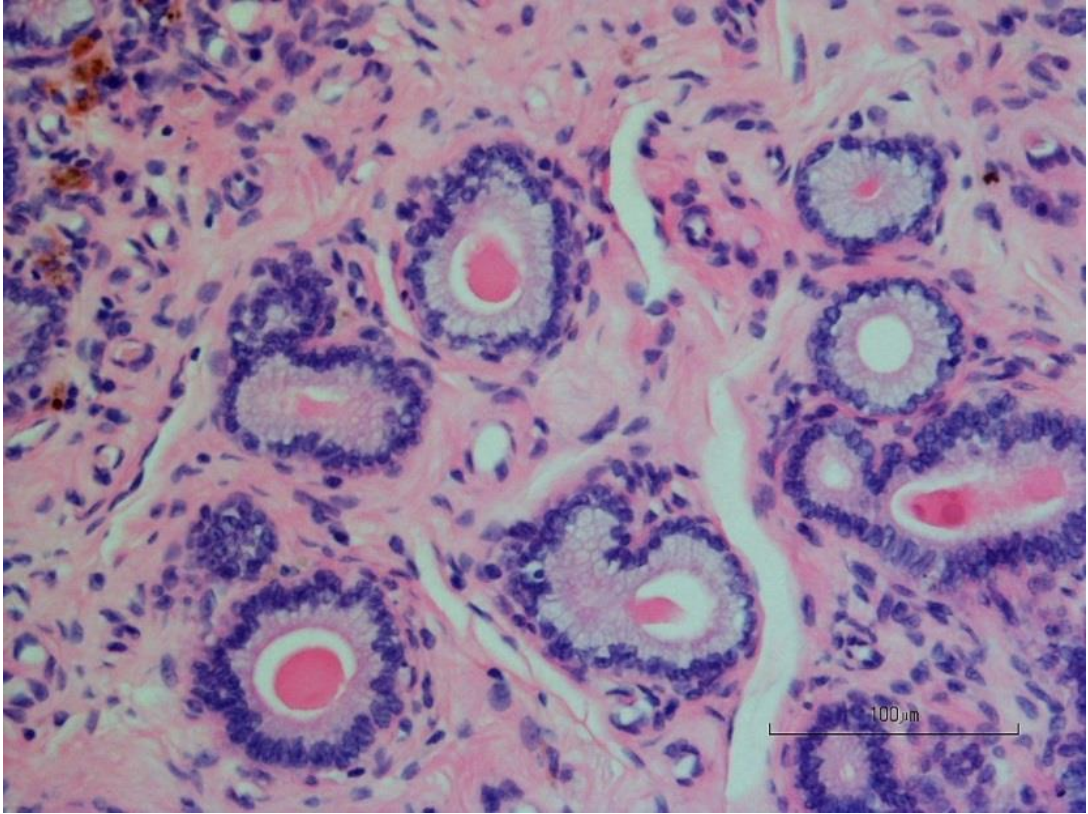


Fig. 30. 10x EE. Ghiandole endometriali fisiologiche.

ANAIS: ectasia endometriale cistica ed endometrite subacuta lieve. (*Grado 2 secondo Marcato, 2015*)

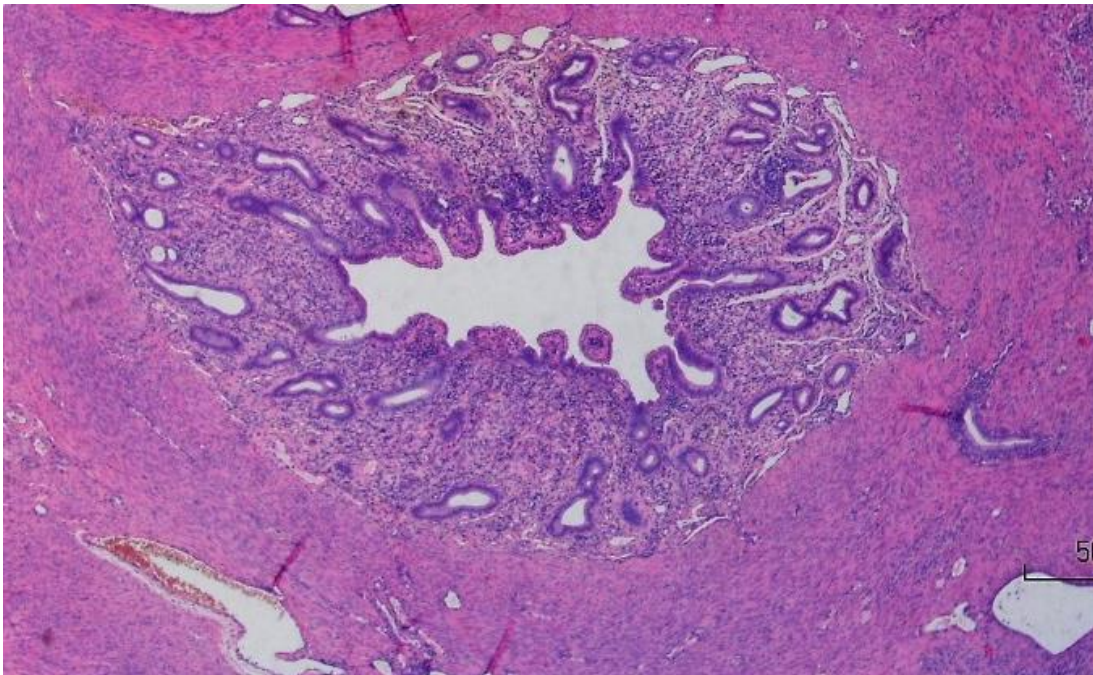


Fig. 31. Sezione istologica di utero- Anais, 2x EE: A piccolo ingrandimento si evidenziano strutture ghiandolari ectasiche.

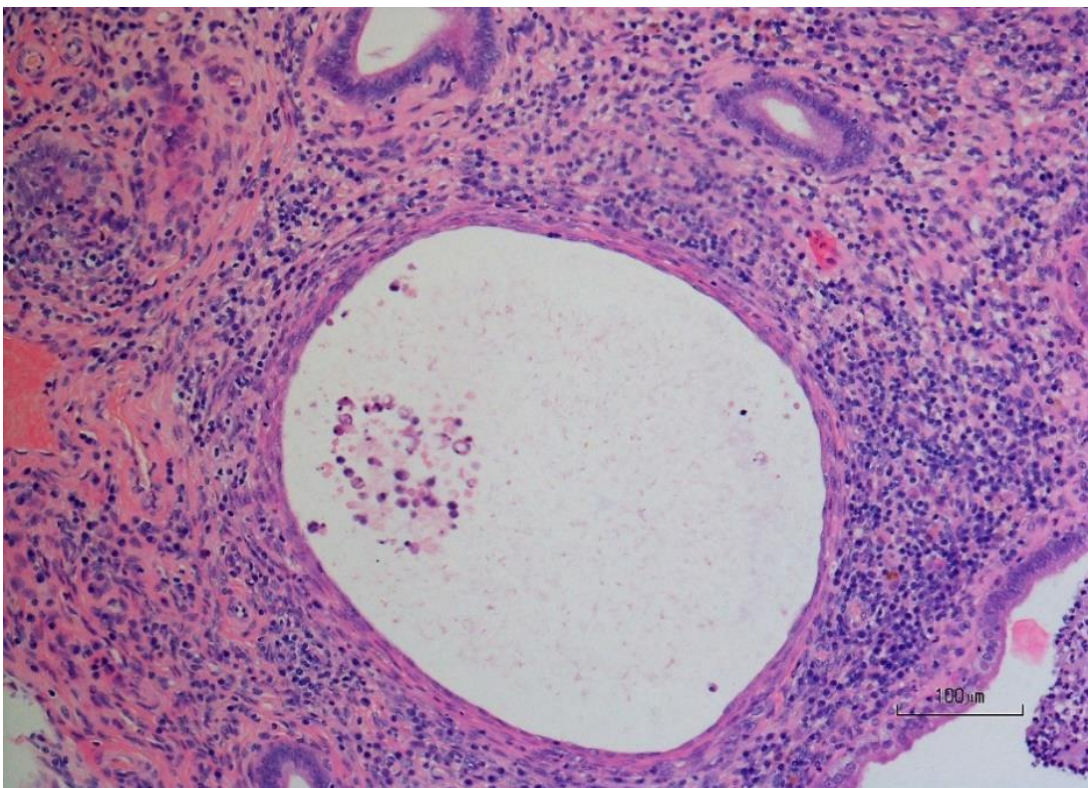


Fig. 32. 10x EE. Sezione istologica di utero- Anais. Ghiandola endometriale ectasica con secreto scarsamente cellulato. La lamina propria appare infiltrata da numerosi linfociti e plasmacellule.

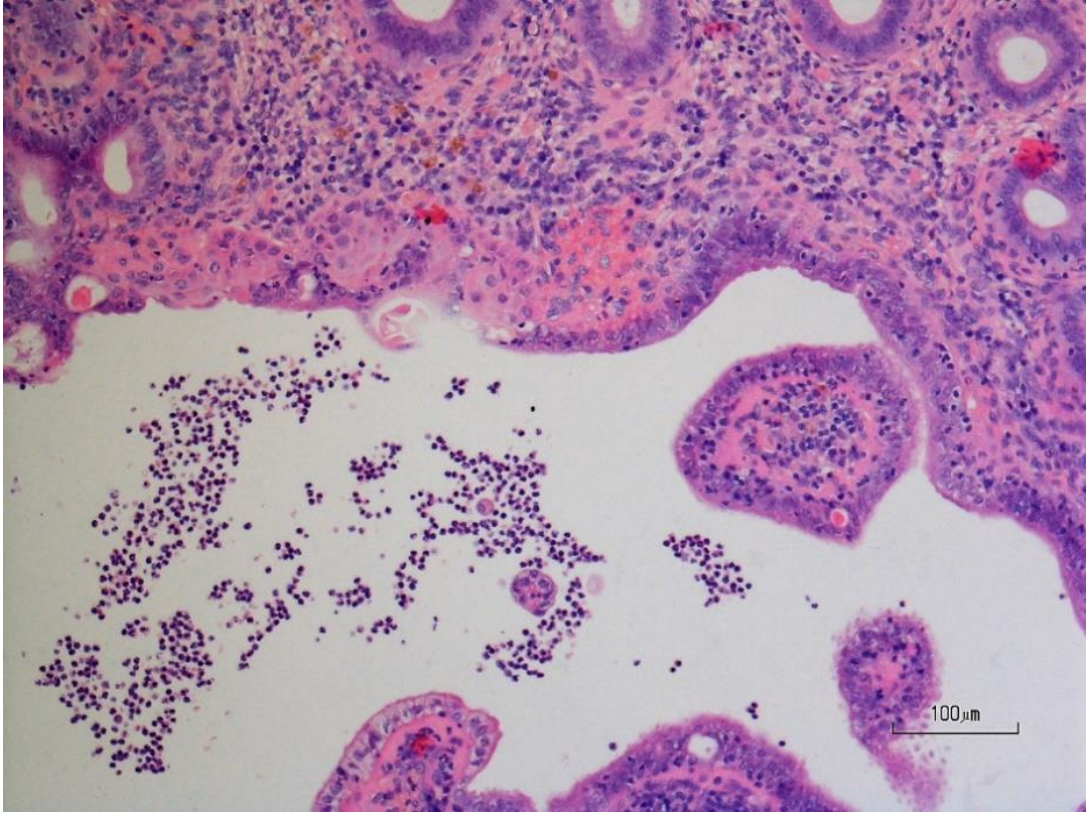


Fig. 33. 10x EE. Sezione istologica di utero-Anais Si evidenziano rari fenomeni di metaplasia squamosa dell'epitelio e nel lume uterino infiltrati di granulociti neutrofili.

PRALINE: lieve iperplasia endometriale cistica. (*Grado 1 secondo Marcato, 2015*)

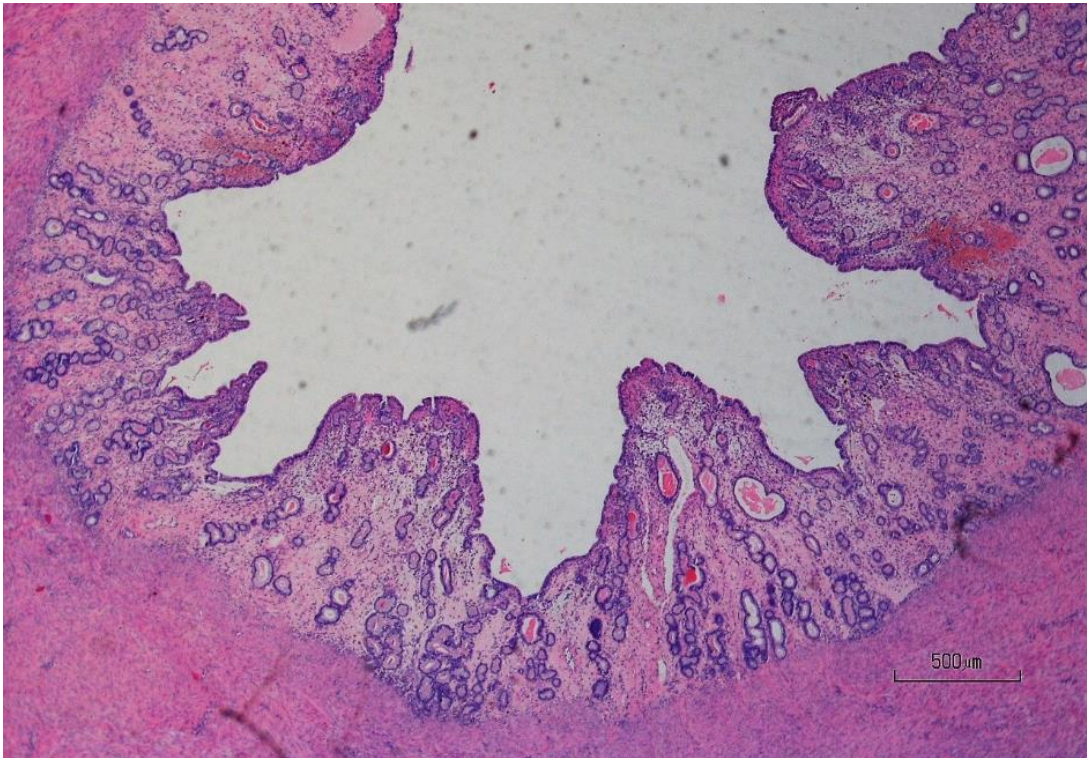


Fig. 34. Sezione istologica di utero, Praline2x EE. Ectasia localizzata delle ghiandole endometriali che presentano secreto eosinofilo e lieve infiltrazione di cellule infiammatorie nello stroma.

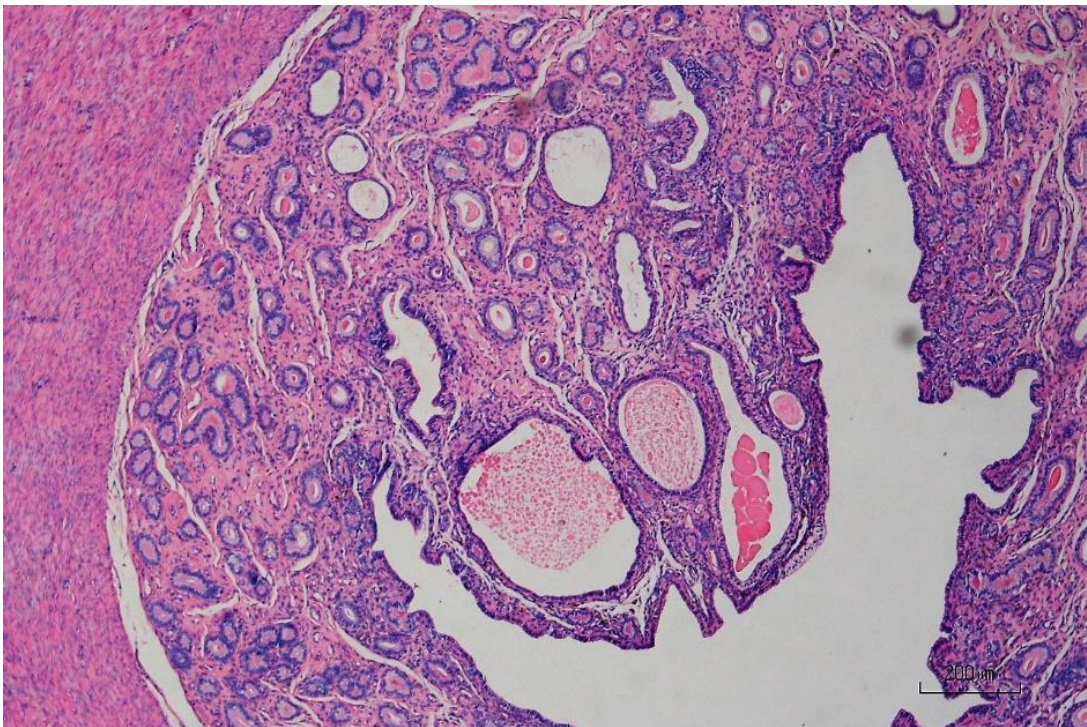


Fig. 35. Sezione istologica di parete uterina. Praline, 4x EE. Particolare figura precedente, A maggiore ingrandimento è possibile osservare l'ectasia ghiandolare cistica.

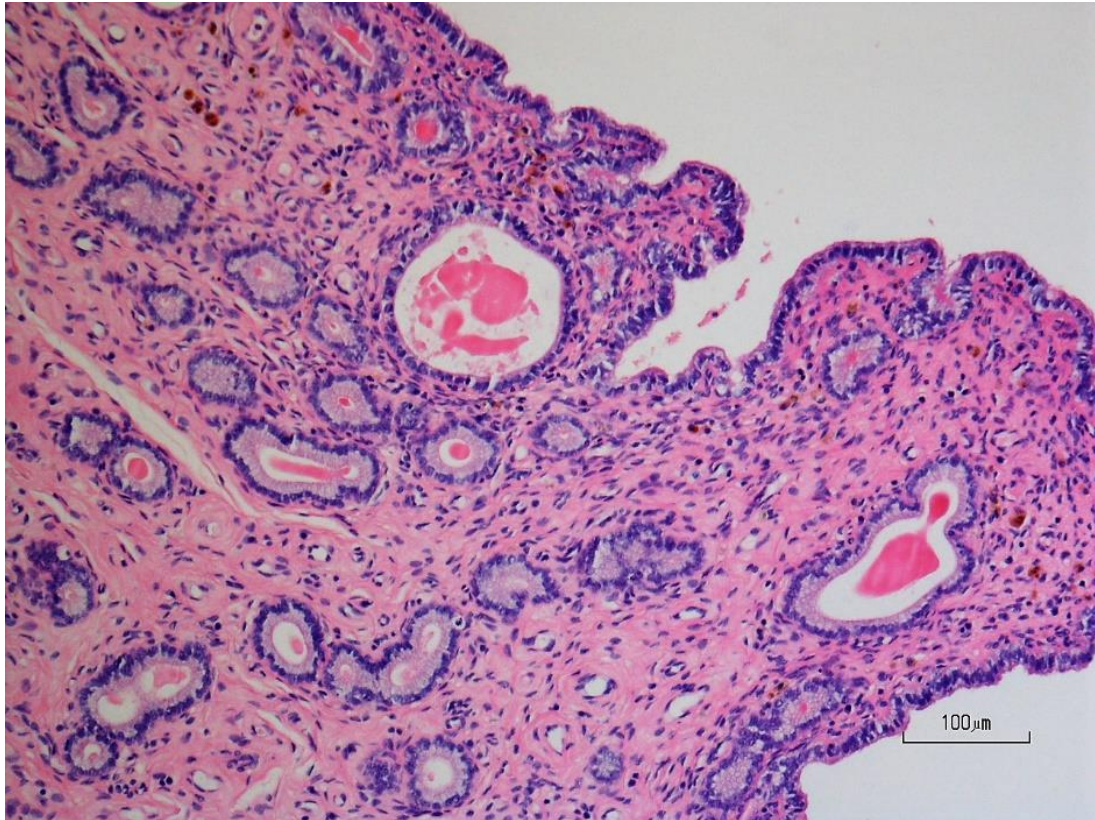


Fig. 36. Sezione istologica di parete uterina. Praline, 10x EE. Particolare figura precedente. Si osserva ectasia ghiandolare localizzata e scarsi infiltrati nella zona funzionale e basale.

MOLLY: Grado 3. Iperplasia endometriale cistica localizzata e endometrite acuta con presenza di massivi infiltrati di granulociti neutrofili e detriti necrotici nel lume uterino.

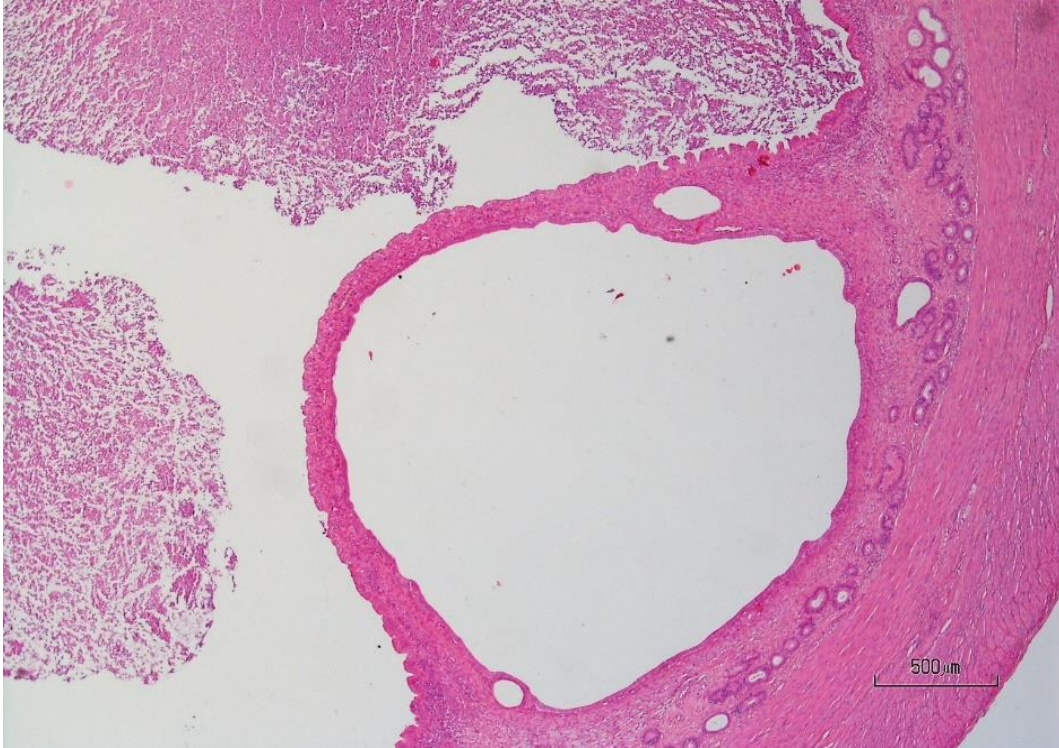


Fig. 37. Sezione istologica di parete uterina. Molly- EE 2x. Essudato purulento nel lume uterino e dilatazione cistica localizzata delle ghiandole endometriali.

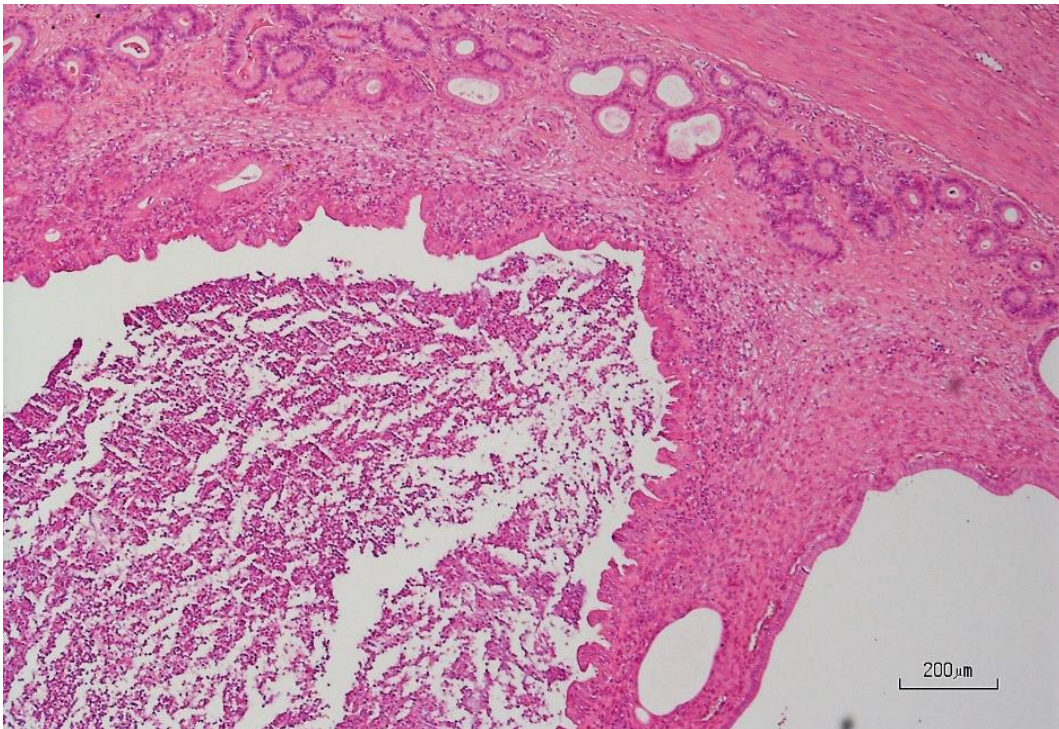


Fig. 38. Sezione istologica di parete uterina. Molly EE. 4x. particolare dell'immagine precedente.

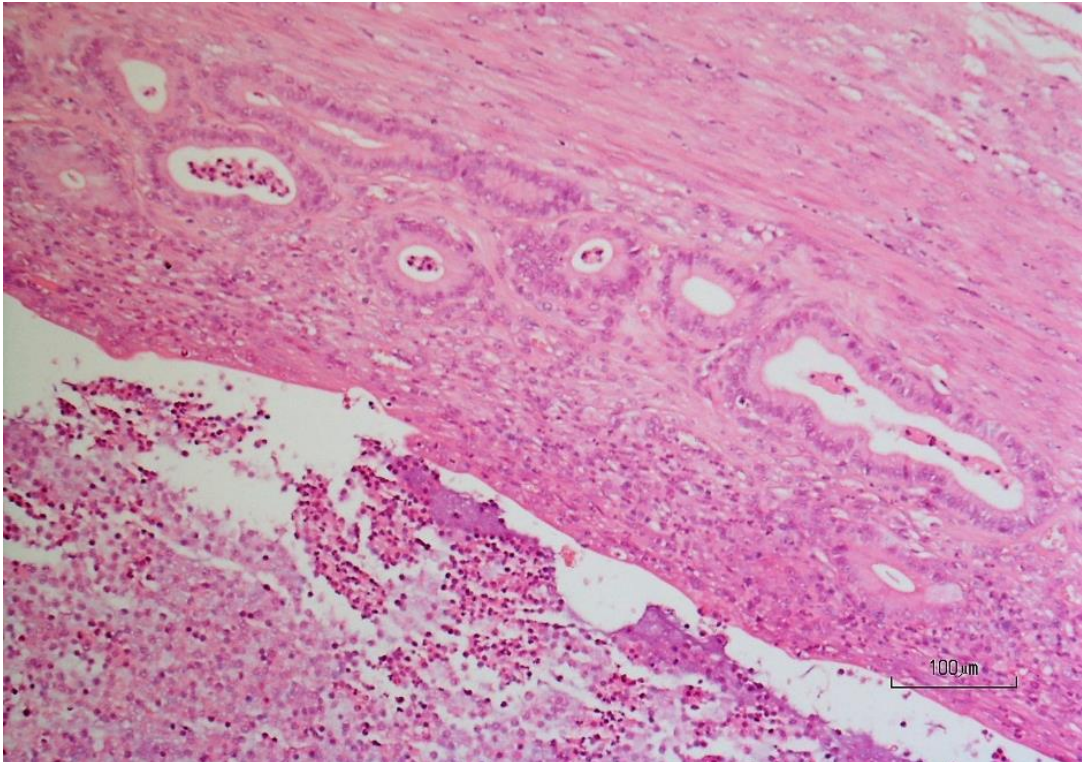


Fig. 39. Sezione istologica di parete uterina. Molly EE 10x. Presenza nel lume uterino e nelle ghiandole endometriali di essudato costituito da granulociti neutrofili e detriti cellulari.

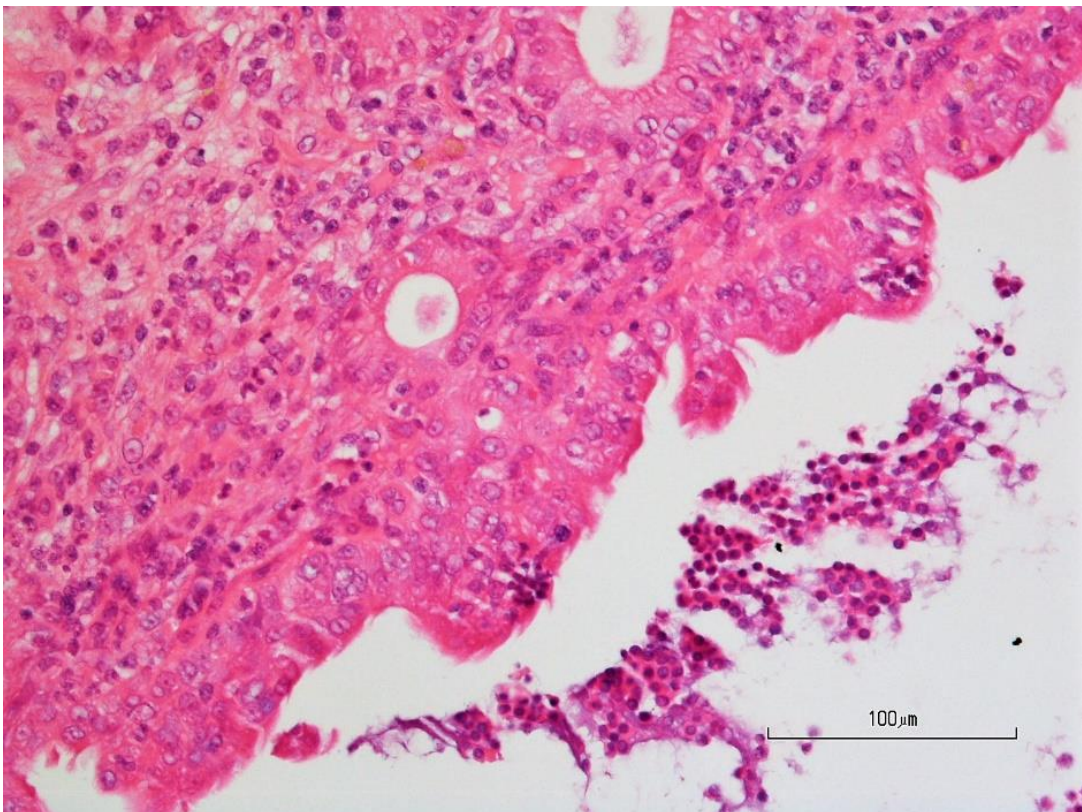


Fig. 40. Sezione istologica di utero- Molly- E 20x. Presenza nel lume uterino di detriti cellulari e granulociti neutrofili.

Risultati colture cellulari

Al termine del periodo di differenziazione, per entrambi gli animali analizzati (Anais e Praline), non sono state riscontrate differenze significative tra i campioni trattati ed i campioni di controllo. Di conseguenza i campioni cellulari ottenuti da cagne affette da iperplasia endometriale cistica non hanno mostrato plasticità cellulare.

Le cellule hanno evidenziato una morfologia fusata similfibroblastica con scarso citoplasma e nucleo centrale ovalare o rotondeggiante. La caratterizzazione fenotipica è stata effettuata con i marker CK19, CD31 e CD34.

Il marker CK19 è risultato negativo in tutti i campioni cellulari esaminati, confermando la corretta differenziazione delle cellule in coltura in elementi mesenchimali, negativi alle citocheratine; il marker CD31 ha mostrato una scarsa o debole immunocolorazione in tutti i campioni cellulari esaminati, mentre CD34, espresso dalle cellule endoteliali, emolinfopoietiche e dai fibroblasti immaturi, ha presentato una colorazione più intensa nei campioni cellulari ottenuti soprattutto da Anais rispetto a quelli di Praline, con localizzazione intracitoplasmatica. Da queste prime indagini emerge come queste cellule mostrino un fenotipo che le accomuna a tipi cellulari endoteliali/pericitici anche se sono necessari ulteriori saggi immunohistochimici per determinare il potenziale differenziativo e il fenotipo di cellule endometriali mesenchimali (MSC) di soggetti con patologie endometriali di diversa gravità.

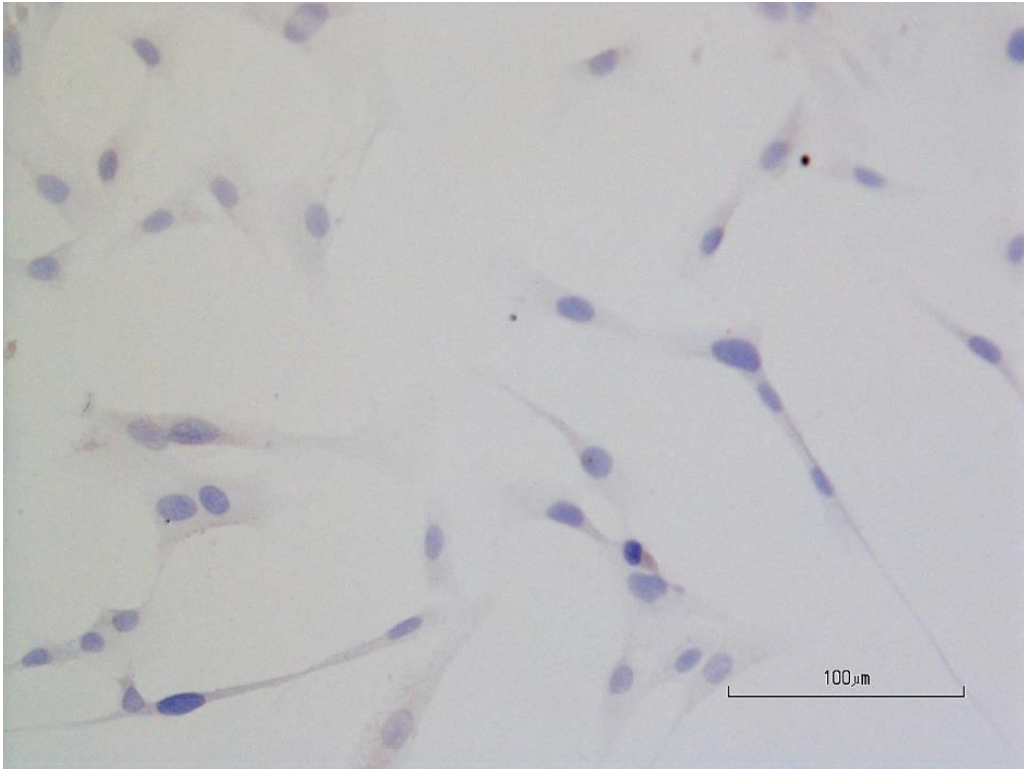


Fig. 41. CK 19 Anais. 20x. Le cellule mostrano una morfologia simifibroblastica ed evidenziano assenza di immunocolorazione per il marker CK19.

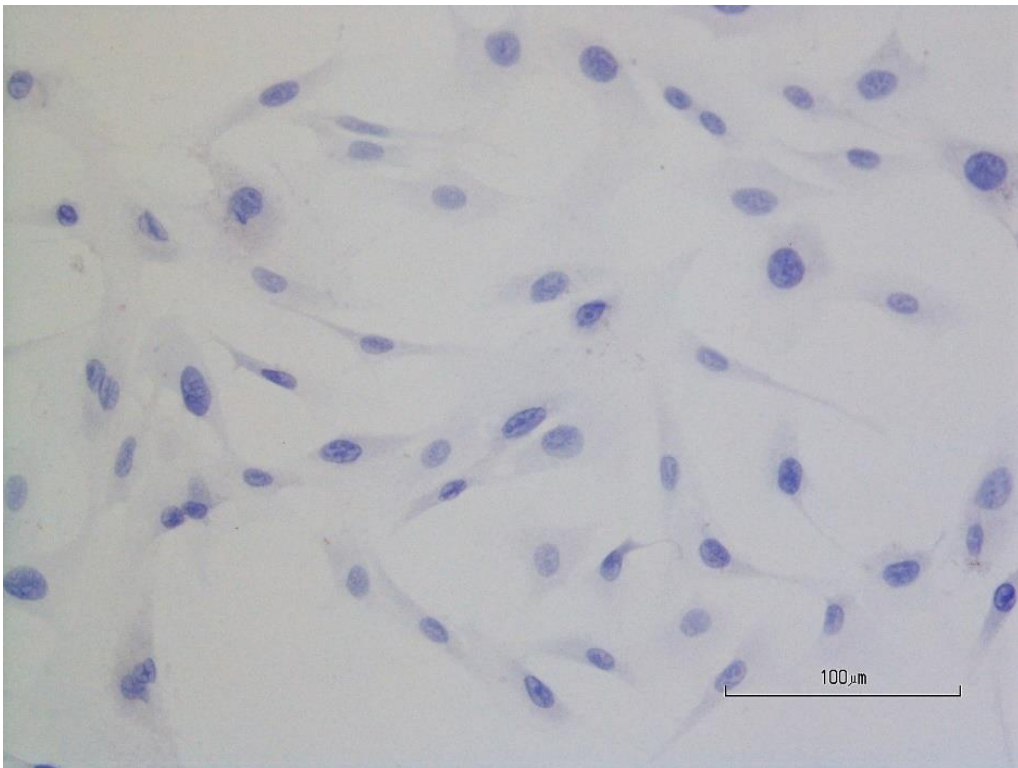


Fig. 42. CK 19 Praline. 20x. Non si osserva immunocolorazione delle cellule per il marker CK19

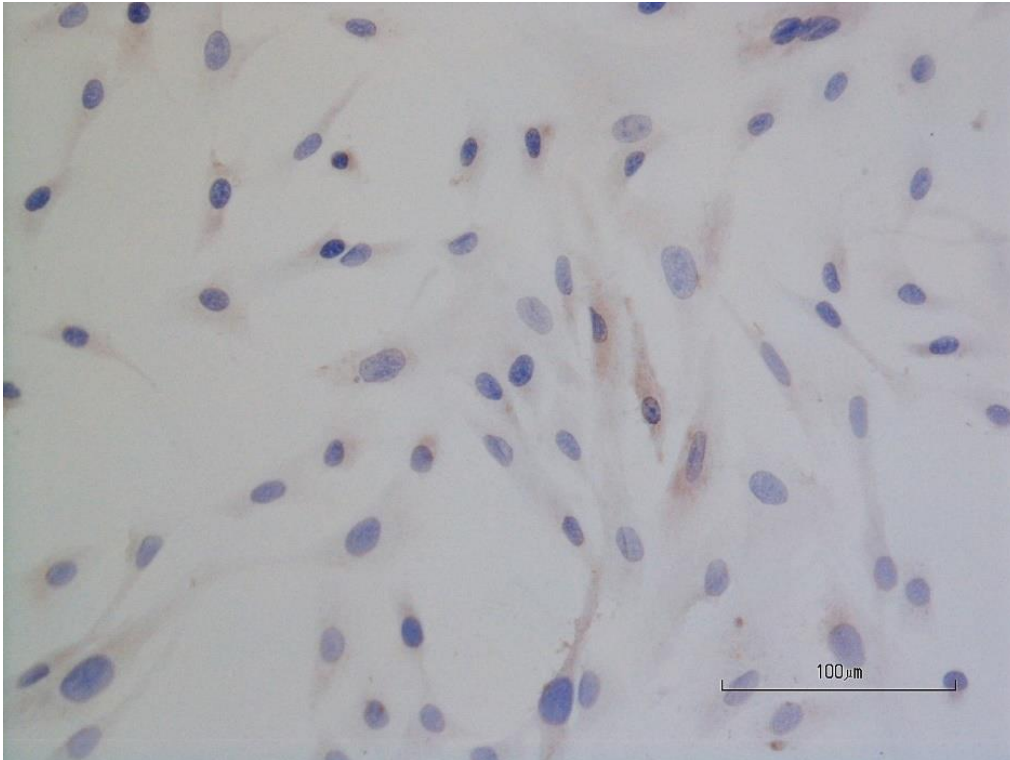


Fig. 43. CD31 Anais. 20x. Debole immuno colorazione di alcuni elementi cellulari per CD31.

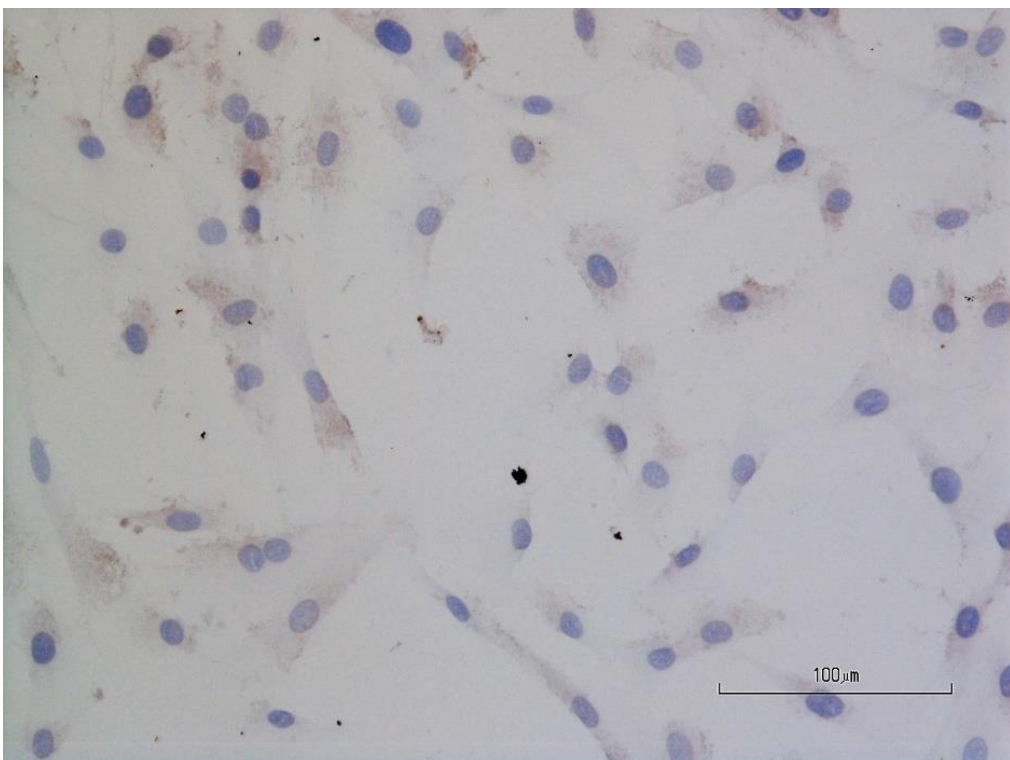


Fig. 44. CD31- Praline. 20x. Scarsa o assente immunocolorazione delle cellule mesenchimali endometriali al marker CD31.

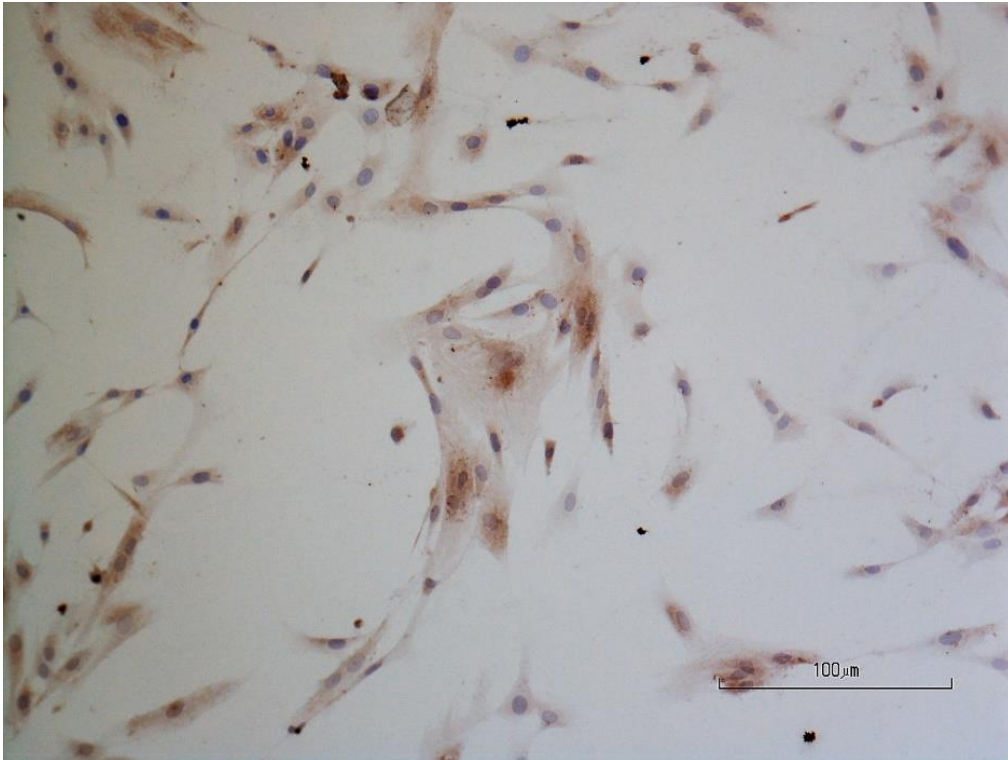


Fig. 45. CD34 Anais. 10x. Numerose cellule mesenchimali endometriali mostrano positività al marker CD34.

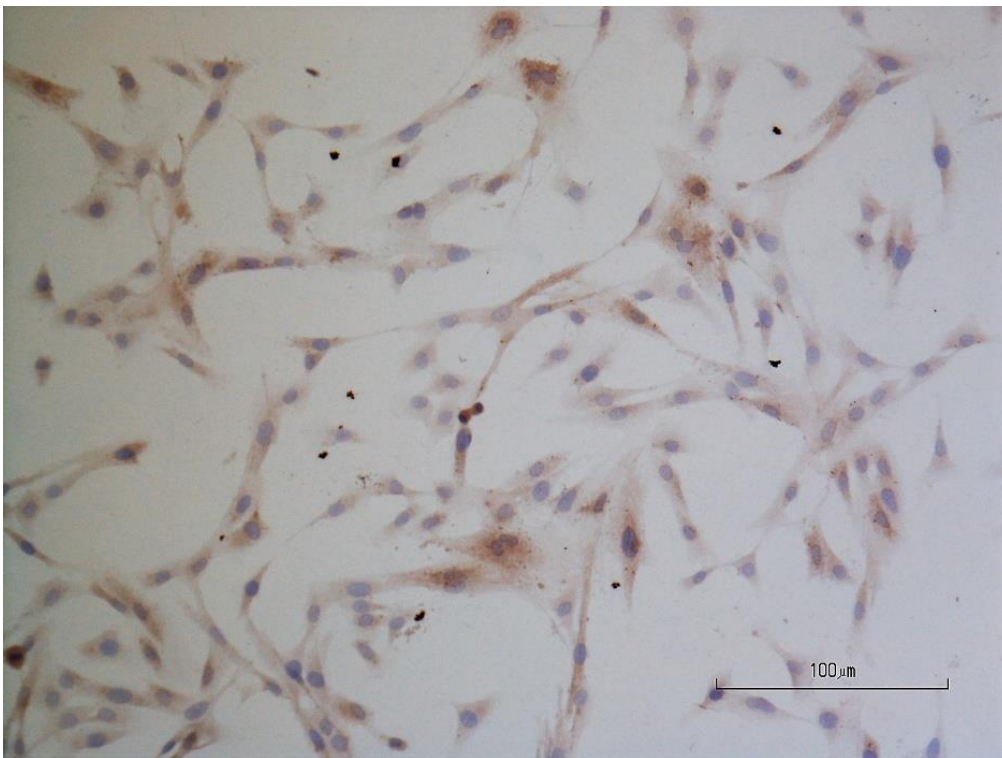


Fig. 46. CD34 Praline. 10x Diverse cellule mesenchimali endometriali appaiono positive al marker CD34

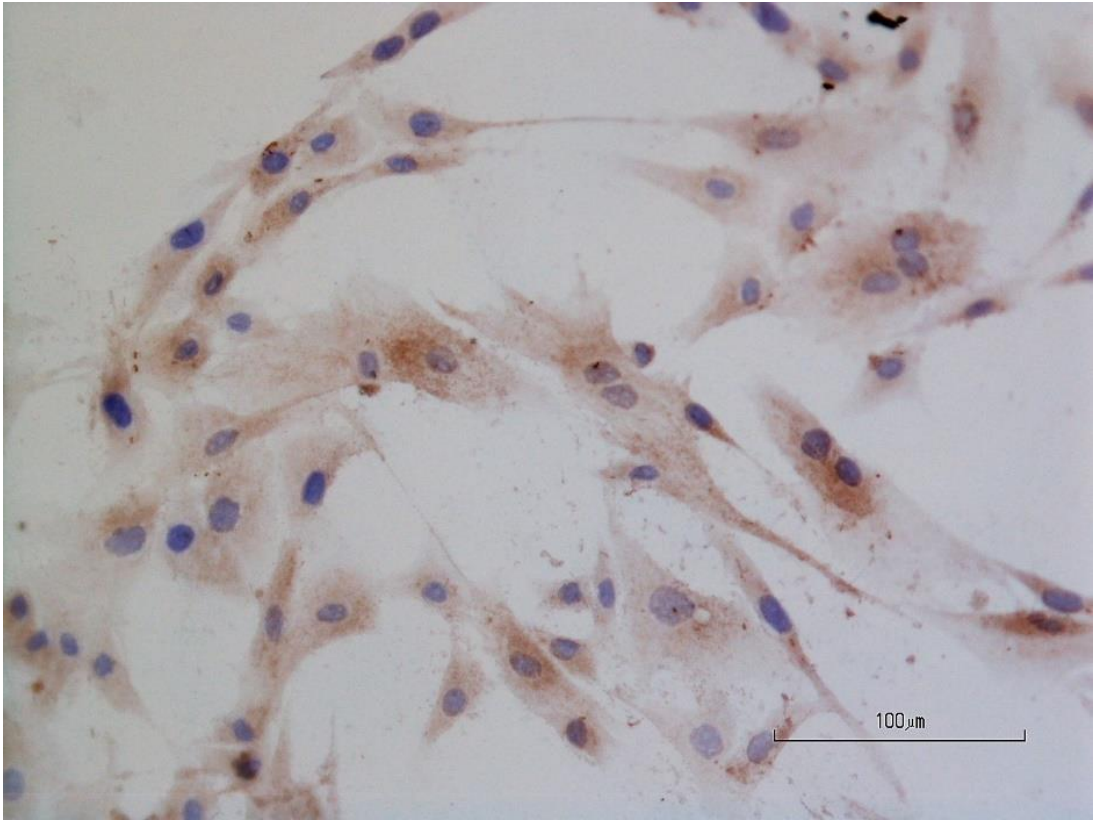


Fig.47. CD34 Anais 20x- espressione citoplasmatica del marker CD34

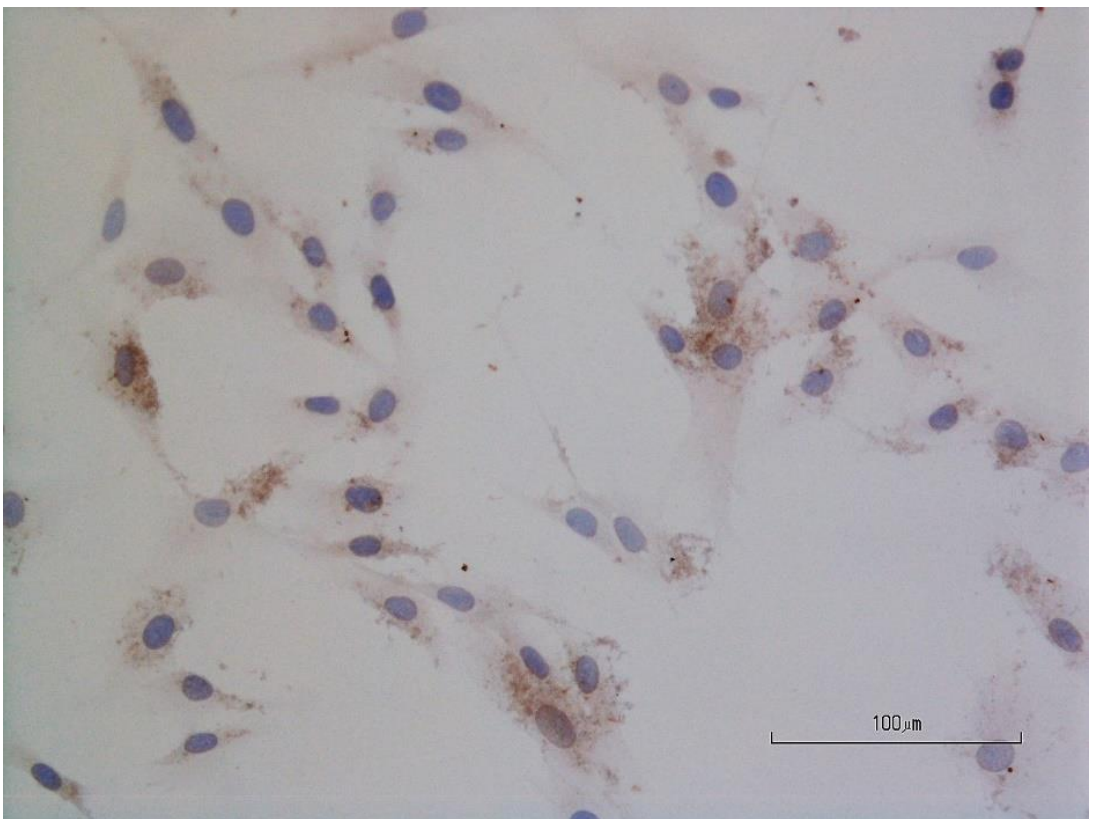


Fig. 48. CD34 Praline. 20x. Debole espressione citoplasmatica del marker CD34

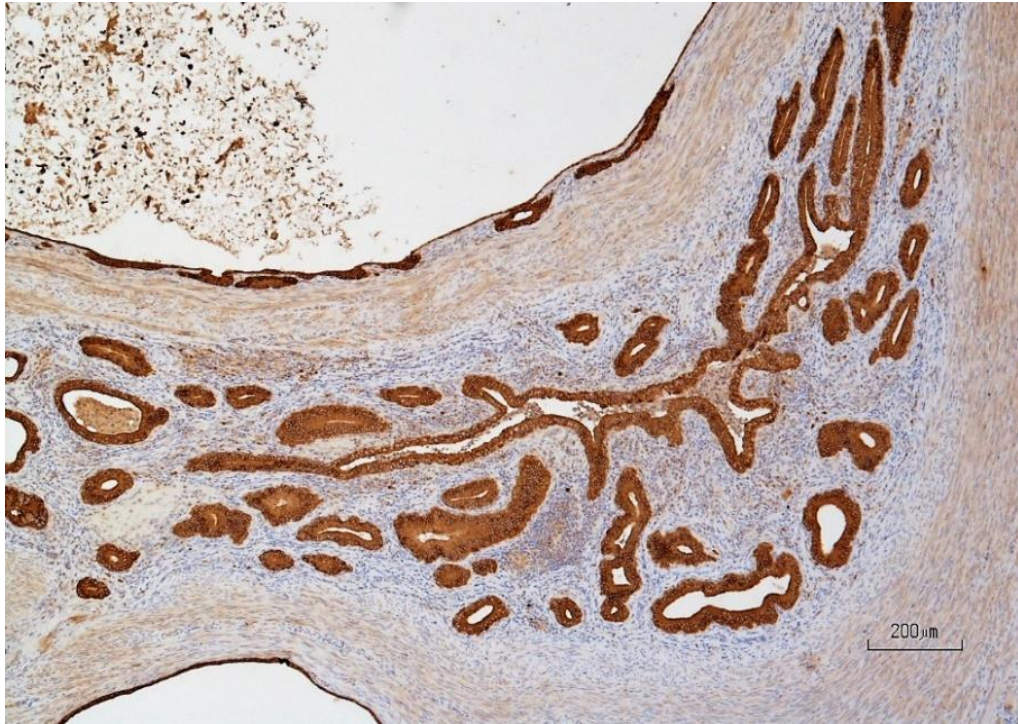


Fig. 49. CK19, Anais, 4x. a piccolo ingrandimento l'epitelio ghiandolare esprime un'intensa colorazione immunoistochimica per CK19, marker di numerosi epiteli ghiandolari.

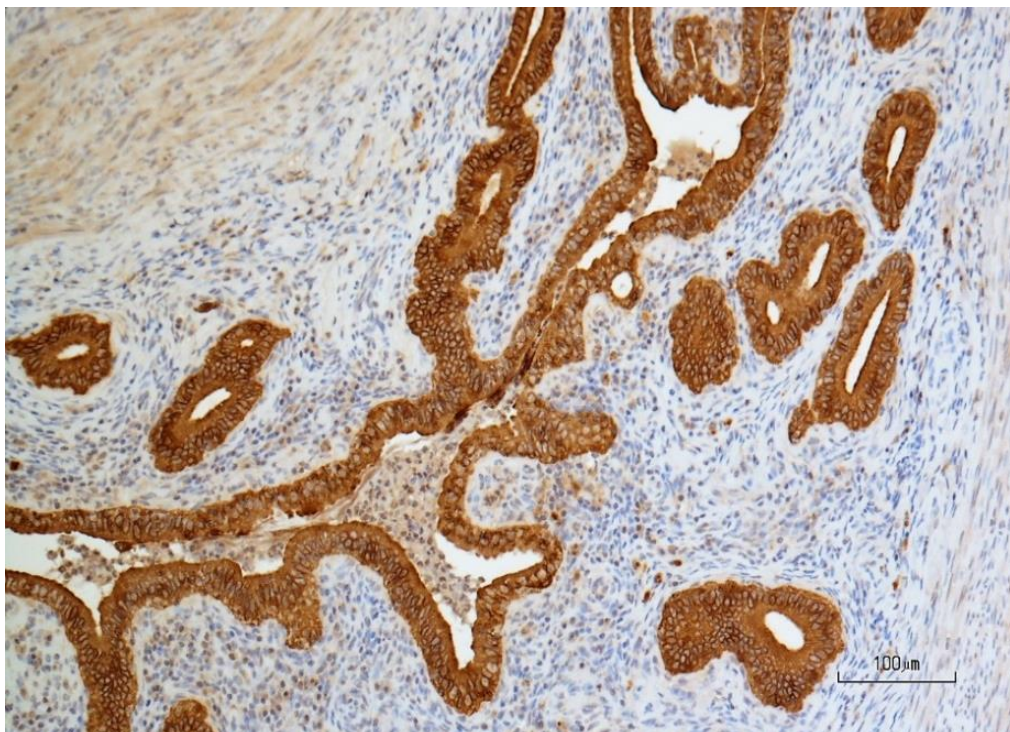


Fig. 50. CK19, Anais, 10x. A più forte ingrandimento l'epitelio ghiandolare e l'epitelio di superficie mostrano forte positività alla citocheratina 19.

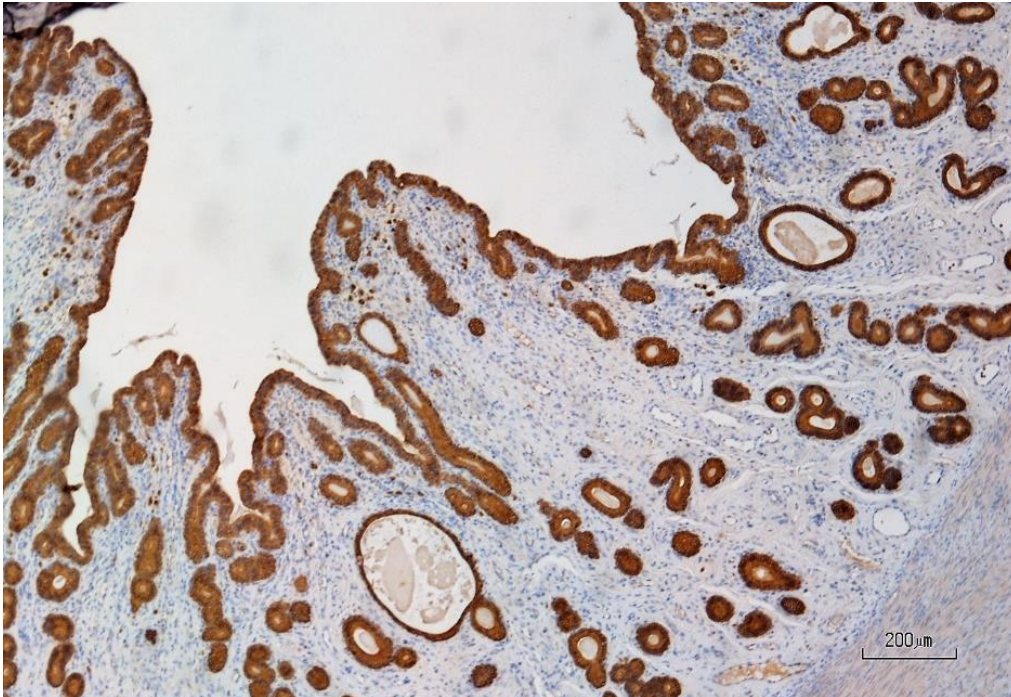


Fig. 51. CK19, Praline, 4x. A piccolo ingrandimento forte positività alla citocheratina 19 dell'epitelio ghiandolare e di rivestimento dell'endometrio.

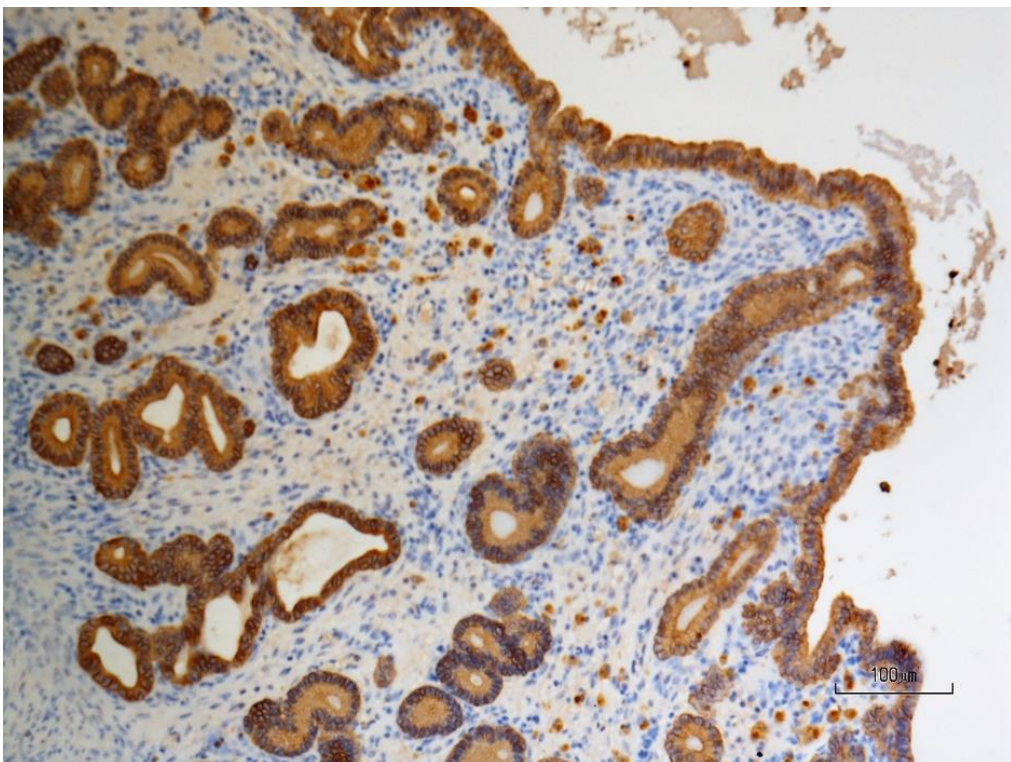


Fig. 52. CK19, Praline, 10x. Particolare della figura precedente.

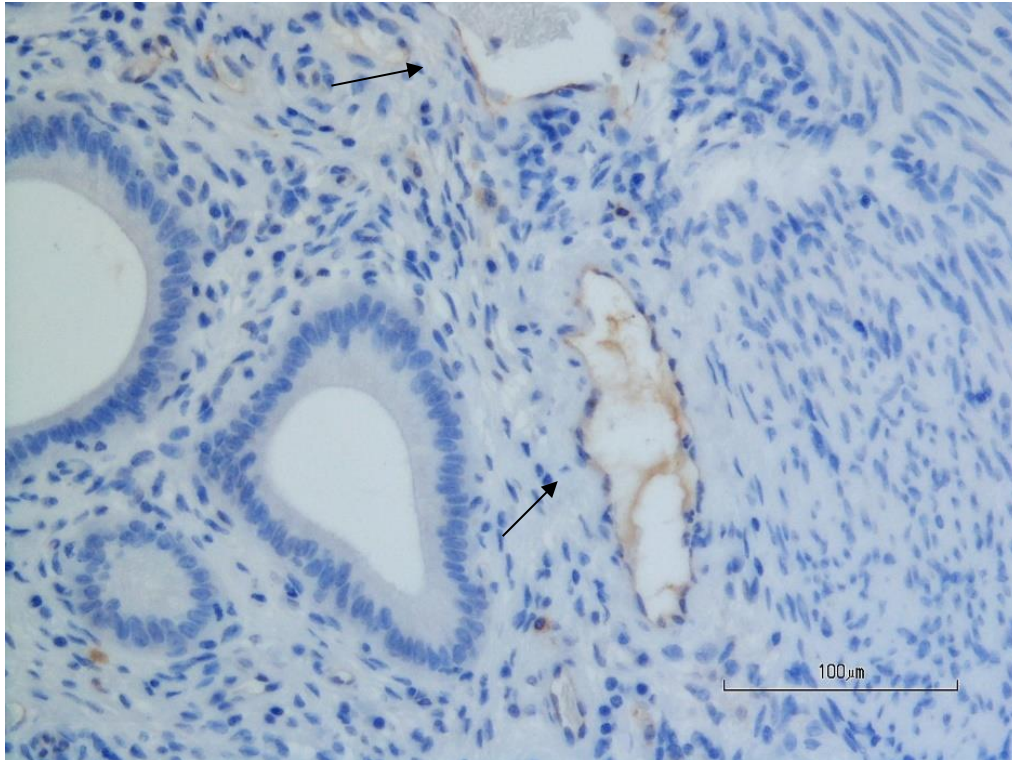


Fig. 53. CD31, Anais, 20x. Positiv  delle cellule endoteliali dell'endometrio al marker CD31.

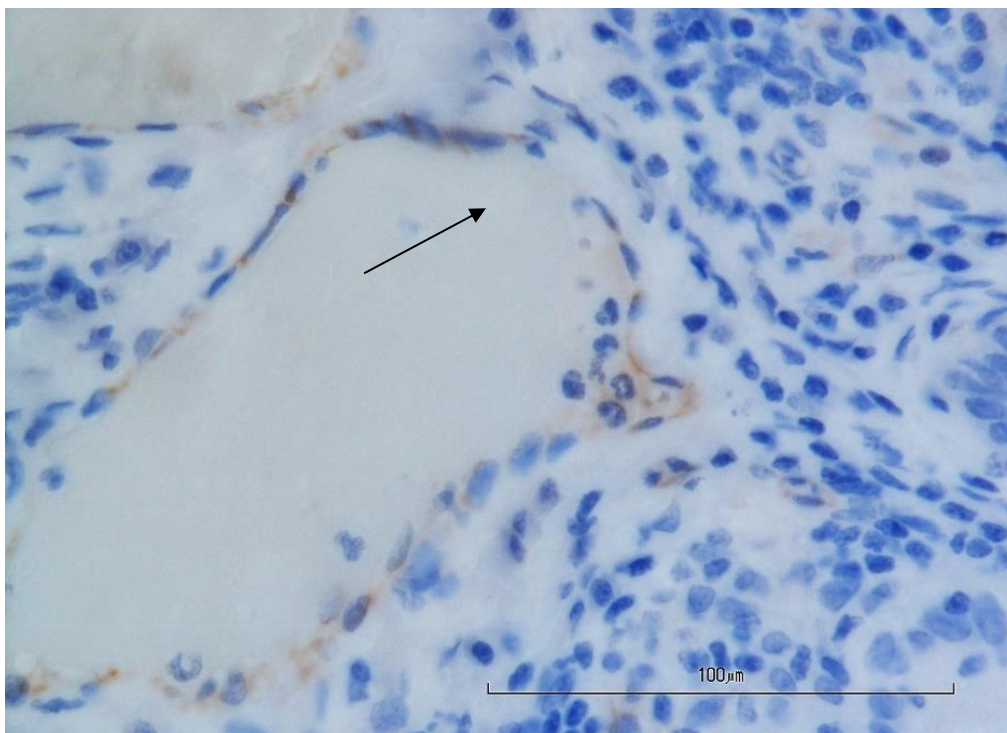


Fig. 54. CD31, Anais, 40x. Particolare di vaso ematico dell'endometrio con endotelio positivo a CD31.

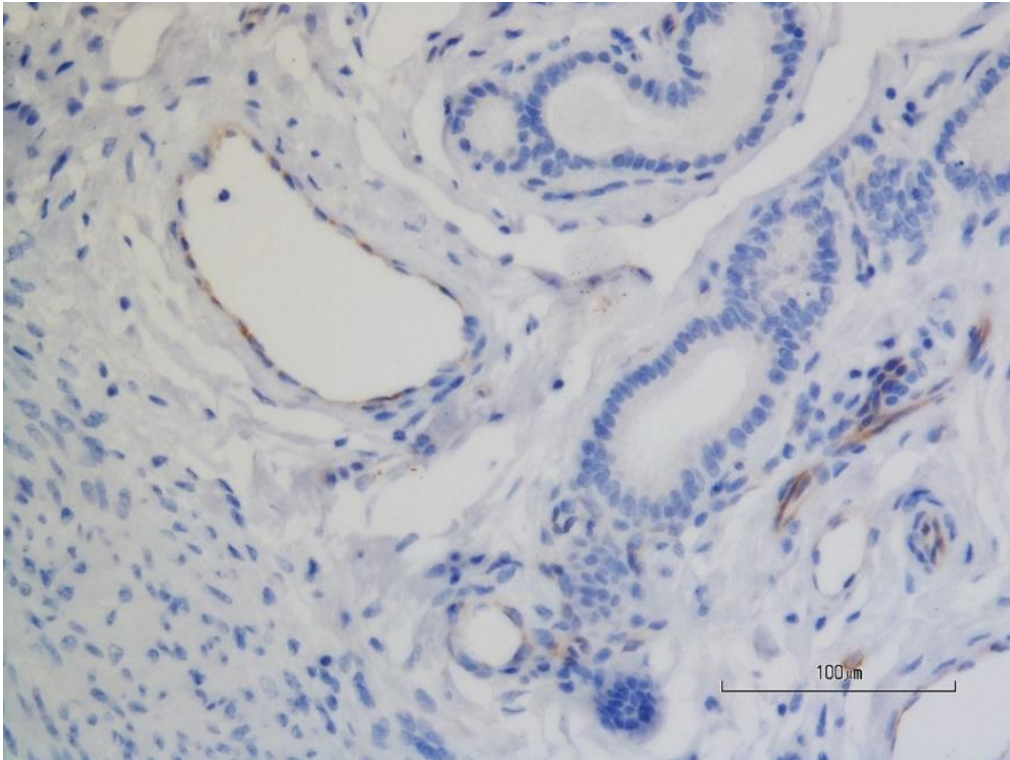


Fig. 55. CD31, Praline, 20x. Si evidenzia positività delle cellule endoteliali dell'endometrio al marker CD31.

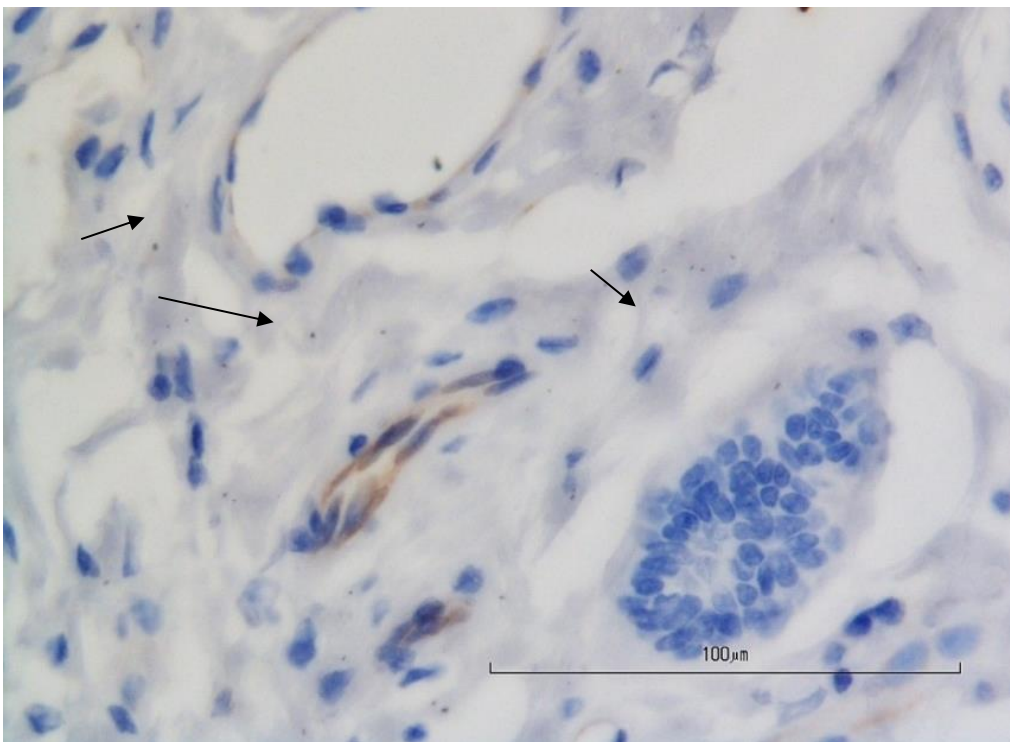


Fig. 56. CD31, Praline, 40x. Particolare della figura precedente.

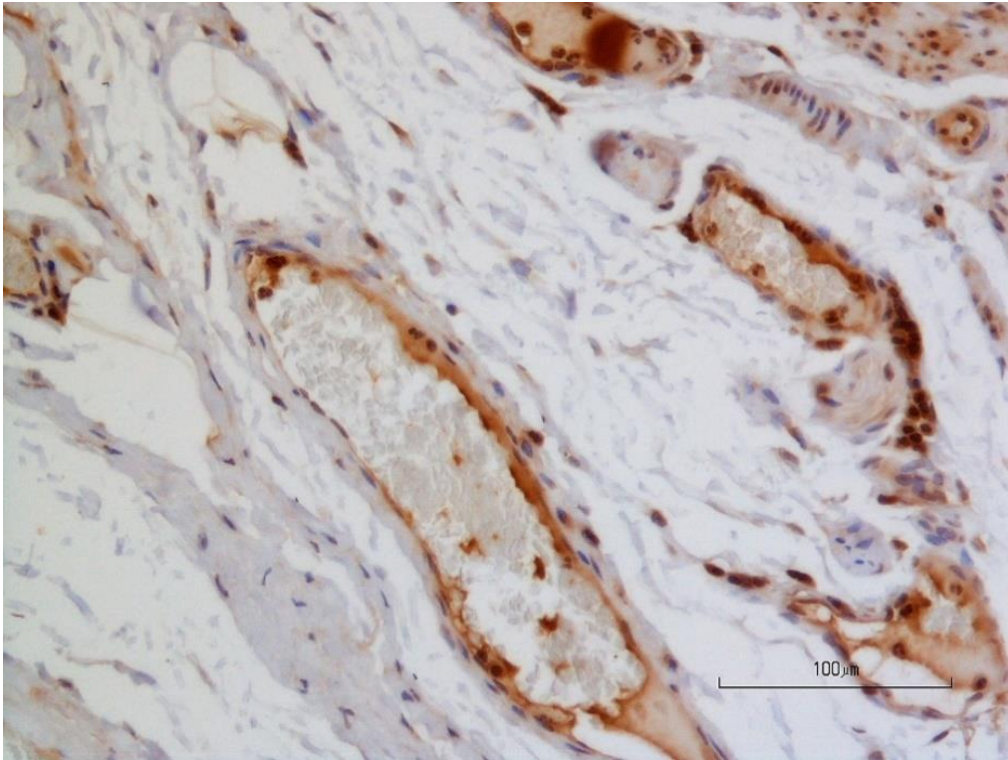


Fig. 57. CD34, Anais, 20x. Forte positività dell'endotelio vascolare dell'endometrio al marker CD34.

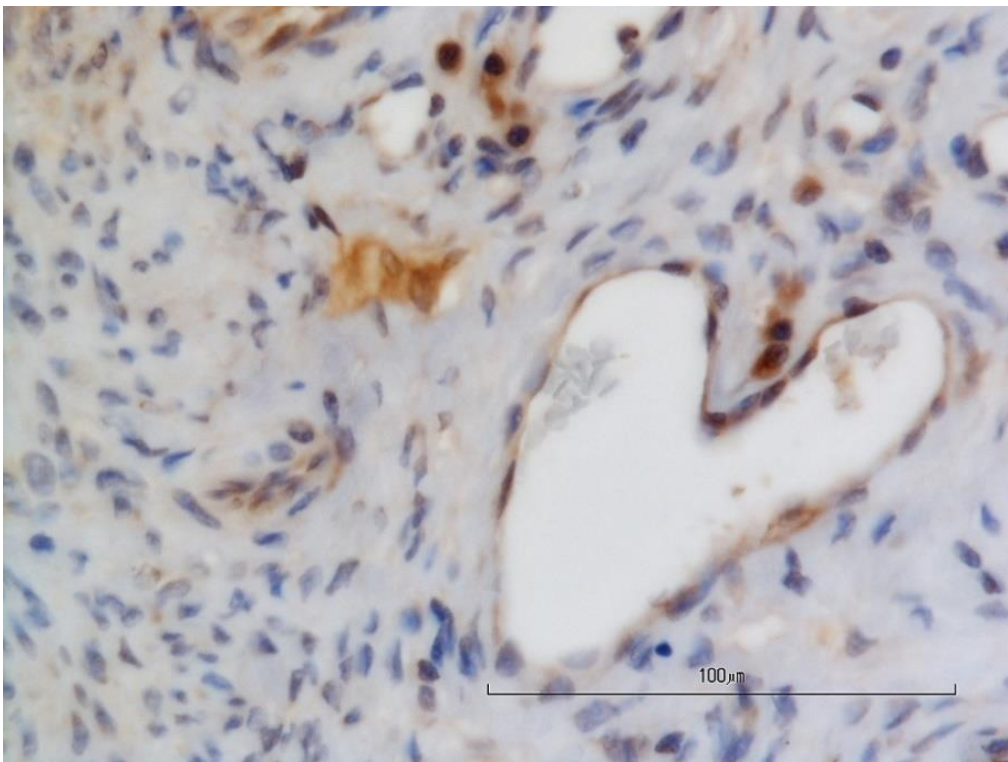


Fig. 58. CD34, Anais, 40x. Particolare dell'immagine precedente.

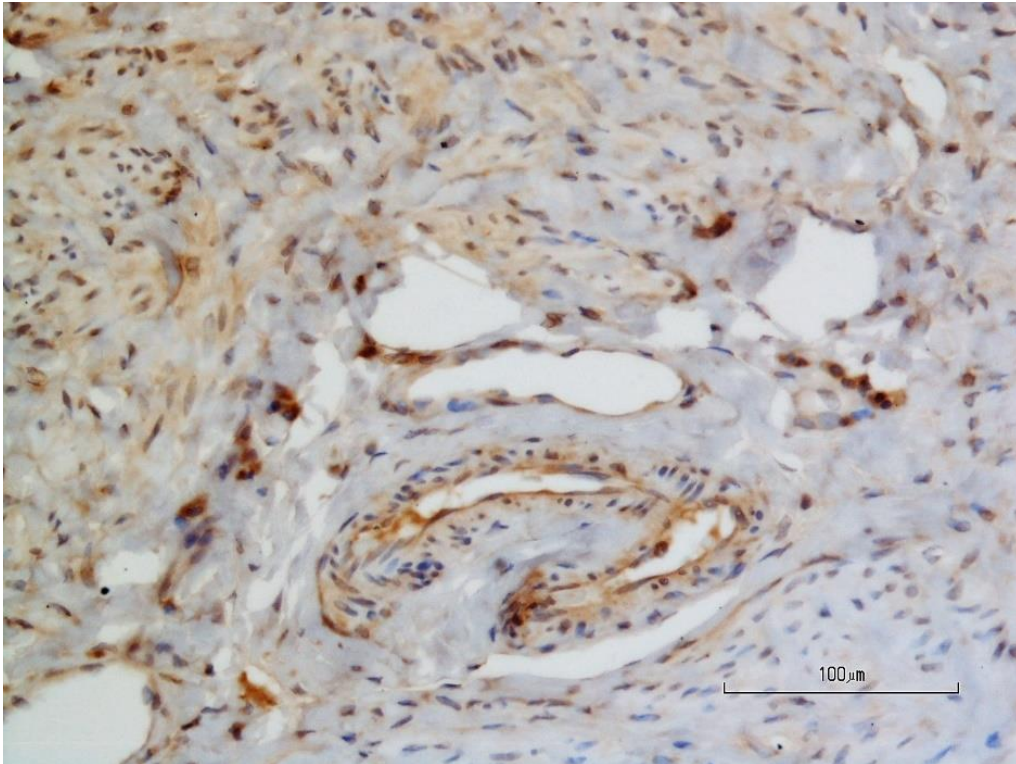


Fig. 59. CD34, Praline, 20x. Positività dei vasi dell'endometrio al marker endoteliale CD34.

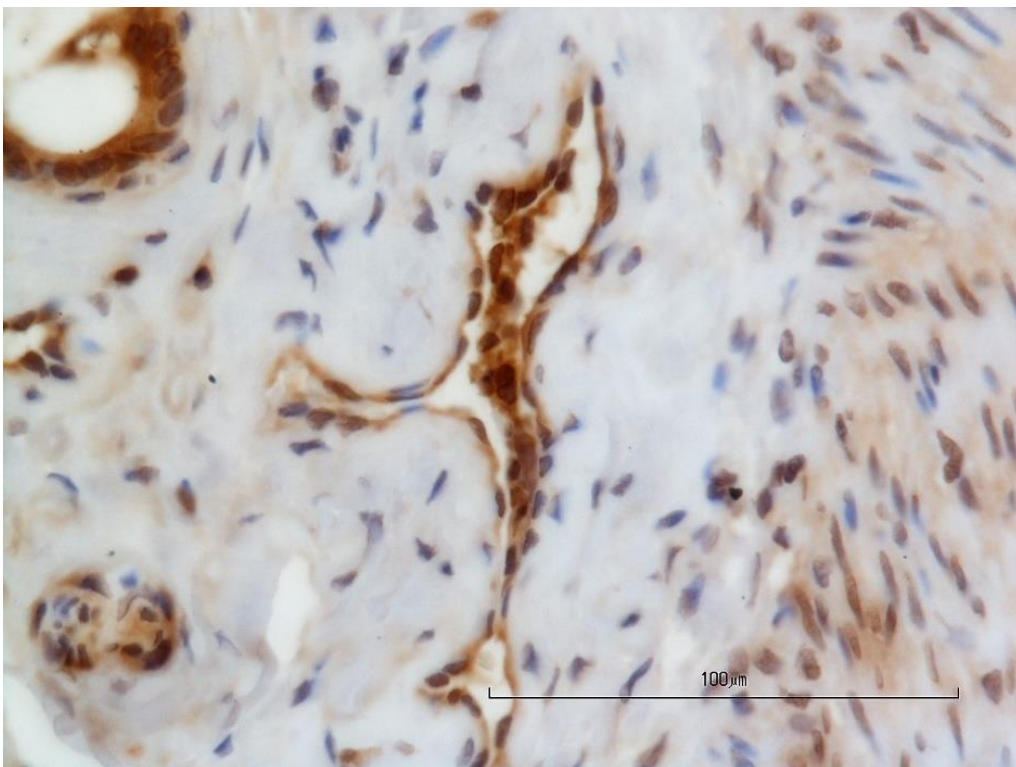


Fig. 60. CD34, Praline, 40x. Particolare dell'immagine precedente.

BIBLIOGRAFIA

- Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, 2008: “Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes.” *Diabetes* 57(7): 1759-1767.
- Antoniadou E, David AL, 2016: Placental stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 31:13-29.
- Antonucci I, Provenzano M, Rodrigues M, Pantalone A, Salini V, Bellarini P, Borlongan CV, Stuppia L, 2016: Amniotic Fluid Stem Cells: A Novel Source for Modeling of Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci* 17(4): 607 doi:10.3390/ijms17040607.
- Armed Forces Institute of Pathology: *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington D.C. A.F.I.P. 1994; pag 197.
- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N, 2008: “Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine”. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2(4):169-183.
- Bigliardi E, Parmigiani E, Cavarani S, Luppi A, Bonati L, Corradi A, 2004: Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *RDA* 39:136-140.
- Bigliardi E, Bresciani C, Callegari D, Di Ianni F, Morini G, Parmigiani E, Bianchi E, 2014: Use of aloglepristone for the treatment of P₄ induced insulin resistance in dogs. *J Vet Sci* 15:267-271.
- Black LL, Gaynor J, Adams C, Dhupa S, Sams AE, Taylor R, Harman S, Gingerich DA, Harman R, 2008: Effect of intraarticular injection of autologous adipose-

derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet Ther* 9:192-200.

- Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Pelekanos R, Rice A, Rossetti T, Atkinson K, 2007: Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Sem Cell Dev Biol* 18:846-858.
- Brown M, Wittwer C, 2000: Flow cytometry: principles and clinical application in hematology. *Clinical Chemistry* 46:1221-1229.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C, 2008: Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45:115-120.
- Callegari D, Bresciani C, Bianchi E, De Cesaris V, Parmigiani E, Bigaran V, Bigliardi E, 2015: The use of Aglepristone in the treatment of pregnancy related diabetic ketoacidosis: description of a case in a bitch. *Journal of Advances in Agriculture* 4(3): 487-491.
- Cameron GR, 1990: The staining of calcium. *J Path and Bact.* 3:929-955.
- Caplan AI, 2009: "Why are MSCs therapeutic? New data: new insight." *J Pathol.* 217(2): 318-324
- Caplan AI, Hariri R, 2015: "Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator". *Stem Cells Translational Medicine* 4(7):695-701.
- Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D, 2008. "Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 11(3):343-53.
- Chow T, Mueller S, Rogers IM, 2016: Advances in Umbilical Cord Blood Therapy: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Beyond. Chapter: Advances in Stem Cell Therapy, Part of the series *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine* pp 139-168.

- Daar AS, Greenwood HL, 2007: “A proposed definition of regenerative medicine”.
Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 1(3):179-84.
- De Bosschere H, Ducatelle R, Vermeirsch H, Van Den Broeck W, Coryn M, 2001:
Cystic endometrial hyperplasia-piometra complex in the bitch: Should the two
entities disconnected? Theriogenology 55:1509-1519.
- De Cesaris V, Grolli S, Bresciani C, Conti V, Basini G, Parmigiani E, Bigliardi E,
2016: Isolation, proliferation and characterization of endometrial canine stem cells.
Reproduction in Domestic Animals DOI: 10.1111/rda.12885
- De Coppi, P, Bartsch, G Jr, Siddiqui, MM, Xu, T, Santos, CC, Perin, L et al, 2007:
Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol 25:
100–106.
- Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L,
Arner P, Rydén M, 2005: Functional studies of mesenchymal stem cells derived
from adult human adipose tissue. Exp Cell Res 308: 283-290.
- Dominici M, Le Blanc K, Muller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS,
Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM, 2006: Minimal criteria for defining
multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular
Therapy position statement. Cytotherapy 8:315-317.
- Donofrio G, Franceschi V, Capocéfalo A, Cavirani S, Sheldon IM, 2008: Bovine
endometrial stromal cells display osteogenic properties. Reprod Biol Endocrin 6:65.
- Emmerson SJ, Gargett CE, 2016: Endometrial mesenchymal stem cells as a cell
based therapy for pelvic organ prolapse. World J Stem Cells 8:202-15.
- Fauza D, 2004: Amniotic fluid and placental stem cells. Clinical Obstetrics &
Gynaecology 18(6): 877-891.

- Ferris RA, Frisbie DD, McCue PM, 2014: Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology* 82:36-42.
- Filioli Uranio M, Valentini L, Lange-consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'abbate A, Catacchio CR, Ventura M, Cremonesi F, Dell'aquila ME, 2011: Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev* 78:361-373.
- Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M, 2001: Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in perioheral blood, lynf node and bone marrow aspirates. *Vet Paras* 99(2):105-111.
- Fossum TW, 2007: *Chirurgia dei piccoli animali. Cap 26: chirurgia dell'apparato genitale e riproduttore. Terza edizione, Elsevier Masson.*
- Fraser JK, Wulur I, Zeni A et al, 2006: Fat tissue an under appreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 24:150-153.
- Friedenstein AJP e Petrokova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-390.
- Friedestein AJ, Gorskaja JF, Kulagia NN, 1976: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hemopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267-274.
- Frisbie DD, Smith RKW, 2010: Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet J* 42:86-9.
- Gargett CE, Schwab K, Zillwood RM, Nguyen HPT, Wu D, 2009: Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 80:1136-1145.

- Gargett CE, Masuda H, 2010: Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 16:818-834.
- Gianaroli L, Carai P, Stanghellini I, Ferraretti AP, Magli MC, 2009. Le cellule staminali: Dalla ricerca all'applicazione clinica. *Repronews* 11.2:10–20.
- Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nesic D, 2008: Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 76:118-129.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM, 2001: Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54-63.
- Harvey C, Jan Thorsen S, Arun KG, 2007: Beyond the Vernacular: New Sources of Cells for Bone Tissue Engineering. *Plast Reconstr Surg* 122:755.
- Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA, 2004: Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytherapy* 6(6):543-553.
- Jang B, Byeon Y, Lim J, Ryu H, Kim WH, Koyama Y, Kikuchi M, Kang K, Kweon O, 2008: Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances Osteogenesis in bone defect model dogs. *J Vet Sci* 9:387-393.
- Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, Kim JE, Shim H, Shin JS, Shin IS, Ra JC, Oh S, Yoon KS, 2014: Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: A proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 32:1254-66.

- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP, 1997: Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplantation* 6(2):125-134.
- Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC, 2005: Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23: 412-423.
- Kaviani, A, Guleserian, K, Perry, TE, Jennings, RW, Ziegler, MM and Fauza, DO (2003). Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *J Am Coll Surg* **196**: 592–597.
- Kisiel AH, McDuffee LA, Masaoud E, Bailey TR, Esparza Gonzalez BP, Nino-Fong R, 2012: Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *AJVR* 73:1305-1317.
- Linnea R, Bodil SH, Ragnvi H, 2014: A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. *Theriogenology*, 82, 1281-1286.
- Loukogeorgakis SP, De Coppi P, 2016: Amniotic fluid stem cells: the known, the unknown and potential regenerative medicine applications. *Stem Cells* DOI: 10.1002/stem.2553.
- Marcato Paolo Stefano, 2015: *Patologia Sistemica Veterinaria, Volume II, Sistema genitale femminile.*
- Marx C, Silveira MD, Selbach I, da Silva AS, Braga LM, Camassola M, Nardi NB, 2014: Acupoint Injection of Autologous Stromal Vascular Fraction and Allogeneic Adipose-Derived Stem Cells to Treat Hip Dysplasia in Dogs. *Stem cells Int* 391274.

- Marx C, Silveira M D, Nardi ND, 2015: “Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications”. *Stem Cells and Development* 24(7):803-13.
- McCormack SA, Glasser SR, 1980: Differential response of individual uterine cells types from immature rats treated with estradiol. *Endocrinology* 106:1634-1649.
- McGee-Russel SM, 1958: Histochemical methods of calcium. *J Histochem and Cythochem* 6:22-42.
- Miernik K, Karasinski J, 2012: Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction* 143:203-209.
- Neupane M, Chang C, Kiupel M, Yuzbasiyan-gurkan V, 2008: Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 14:1007-1015.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, 1999: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Pountos I, Giannoudis PV, 2005: Biology of mesenchymal stem cells. *Injury, Int J Care Injured* 36S, S8-S12.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129: 118-129.
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT, 2006: Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1

in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54(4): 385-395.

- Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S, 2012: Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cell-a comparative study. *Vet Res Commun* 36:139-148.
- Riccò S, Renzi S, Del Bue M, Conti V, Merli E, Ramoni R, Lucarelli E, Gnudi G, Ferrari M, Grolli S, 2013: Allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in combination with platelet rich plasma are safe and effective in the therapy of superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Int J Immunopathol Pharmacol* 26 (1Suppl):61-8.
- Ricketts AP, Hagensee M, Bullock DW, 1983: Characterization in primary monolayer culture of separate cell types from rabbit endometrium. *J Reprod Fert* 67:151-160.
- Roura X, Sanchez A, Ferrer I, 1999: Diagnosis of canine leishmaniosis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec* 144(10):262-264.
- Schipani e Kronenberg, 2009. *Stembook Adult mesenchymal stem cells*. Harvard Stem Cell Institute.
- Schlafer DH, Gifford AT, 2008: Cistic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology* 70:349-358.
- Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley III EC, Borjesson DL, Zhu M, 2014: Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet Immunol Immunop* 161:21-31.

- Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, Hengstschlager M, 2008: Human amniotic fluid stem cells: a new perspective. *Amino Acids*. 35(2): 291-293.
- Slamecka J, Salimova L, McClellan S, van Kelle M, Kehl D, Laurini J, Cinelli P, Owen L, Hoerstrup SP, Weber B, 2015: Non-integrating episomal plasmid-based reprogramming of human amniotic fluid stem cells into induced pluripotent stem cells in chemically defined conditions. *Cell Cycle* doi.org/10.1080/15384101.2015.1121332.
- Steigman SA, Ahmed A, Shanti RM, Tuan RS, Valim C, Fauza DO, 2009: Sternal repair with bone grafts engineered from amniotic mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg*. 44(6): 1120-112
- Sun P, Liu J, Li W, Xu X, Gu X, Li H, Han H, Du C, Wang H, 2016: Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice. *J Transl Med* 14:28.
- Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T, 2012: Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 8:150.
- Towns CR, Jones DG, 2004: Stem cells, embryos, and the environment: a context for both science and ethics. *Journal of Medical Ethics* 30(4):410-413.
- Uzbas F, May ID, Parisi AM, Thompson SK, Kaya A, Perkins AD, Memili E, 2015: Molecular Physiognomies and Applications of Adipose-Derived Stem Cells". *Stem Cell Reviews and Reports* 11(2):298-308.
- Varma VA, Melin SA, Adamec TA, Dorman BH, Siegfried JM, Walton LA, Carney CN, Norton CR, Kaufman DG, 1982: Monolayer culture of human endometrium: methods of culture and identification of cell types. *In Vitro* 18:911-918.

- Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M, 2010: Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation* 19:279-289.
- Von Kossa J. Ueber die im Organismus kuenstlich erzeugten Verkalkung. *Beitr Path Anat* 1901; 29:62.
- Wabik A, Jones PH, 2015: Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells". *The Embo Journal* 34(9):1164-1179.
- Walther G, Gekas J, Bertrand OF, 2009: Amniotic stem cells for cellular cardiomyoplasty: promises and premises. *Catheter Cardiovasc Interv.* 73(7): 917-924.
- Wang H, Jin P, Sabatino M, Ren J, Civini S, Bogin V, Ichim TE, Stroncek DF, 2012: Comparison of endometrial regenerative cells and bone marrow stromal cells. *J Transl Med*, 10:207.
- Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE, 2015: Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives". *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 8:125-134.
- Zubin E, Conti V, Leonardi F, Zanichelli S, Ramoni R, Grolli S, 2015: Regenerative therapy for the management of a large skin wound in a dog. *Clin Case Reports* 3:598-603.
- Zucconi E, Vieira NM, Bueno DF, Secco M, Jazedje T, Ambrosio CE, Passos-Bueno MR, Miglino MA, Zatz M, 2010: Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells Dev* 19:395-402.

SITOGRAFIA:

- www.abcam.com/
- www.accademia-lancisiana.it
- www.chimicare.org
- www.dna.utah.edu
- www.elettroforesi.weebly.com/
- www.embed.widencdn.net
- www.ospedalesanmichele.it
- www.rndsystem
- www.staminafoundation.org
- www.wesapiens.org

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare va al mio tutor il Professor Enrico Bigliardi, al Professor Stefano Grolli ed alla Professoressa Annamaria Cantoni, senza il loro supporto e la loro guida sapiente questa tesi non esisterebbe.

Un sentito grazie va alla Dott.ssa Virna Conti per i preziosi insegnamenti e suggerimenti su come lavorare in un laboratorio di colture cellulari e come gestire gli imprevisti.

Un grazie va alla Dott.ssa Rosanna Di Lecce per la rappresentazione iconografica ed ai colleghi e amici che mi hanno incoraggiato o che hanno speso parte del proprio tempo per leggere e discutere con me le bozze di questo lavoro.

Vorrei inoltre ringraziare le persone a me più care: la mia famiglia, il mio compagno ed i miei bambini, Flavio e Sibilla, a cui questo lavoro è dedicato.

In ultimo desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato nella realizzazione della mia Tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine, anche se a me spetta la responsabilità per ogni errore contenuto in questa tesi.