



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

La Medicina Rigenerativa come innovativo approccio terapeutico alle principali problematiche riproduttive e produttive della bovina da latte: le Cellule Mesenchimali Stromali (MSCs) e il Plasma Ricco di Piastrine (PRP).

Regenerative Medicine as an innovative therapeutic approach to major reproductive and production problems in dairy cattle: Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP).

Relatore:

Chiar.mo Prof. Stefano Grolli

Correlatore:

Dott.ssa Valentina Andreoli

Laureando:
Carlo Bisecco

Anno Accademico 2021 – 2022

INDICE

Riassunto.....	5
Abstract.....	7
1 Introduzione	9
La medicina rigenerativa in medicina veterinaria.....	9
2 Le cellule staminali	10
2.1 Autorinnovamento o <i>self-renewal</i>	11
2.2 Differenziamento cellulare	12
2.3 Divisione asimmetrica	13
2.4 Classificazione delle cellule staminali.....	14
2.4.1 Classificazione in base al potenziale di differenziazione	14
2.4.2 Classificazione in base all'origine	16
3 Le Cellule Mesenchimali Stromali (MSCs)	17
3.1 MSCs Autologhe e Allogene.....	19
3.2 Isolamento delle MSCs.....	21
3.2.1 Isolamento di BM-MSCs.....	21
3.2.2 Isolamento di AT-MSCs	23
3.2.3 Isolamento di UC-MSCs	23
3.3 Coltura di MSCs.....	24
3.4 Vie di somministrazione.....	25
3.5 <i>Homing</i> e Migrazione delle MSCs.....	26
3.6 L'azione terapeutica delle MSCs.....	28
3.6.1 Attività paracrina delle MSCs.....	28
3.6.2 Attività di immunomodulazione delle MSCs	30
3.6.3 Attività antimicrobica delle MSCs	31
4 Il Plasma Ricco di Piastrine (PRP)	33

4.1	Ruolo terapeutico del PRP	34
4.1.1	Attività antimicrobica.....	34
4.2	Preparazione del PRP	35
4.2.1	Preparazione del PRP tramite <i>PRP method</i> [96].....	35
4.2.2	Preparazione del PRP tramite <i>buffy-coat method</i> [96].....	36
4.3	Classificazione DEPA del PRP	37
4.3.1	Dose di piastrine iniettate	37
4.3.2	Efficienza della produzione.....	38
4.3.3	Purezza del PRP	38
4.3.4	Attivazione del PRP	39
5	La medicina rigenerativa nella bovina da latte	41
5.1	L'antimicrobico-resistenza.....	43
5.2	Campi di applicazione.....	44
6	La medicina rigenerativa nelle disfunzioni ovariche	45
6.1	L'ipofunzionalità ovarica.....	46
6.2	Tattamento dell'ipofunzionalità ovarica con MSCs	48
6.3	Tattamento dell'ipofunzionalità ovarica con PRP	49
6.4	Le cisti ovariche	51
6.5	Tattamento delle cisti ovariche con MSCs.....	52
6.6	Tattamento delle cisti ovariche con PRP.....	53
7	La medicina rigenerativa nella metrite-endometrite.....	54
7.1	La metrite	55
7.1.1	Fattori predisponenti	55
7.1.2	Eziopatogenesi.....	55
7.1.3	Classificazione clinica e sintomatologia	56
7.1.4	Diagnosi.....	57
7.1.5	Terapia convenzionale.....	57
7.2	L'endometrite.....	59

7.2.1	Classificazione clinica e sintomatologia	59
7.2.2	Diagnosi.....	60
7.2.3	Terapia convenzionale.....	61
7.3	Tattamento di metrite ed endometrite con MSCs	63
7.4	Tattamento di metrite ed endometrite con PRP	65
8	La medicina rigenerativa nelle mastiti.....	67
8.1	La mastite.....	68
8.1.1	Classificazione epidemiologica	68
8.1.2	Classificazione clinica	68
8.1.3	Classificazione anatomo-patologica	69
8.1.4	Fattori di rischio	69
8.1.5	Diagnosi.....	71
8.1.6	Terapia convenzionale.....	72
8.2	Tattamento della mastite con MSCs	74
8.3	Tattamento della mastite con PRP	77
9	Conclusioni	81
10	Bibliografia.....	84

Riassunto

La medicina rigenerativa, e più specificatamente la branca della terapia cellulare, con particolare riferimento all'utilizzo di Cellule Mesenchimali Stromali (MSCs) e di Plasma Ricco di Piastrine (PRP), rappresenta un approccio innovativo e promettente nei confronti di patologie di varia natura, che possono interessare sistemi e apparati diversi.

Storicamente, in ambito veterinario, l'applicazione di queste metodiche è stata riservata primariamente alla specie equina, soprattutto per patologie legate all'attività sportiva e dunque relative all'apparato muscolo-scheletrico, mentre negli ultimi anni, la possibilità di ricorrere alla somministrazione di MSCs e di PRP a fini terapeutici ha interessato sempre più anche la branca degli animali da compagnia, in particolar modo cane e gatto.

Ad oggi, invece, è molto limitato il ricorso a trattamenti clinici basati sulla terapia cellulare negli animali da reddito, ed in particolare nell'allevamento bovino, con maggior riferimento alle bovine da latte, in cui, tuttavia, ciò potrebbe rappresentare un punto di svolta nella risoluzione di diversi stati patologici, con importanti vantaggi connessi soprattutto in riferimento alla preoccupante problematica relativa al fenomeno dell'antimicrobico-resistenza, per il quale sono sempre più stringenti le norme a limitazione dell'uso di numerose classi di antibiotici, ma anche per l'assenza di residui che tali terapie assicurano all'interno dei prodotti di origine animale, ed in particolare nel latte.

L'obiettivo del presente elaborato è quello di esplicitare le principali caratteristiche delle MSCs e del PRP, illustrando le possibili applicazioni nella clinica veterinaria, e approfondendo primariamente il ricorso a tali terapie nell'ambito della bovina da latte.

Particolare enfasi verrà posta nei confronti di quelle che possono essere considerate le patologie più importanti nell'allevamento bovino, sia da un punto di vista sanitario che economico per l'azienda, ossia le principali problematiche

riproduttive e produttive, quali disfunzioni ovariche, come ipofunzionalità ovarica e cisti ovariche, metrite ed endometrite, ed infine mastite.

Di queste patologie verranno riassunti i caratteri salienti ed illustrati i trattamenti cui si fa convenzionalmente ricorso, per analizzare, infine, le evidenze scientifiche disponibili per quel che concerne le possibili terapie con MSCs e con PRP.

Abstract

Regenerative medicine, and more specifically the branch of cell therapy, with particular reference to the use of Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP), represents an innovative and promising approach towards pathologies of various nature, which may affect different systems and apparatuses.

Historically, in the veterinary field, the application of these methods has been reserved primarily for the equine species, especially for pathologies connected to sporting activity and thus related to the musculoskeletal system, while in recent years, the possibility of using MSCs and PRP administration for therapeutic purposes has also increasingly interested the companion animals branch, especially dogs and cats.

To date, however, there is very limited use of clinical treatments based on cell therapy in livestock animals, and particularly in cattle breeding, with greater reference to dairy cows, where, however, this could represent a turning point in the resolution of various disease states, with important related benefits, especially with reference to the worrisome issue related to the phenomenon of antimicrobial resistance, for which regulations are increasingly stringent to limit the use of more and more classes of antibiotics, but also because of the absence of residues that these therapies ensure within products of animal origin, and in particular in milk.

The objective of this paper is to explicate the main characteristics of MSCs and PRP, illustrating the possible applications in the veterinary clinic, and delving primarily into the use of these therapies in the dairy cattle.

Particular emphasis will be placed toward what can be considered the most important issues in cattle breeding, both from a health and economic point of view for the farm, namely the main reproductive and production problems, such as ovarian abnormalities, like ovarian hypofunctionality and ovarian cysts, metritis and endometritis, and finally mastitis.

The salient features of these pathologies will be summarized and the treatments conventionally used will be explained, and, in the end, the available scientific evidence regarding possible therapies with MSCs and PRP will be analyzed.

I INTRODUZIONE

LA MEDICINA RIGENERATIVA IN MEDICINA VETERINARIA

Negli ultimi decenni, così come anche in ambito umano, in medicina veterinaria la ricerca ha iniziato a riservare parte dei propri sforzi alla medicina rigenerativa.

La medicina rigenerativa rappresenta un approccio terapeutico che si avvale del contributo di molteplici discipline scientifiche, quali la biologia, la chimica, la medicina, l'informatica e l'ingegneria, per la risoluzione di diverse patologie, acute e croniche, mediante la riparazione, rigenerazione o sostituzione di tessuti od organi danneggiati da malattie, traumi o a causa di difetti congeniti o degenerativi [1].

Tale approccio terapeutico comprende:

- Ingegneria tissutale;
- Terapia cellulare e genica;
- Dispositivi medici;
- Organi artificiali.

Nell'ambito della medicina veterinaria, particolare importanza rivestono soprattutto le terapie basate sull'utilizzo di cellule mesenchimali stromali (MSCs) e di plasma ricco di piastrine (PRP).

L'applicazione clinica di queste terapie cellulari è influenzata da numerosi fattori, a cominciare dalla grande variabilità anatomica e fisiologica, non solo tra le diverse specie, ma anche tra le diverse razze.

Questi approcci terapeutici si sono, fino ad oggi, concentrati principalmente sulle specie canina ed equina, mentre in questo elaborato si andrà ad approfondire il loro utilizzo nella bovina da latte.

2 LE CELLULE STAMINALI

Nel 1962 Malcom S. Steinberg propose una teoria con la quale attribuiva alle singole cellule, coltivate in un opportuno terreno di crescita definito, la capacità di costituire un tessuto funzionale [2].

Tali ipotesi vennero successivamente consolidate negli anni '80 grazie agli studi indipendenti di Yannas [3] e Bell [4], i quali dimostrarono di poter ottenere strutture simili al derma cutaneo con fibroblasti neonatali cresciuti in collagene.

Le cellule staminali risultano essenziali sia durante lo sviluppo, che poi nell'età adulta, poiché in grado di dare origine a diversi tipi cellulari tessuto-specifici, dal momento che sono cellule *uncommitted*, vale a dire non specializzate. Altra importante caratteristica di cui tali cellule sono dotate, è quella dell'auto-rinnovamento o *self-renewal*, essenziale per il mantenimento della loro stessa popolazione. È proprio l'equilibrio tra differenziamento e *self-renewal* che assicura l'omeostasi tissutale, garantendo un corretto turn over cellulare in tutti i tessuti dell'organismo [5].

2.1 AUTORINNOVAMENTO O *SELF-RENEWAL*

L'autorinnovamento (o *self-renewal*) è il processo attraverso cui le cellule staminali, dividendosi, danno origine ad una progenie ancora indifferenziata, in modo tale da garantire il mantenimento della popolazione di cellule staminali durante la vita dell'organismo. Esso è regolato sia da fattori determinati geneticamente, definiti intrinseci, sia da fattori estrinseci provenienti dalla nicchia, ossia dal “microambiente fisiologicamente ristretto che supporta le cellule staminali” [6] [7], che comprende matrice extracellulare, cellule e relative segnalazioni [8].

In tale processo è implicato il ciclo cellulare, ed in particolare l'equilibrio tra protooncogeni (promotori del *self-renewal*), *gate-keeping tumor suppressors* (che limitano l'autorinnovamento) e *care-taking tumor suppressors* (responsabili dell'integrità genomica della cellula) [9].

Le cellule staminali adulte sono in grado di arrestare in modo reversibile il loro ciclo cellulare, con conseguente assenza di proliferazione, entrando in uno stato di quiescenza definito G0, pur conservando la capacità di rientrare nel ciclo cellulare, in particolare nella fase G1, e andare nuovamente incontro a proliferazione, a differenza di cellule terminalmente differenziate, grazie ad uno stimolo come un danno cellulare [10] [11] [12].

2.2 DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

Il differenziamento cellulare è il processo attraverso il quale la cellula staminale si trasforma in una tipologia cellulare specializzata, in grado di svolgere nuove funzioni tramite l'espressione di nuovi geni, ossia grazie alla produzione di nuovi mRNA e proteine, con modificazioni relative a morfologia, dimensioni e metabolismo energetico [13].

Tale processo è determinato dall'interazione di stimoli con diversa origine:

- Autocrina: secreti dalla cellula staminale stessa;
- Paracrina: prodotti da altre cellule presenti nella nicchia;
- Sistemica: derivanti da altri tessuti [14].

Altri stimoli implicati nel differenziamento sono di natura fisica, come stress meccanici che insistono sulla cellula, proprietà meccaniche della matrice extracellulare e contatto cellula-cellula [15].

Integrando tali segnali, la cellula staminale dà avvio al processo di differenziazione, il quale comporta lo spegnimento di geni responsabili della staminalità e l'espressione di geni necessari alla specializzazione.

2.3 DIVISIONE ASIMMETRICA

Le cellule staminali, per conservare le capacità di autorinnovamento e differenziamento, attuano una divisione asimmetrica, attraverso cui da una cellula madre originano due cellule figlie: una dotata ancora delle caratteristiche di staminalità; l'altra con capacità di differenziarsi [16].

Durante tale processo (**Figura 1**), intervengono:

- Fattori estrinseci per cui la cellula progenitrice può orientare il fuso mitotico in maniera tale che solo una delle due cellule figlie resti nella nicchia, dove risentirà ancora dei segnali responsabili del mantenimento della staminalità, ereditando lo stesso potenziale di sviluppo, ma acquisendo destini diversi in base ai diversi microambienti (**Figura 1a**);
- Fattori intrinseci per cui, con la segregazione asimmetrica dei regolatori citosolici, invece, le cellule figlie acquisiscono un diverso potenziale di sviluppo (**Figura 1b**) [16] [17].

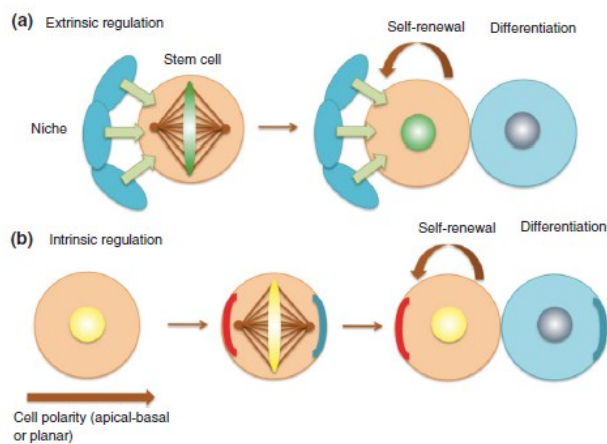


Figura 1 Divisione asimmetrica di una cellula staminale: (a) regolazione estrinseca; (b) regolazione intrinseca [17].

2.4 CLASSIFICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI

Sono stati individuati due criteri in base ai quali è possibile classificare le cellule staminali:

1. Potenziale di differenziazione;
2. Origine evolutiva [18]. (Figura 2) [19]

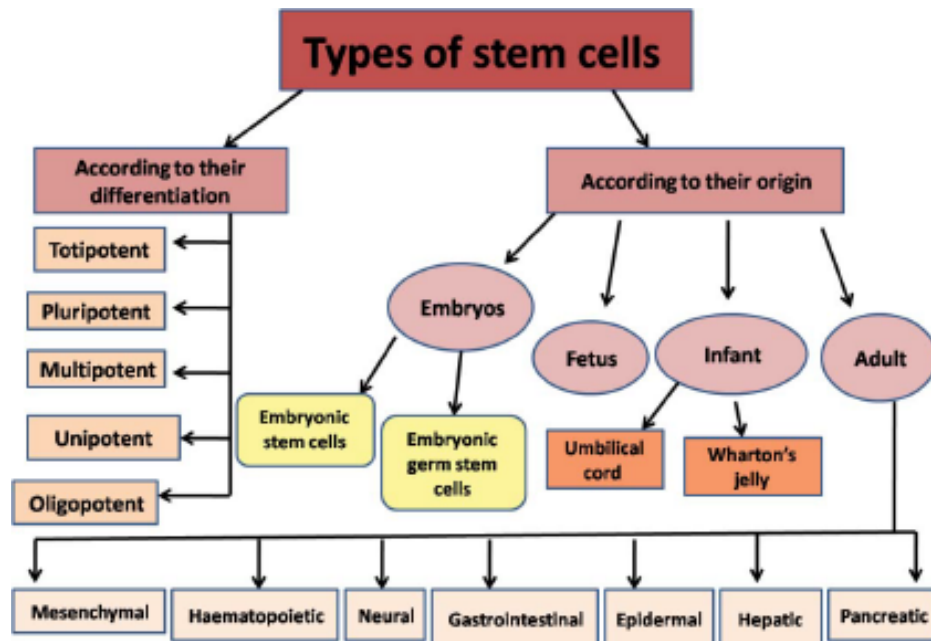


Figura 2 Classificazione delle cellule staminali [19]

2.4.1 Classificazione in base al potenziale di differenziazione

In base alla loro capacità di differenziarsi, o potenza, le cellule staminali possono essere classificate come totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti, unipotenti [18]. (Figura 3) [20]

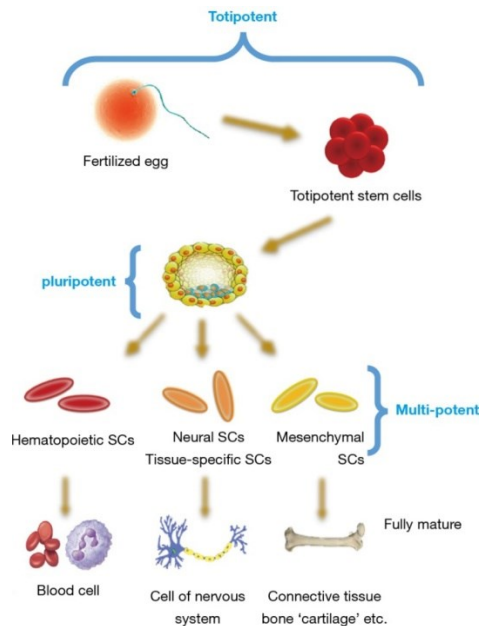


Figura 3 Schema generale della classificazione delle cellule staminali in base al potenziale differenziativo [20]

Le cellule staminali totipotenti conservano la capacità di dare origine a tutti e tre i foglietti germinativi, ai tessuti extraembrionali e alle cellule placentari. Tale caratteristica è propria dello zigote ed è mantenuta nei blastomeri fino alle prime due divisioni, con una progressiva diminuzione a partire dallo stadio di 8 cellule in poi (**Figura 3**) [21] [20].

Le cellule staminali pluripotenti, anche definite cellule staminali embrionali, derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti e mantengono la capacità di differenziarsi nei tre foglietti germinativi, ma non in tessuti extraembrionali e placentari [18] [20] [22].

Le cellule staminali multipotenti, anche definite cellule staminali adulte o somatiche, tra cui rientrano anche le cellule staminali mesenchimali, sono in grado di dare origine a tutte le cellule mature del solo foglietto germinativo cui appartengono, ossia il mesoderma, e le cellule ematopoietiche [21] [20].

Le cellule staminali oligopotenti hanno la capacità di differenziarsi in due o più linee cellulari del tessuto di appartenenza [21].

Le cellule staminali unipotenti, infine, possono dare origine ad una singola tipologia cellulare specifica del tessuto cui appartengono [21].

2.4.2 Classificazione in base all'origine

In base alla loro origine, le cellule staminali possono essere classificate in quattro categorie: embrionali (ESCs), fetali, neonatali e adulte.

Le ESCs derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti pre-impianto, conservano la capacità di autorinnovamento e sono cellule pluripotenti, in grado di differenziarsi nei tre foglietti germinativi [23]. Tra queste rientrano anche le cellule staminali embrionali germinali, derivanti dalle cellule germinali primordiali della cresta gonadica [24].

Le cellule staminali fetali sono quelle che colonizzano diversi organi del feto in diversi momenti del suo sviluppo: esse possono differenziarsi in cellule pluripotenti, come quelle della cresta neurale o delle isole pancreatiche, e in cellule ematopoietiche [19] [25].

Le cellule staminali neonatali derivano da diverse fonti, in particolare dal cordone ombelicale e dalla sua matrice, ossia la gelatina di Wharton: rappresentano una importante fonte di cellule staminali ematopoietiche, ma anche di cellule neurali, endoteliali e del tessuto osseo [26] [27].

Le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate presenti in molti tessuti post-natali, in particolare midollo osseo e tessuto adiposo, in grado di differenziarsi in un limitato numero di tipologie cellulari. Esse rivestono un ruolo molto importante per quanto riguarda la riparazione e rigenerazione tissutale. A questo gruppo appartengono le cellule staminali mesenchimali, le cellule ematopoietiche, le cellule neurali e le cellule staminali gastrointestinali, epatiche e pancreatiche [21].

3 LE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI (MSCs)

Con il termine di “cellule mesenchimali stromali” (MSCs) si definiscono le cellule staminali multipotenti, non emopoietiche, isolabili dai tessuti derivati dal mesenchima (tessuto connettivo) embrionale, con la capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari della linea mesodermica (inclusi osteociti, adipociti e condrociti) quando esposte a stimoli opportuni [28] [29] [30] [31] [32] [33].

In **Figura 4** [34] sono schematizzati i principali fattori responsabili della differenziazione nei diversi lineage cellulari.

Mesenchymal Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers

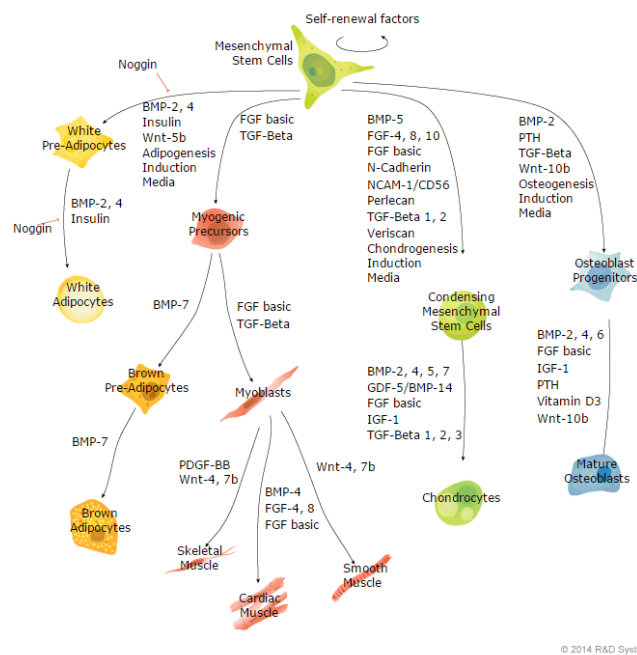


Figura 4 Principali fattori implicati nella differenziazione delle cellule staminali. [34]

Il comportamento multipotente di queste cellule è stato scoperto per la prima volta da Friedenstein e il suo team nel 1966 [35], ma è del 1991 l’attribuzione del nome di “cellule staminali mesenchimali” da parte di Caplan [36].

La *International Society for Cell & Gene Therapy* (ISCT) ha stabilito dei criteri minimi per definire le MSCs multipotenti, secondo cui esse devono:

- Essere in grado di crescere in coltura aderenti alla plastica;
- Esprimere alcuni marcatori di superficie cellulare, differenti tra le varie specie (**Tabella 1**);
- Essere prive dell'espressione di altri marcatori di superficie cellulare, differenti tra le varie specie (**Tabella 1**);
- Essere in grado di differenziarsi *in vitro* nelle linee di adipociti, condrociti e osteoblasti [37].

Tabella 1. Marcatori di superficie cellulare delle MSCs in diverse specie [38].

Cell surface markers		Species
Positive	Negative	
CD105, CD73, CD90	CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR	Human
STRO-1, CD44, CD90, CD105	CD73, CD45, CD34	Canine
CD105, CD90, CD44	CD34, MHC II	Equine
CD29, CD166, CD105, CD73, CD44, CD90	CD45, CD34	Bovine

Le MSCs sono dotate della capacità di migrare nella sede del danno, dove possono differenziarsi e sostituire le cellule residenti danneggiate, promuovendo inoltre un processo di rigenerazione tissutale, come dimostrato in modelli preclinici sviluppati su patologie di cuore, pancreas, rene e fegato [39] [40] [41] [42].

La capacità di guarigione di queste cellule non è tuttavia da attribuire esclusivamente al loro attecchimento e alla loro capacità differenziativa, ma anche all'azione paracrina che esse svolgono mediante la secrezione di fattori solubili, indispensabili per sopravvivenza e proliferazione cellulare, e alla modulazione della risposta immunitaria [43]. Proprio in riferimento a quest'ultima caratteristica, è stata più recentemente proposta, sempre da Caplan, la definizione di queste cellule quali “*Medicinal Signaling Cells*” [44].

3.1 MSCs AUTOLOGHE E ALLOGENICHE

L'isolamento delle MSCs può essere effettuato a partire dallo stesso animale a cui poi verranno somministrate e in questo caso si parla di MSCs autologhe (auto-MSCs), mentre, nel caso in cui le MSCs derivassero da fonti “non-self”, vengono definite allogeniche (allo-MSCs) se isolate da donatori della stessa specie del paziente su cui verranno impiegate, o xenogeniche se ottenute da un donatore di specie diversa dal ricevente [45] [46].

Il dibattito su quale tipologia utilizzare a scopi terapeutici è tutt'ora aperto.

Per quanto riguarda il ricorso alle auto-MSCs, questo può risultare in talune condizioni potenzialmente sfavorevole per diversi motivi: prima di tutto, in base alle condizioni del paziente, può non essere possibile isolare una quantità sufficiente di cellule, come in pazienti cachettici da cui si volessero isolare *Adipose Tissue – Mesenchymal Stem Cells* (AT-MSCs), o da soggetti affetti da mielofibrosi da cui si volessero isolare *Bone Marrow – Mesenchymal Stem Cells* (BM-MSCs). Inoltre, si è visto che l'attività biologica di queste cellule è fortemente influenzata dall'età del donatore, con un minor potenziale differenziativo e rigenerativo, e quindi minor efficacia terapeutica, in pazienti più anziani [47][48]. Anche la presenza di concomitanti patologie sistemiche, quali lupus eritematoso sistemico [49], diabete [50] e artrite reumatoide [51], può comportare alterazione delle caratteristiche intrinseche delle MSCs con conseguenti risultati non soddisfacenti. Per finire, poiché il processo di preparazione richiede tempi prolungati, non risulta possibile ricorrere alle auto-MSCs in corso di patologie acute.

Da questo punto di vista, il ricorso alle allo-MSCs risulterebbe vantaggioso, vista la possibilità di coltivarle e conservarle, dopo averne valutato le potenzialità biologiche, affinché siano subito disponibili all'occorrenza [52].

Potenziati rischi derivati dall'utilizzo di cellule allogeniche derivano dalla loro possibilità di trasmettere patologie infettive presenti nell'animale donatore, e la potenzialità di essere riconosciute come estranee dal sistema immunitario del ricevente. Diversi rilievi sperimentali, tuttavia, hanno evidenziato che in seguito alla loro somministrazione, non si verifica nel paziente una reazione immunitaria

importante perché tali cellule sono dotate di proprietà immunosoppressive e di scarsa immunogenicità, poiché esse:

- Esprimono bassi livelli di complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I;
- Non esprimono MHC di classe II;
- Non esprimono molecole co-stimolatorie quali CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) [53];
- Inibiscono l'attività di cellule T, cellule B, cellule Natural Killer e cellule dendritiche, mediante contatto *cell-to-cell* e secrezione di fattori solubili [54] [55].

Proprio per queste caratteristiche, le MSCs sono state definite come cellule privilegiate dal punto di vista immunitario, anche se attualmente si preferisce definirle immuno-evasive [56]: in uno studio guidato da Schu [57] è stato dimostrato che allo-MSCs inoculate in topi inducono formazione di allo-anticorpi e lisi cellulare conseguente all'attivazione del complemento *in vivo*; il gruppo di Camp [58] ha invece evidenziato una risposta cellulo-mediata in conseguenza alla somministrazione di allo-MSCs.

3.2 ISOLAMENTO DELLE MSCs

Le MSCs possono essere isolate da una grande varietà di fonti diverse, come midollo osseo, tessuto adiposo, cordone ombelicale, liquido amniotico, sangue periferico, muscoli e diversi organi quali fegato, cervello e polmone. [59] Tra queste, le tre fonti principali risultano essere il midollo osseo (BM da *Bone Marrow*, *BM-MSCs*), il tessuto adiposo (AT da *Adipose Tissue*, *AT-MSCs*) e il cordone ombelicale (UC da *Umbilical Cord*, *UC-MSCs*), ciascuna con specifici vantaggi e svantaggi riportati in **Tabella 2** [28].

3.2.1 Isolamento di BM-MSCs

Le MSCs derivanti dal midollo osseo possono essere isolate da ossa diverse, in particolare le principali sedi di prelievo negli animali sono: omero prossimale, femore, cresta iliaca [60]. **Figura 5.**

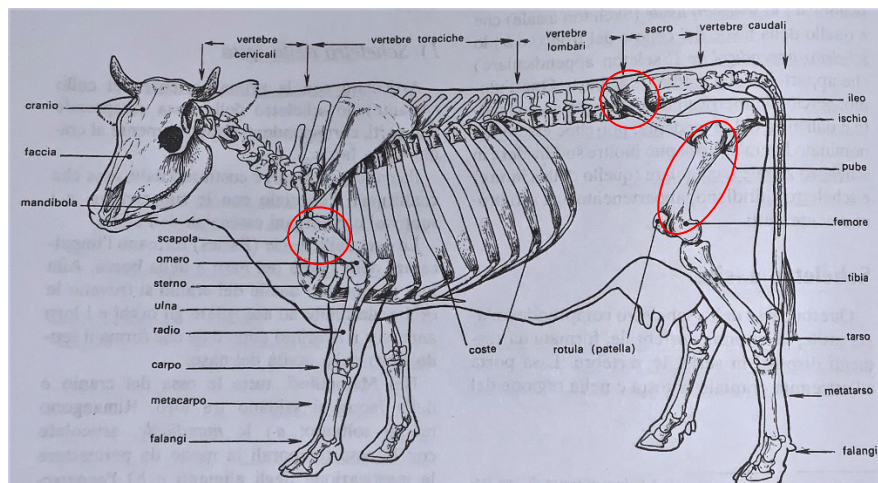


Figura 5. Principali siti di prelievo del midollo osseo. [61]

Prima di procedere alla raccolta del midollo osseo, gli animali devono essere sottoposti ad esami che comprendano esame clinico, analisi biochimiche e valutazione dei parametri ematologici. Tale operazione viene svolta con l'animale in anestesia generale, preparando il sito di prelievo in accordo a tutti i principi di sterilità e asepsi richiesti durante una chirurgia.

Questa procedura risulta particolarmente invasiva e correlata a un forte dolore post-operatorio e ad elevato rischio di complicazioni quali infezioni, emorragie e, nel cavallo, pneumotorace o pneumopericardio [62] [63].

Tabella 2. Vantaggi e svantaggi di cellule mesenchimali stromali (MSCs) ottenute da tessuto adiposo (AT), midollo osseo (BM) e cordone ombelicale (UC). GvHD=Graft-versus-Host Disease [28].

Fonte	Vantaggi	Svantaggi
Tessuto Adiposo (AT)	<ul style="list-style-type: none"> • Elevata disponibilità e facilmente accessibile. • Isolamento di cellule staminali fino a 500 volte superiore rispetto al BM. • Proliferazione cellulare più veloce (tempo di duplicazione di circa 40 ore). • Effetto immunosoppressivo di queste MSCs più forte rispetto a quello delle BM-MSCs. • Secrezione di diverse citochine angiogeniche e antiapoptotiche. • MSCs più inclini a differenziarsi nella linea degli adipociti. 	<ul style="list-style-type: none"> • Potenziale osteogenico e condrogenico inferiore rispetto a BM-MSCs. • Resa cellulare e potenziale di differenziazione dipendono dalle caratteristiche del donatore (età).
Midollo Osseo (BM)	<ul style="list-style-type: none"> • Considerato il Gold-Standard. • Fonte cellulare più comune negli studi clinici e storia clinica consolidata. • Elevato potenziale osteogenico e condrogenico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedura di raccolta invasiva e dolorosa. • Procedura di raccolta comporta rischio di infezione. • Fornitura limitata. • La resa cellulare e il potenziale di differenziazione dipendono dalle caratteristiche del donatore (età). • Minor tasso di proliferazione (tempo di duplicazione medio di 4±1 giorni).
Cordone Ombelicale (UC)	<ul style="list-style-type: none"> • Procedura di raccolta sicura e non invasiva. • Abbondanza di approvvigionamento. • UC-MSCs non vanno incontro a senescenza con i diversi passaggi. • Ipoimmunogenicità. • Minor rischio di GvHD. • Potenziale di proliferazione più elevato rispetto a BM e AT (tempo di duplicazione di 30 ore). • Maggior capacità di espansione e innesto rispetto a BM-MSCs. 	<ul style="list-style-type: none"> • UC-MSCs meno efficaci nell'indurre osteogenesi rispetto a BM-MSCs.

3.2.2 Isolamento di AT-MSCs

Altra importante fonte di cellule mesenchimali stromali è rappresentata dal tessuto adiposo, da cui le AT-MSCs possono essere ricavate mediante lipectomia o lipoaspirazione: anche in questo caso risulta necessaria l'anestesia generale dell'animale, ma le possibili complicanze sono più limitate ed è possibile effettuare il prelievo in concomitanza di altre chirurgie di routine, ad esempio in corso di una ovarioisterectomia [64] [65].

Una volta prelevato il campione di tessuto adiposo, questo viene sottoposto a digestione enzimatica ad opera di collagenasi. Tale passaggio è seguito poi dalla rimozione dei globuli rossi presenti mediante loro lisi specifica e successiva filtrazione cellulare [55].

Tali cellule, contrariamente alle BM-MSCs, mostrano una maggior tendenza a differenziarsi verso il lineage adipogenico rispetto a quello osteogenico e condrogenico [66].

3.2.3 Isolamento di UC-MSCs

Le MSCs possono inoltre essere isolate dal cordone ombelicale nella sua interezza oppure più specificatamente da alcuni suoi compartimenti biologici, quali la gelatina di Wharton o il sangue fetale presente all'interno dei vasi del cordone ombelicale stesso.

Anche in questo caso il processo per isolare le UC-MSCs prevede una digestione enzimatica ad opera di collagenasi, lisi specifica degli eritrociti, filtrazione cellulare e/o separazione in base al gradiente di densità [55].

3.3 COLTURA DI MSCs

Una volta isolate le MSCs, queste vengono seminate su piastre specificatamente trattate per la coltura tissutale, le quali permettono l'attecchimento di queste cellule, mentre le cellule non aderenti verranno di volta in volta rimosse con la sostituzione del medium di coltura. In pochi giorni compaiono colonie di cellule aderenti che andranno progressivamente a ricoprire il fondo dell'intera piastra confluendo tra loro [67].

A questo punto si vanno a staccare enzimaticamente queste cellule in modo tale da permetterne quindi una ulteriore espansione dopo trasferimento in nuove fiasche di coltura. Questo procedimento viene ripetuto ogni volta che vi è confluenza tra le colonie cellulari ed è definito "passaggio". Ogni passaggio richiede circa una settimana, ma può variare in base a fattori di diversa natura, relativi al donatore o alla modalità di espansione delle cellule in coltura.

Generalmente le MSCs vengono applicate dopo 2-4 passaggi, in modo da ottenere un adeguato numero di cellule e una popolazione cellulare omogenea, mentre dopo 6-7 passaggi le MSCs mostrano segni di senescenza quali una diminuita proliferazione e anomalie morfologiche, per cui non sono più ritenute adeguate per un loro impiego clinico [68] [69].

3.4 VIE DI SOMMINISTRAZIONE

L'efficacia terapeutica delle MSCs è influenzata anche dalla via di somministrazione che, determinando il microambiente primario che le cellule incontreranno, ne influenza il differenziamento, l'attività biologica e la sopravvivenza [70].

Le MSCs possono essere somministrate per:

- **Via topica:** più vantaggiosa in quanto le MSCs vengono iniettate direttamente nel tessuto target, il che limita le perdite associate alla migrazione [71]:
 - Iniezione intralesionale;
 - Iniezione vascolare locale;
- **Via sistemica:**
 - Iniezione endovenosa;
 - Iniezione endoarteriosa;
 - Iniezione peritoneale.

3.5 HOMING E MIGRAZIONE DELLE MSCs

Fisiologicamente, nel momento in cui nell'organismo interviene un danno tissutale, si ha una attivazione delle MSCs endogene, non solo quelle residenti nel tessuto interessato, ma anche quelle presenti in sedi anatomiche diverse, le quali, attraverso il circolo sistemico, migrano nel sito dove è localizzata la lesione e lì esplicano le loro azioni terapeutiche. Questo fenomeno è definito “*Homing*”.

Nel caso si ricorra all'utilizzo di MSCs esogene, questo processo prevede il susseguirsi di tre fasi (**Figura 6**):

1. Somministrazione diretta in un vaso sanguigno;
2. Extravasazione in prossimità della lesione;
3. Migrazione interstiziale verso il sito target.

Le fasi 2. e 3. vengono definite come “migrazione transendoteliale” [28].

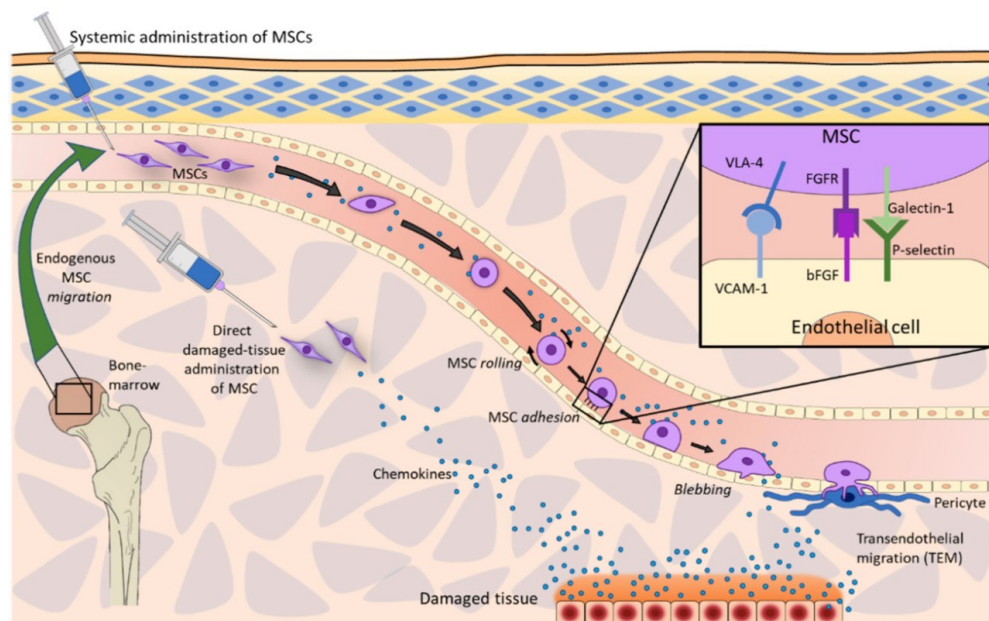


Figura 6 Homing e migrazione transendoteliale di cellule mesenchimali stromali (MSCs) [28]

Una volta giunte, attraverso il vaso sanguigno, in prossimità del sito di lesione, le MSCs cominciano a rotolare sulle cellule endoteliali in modo tale che le molecole di adesione presenti sulla loro superficie, in particolare *very late antigen 4* (VLA-4), *fibroblast growth factor receptors* (FGFR) e *Galectin-1*, interagiscano con molecole di adesione sulla superficie delle cellule dell'endotelio, quali *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), *basic fibroblast growth factor* (bFbF) e *P-selectin* [28].

Dopo l'adesione alle cellule endoteliali, le MSCs formano dei filopodi, i quali polarizzeranno, grazie alla stimolazione di *chemokine ligand 9* (CXCL-9), e con cui riescono a superare la membrana basale dell'endotelio, il cui collagene di tipo IV viene degradato da diverse metalloproteasi extracellulari [28].

3.6 L'AZIONE TERAPEUTICA DELLE MSCs

Le MSCs sono oggetto di numerosi studi nell'ambito della medicina rigenerativa per la loro capacità di rigenerare le cellule danneggiate in un tessuto che abbia subito una lesione, ma il loro effetto terapeutico non si esplica esclusivamente attraverso questa caratteristica, ma anche attraverso la loro attività paracrina e immunomodulante.

3.6.1 Attività paracrina delle MSCs

Da numerosi studi è emerso che soltanto una piccola parte delle MSCs trapiantate sopravvivono e vengono integrate nei tessuti dell'ospite, dunque appare chiaro che gli effetti terapeutici di queste cellule non dipendono soltanto da un'interazione diretta *cell-to-cell*, ma anche da un'attività paracrina, legata alla secrezione di molecole di piccole dimensioni, come fattori di crescita, citochine, chemochine, o il rilascio di vescicole extracellulari (EVs) contenenti un'ampia varietà di molecole, tra cui RNA messaggero (mRNA), peptidi, proteine e microRNA [28].

Tutti questi fattori paracrini secreti dalle MSCs sono conosciuti anche con il nome di “secretoma” [72].

Le principali attività svolte dai fattori secreti dalle MSCs, schematizzate in **Figura 7**, sono:

- Modulazione della risposta infiammatoria;
- Stimolo al processo di neo-angiogenesi;
- Promozione delle attività endoteliali e fibroblastiche;
- Facilitazione di proliferazione e differenziazione delle cellule progenitrici nei tessuti [73].

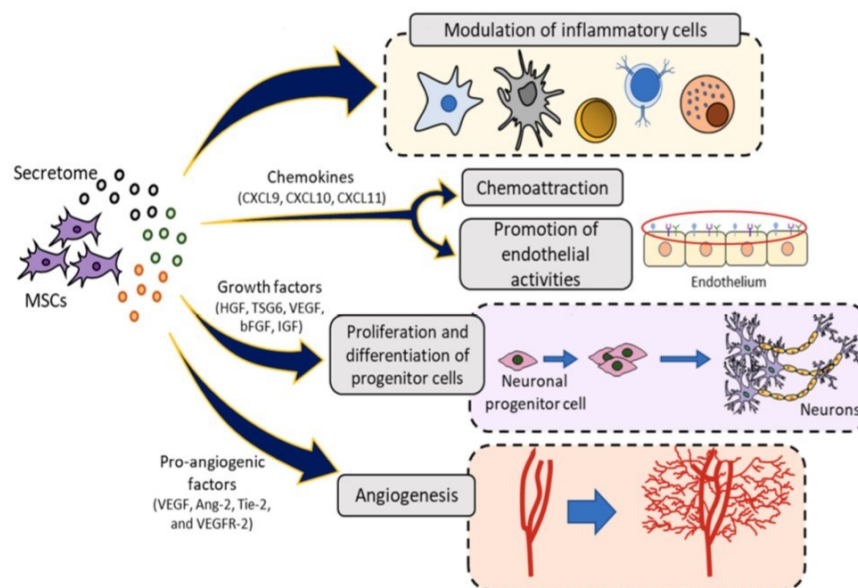


Figura 7 Attività paracrina delle cellule mesenchimali stromali (MSCs) [28]

Per la produzione di tutti questi fattori paracrini, rimane essenziale l'attivazione delle MSCs, legata alla presenza di stimoli infiammatori e/o al processo di *cross-talk* con le cellule danneggiate.

Come detto in precedenza, i meccanismi protettivi di tipo paracrino non si esplicano solo attraverso i fattori secreti, ma anche grazie alla produzione di vescicole extracellulari (EVs) e il trasferimento di mitocondri. (Figura 8)

Le EVs contengono molecole trasportatrici che includono mRNA, transfer RNA, micro RNA, peptidi e proteine, oltre a lipidi che mediano la comunicazione *cell-to-cell* e attenuano l'attivazione di cellule immunitarie, migliorano lo stress ossidativo e riducono l'apoptosi [28].

Per quanto riguarda il trasferimento di mitocondri, è stato dimostrato che vi è un incremento dell'attività di fagocitosi come conseguenza del trasferimento mitocondriale dalle MSCs alle cellule dell'immunità innata [74].

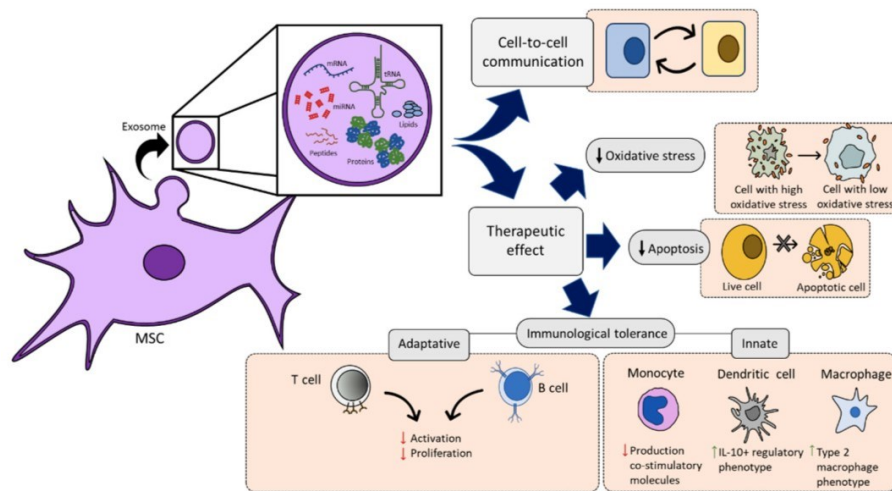


Figura 8 Effetti terapeutici delle vescicole extracellulari (EVs) secrete dalle cellule mesenchimali stromali (MSCs). [28]

3.6.2 Attività di immunomodulazione delle MSCs

L'azione terapeutica delle MSCs è infine legata anche alla loro capacità di regolare la risposta immunitaria in seguito ai segnali ricevuti dal microambiente circostante, come citochine infiammatorie o fattori ipossici, mediante la secrezione di fattori immunomodulatori che possono sopprimere o incentivare la risposta immunitaria stessa.

Tra le MSCs si sono distinti due diversi fenotipi: il fenotipo delle MSCs pro-infiammatorie, o MSC1, e il fenotipo delle MSCs anti-infiammatorie, o MSC2, in grado di produrre rispettivamente fattori pro-infiammatori e fattori anti-infiammatori [75]. Tale differenziazione sembra essere legata all'interazione tra i fattori paracrini provenienti dal microambiente circostante e i recettori presenti sulla superficie delle MSCs, in particolare i *Toll-like receptors* (TLR).

L'azione pro-infiammatoria o immunosoppressiva delle MSCs si esplica attraverso gli effetti che esse hanno sulle cellule immunitarie, sia innate che adattative, come linfociti T, macrofagi, Natural Killer, linfociti B, neutrofili e cellule dendritiche. In particolare le MSCs sono fondamentali per la sopravvivenza delle cellule T.

In corso di una infiammazione acuta, le MSCs, attivate dalle citochine pro-infiammatorie secrete dalle cellule T effettrici, rilasciano grandi quantità di

prostaglandina E2 (PGE2), interleuchina-10 (IL-10), indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) e chemochine come CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12 e CXCR4. Queste chemochine attraggono le cellule T in prossimità delle MSCs attivate, dove i cataboliti dell'IDO le inibiscono e ne inducono l'apoptosi [76].

Il secretoma delle MSCs è inoltre in grado di inibire la proliferazione e differenziazione delle cellule T in cellule T helper, come Th1 e Th17, inducendo i macrofagi a produrre *transforming growth factor-β* (TGF-β) e promuovendo la differenziazione in cellule T regolatorie (Treg) [77].

L'azione immunomodulatoria delle MSCs può anche influenzare l'attività delle cellule B, inibendone la proliferazione e la differenziazione in cellule plasmatiche [78].

Le MSCs regolano l'azione non soltanto delle cellule dell'immunità adattativa, ma anche di quella innata, in particolare sono in grado di determinare una inibizione della proliferazione delle cellule Natural Killer (NK) attuando una downregolazione della loro attivazione, mediata da interleuchina-2 (IL-2) o interleuchina-15 (IL-15). Inoltre queste cellule possono inibire la differenziazione dei monociti CD14+ in cellule dendritiche (DC) e possono bloccare la secrezione di *Tumor Necrosis Factor α* (TNFα) come promotore della secrezione di IL-10 e IL-4 da parte delle DC, impedendo ulteriormente in questo modo la differenziazione delle cellule T in cellule Th1 e indirizzandole verso le cellule Treg e Th2 [79] [80].

Anche l'azione dei macrofagi può essere influenzata dall'interazione con le MSCs: è emerso che una elevata espressione di IDO in presenza di citochine pro-infiammatorie, può guidare i monociti a differenziarsi nel fenotipo immunosoppressivo e anti-infiammatorio dei macrofagi di tipo 2 (M2). La possibilità di commutare il fenotipo pro-infiammatorio dei macrofagi di tipo 1 (M1) in M2 può risultare utile nel trattamento della sepsi [81].

3.6.3 Attività antimicrobica delle MSCs

Sia *in vitro* che *in vivo*, le MSCs hanno dimostrato di possedere una importante attività antimicrobica, che si manifesta attraverso diversi meccanismi, i quali possono variare in base alla specie del donatore, alle specie target dei batteri, alla fonte delle MSCs e all'eventuale utilizzo di protocolli di attivazione o priming delle MSCs.

L'effetto antimicrobico può esplicarsi attraverso meccanismi diretti e indiretti.

Il meccanismo diretto è basato sulla secrezione da parte delle MSCs, tra le altre sostanze comprese nel secretoma, di peptidi antimicrobici (AMPs) come catelicidina, defensina e lipocalina, in grado di danneggiare la membrana cellulare dei batteri e modulare l'immunità innata dell'ospite [82].

Il meccanismo indiretto prevede, invece, l'interazione delle MSCs con il sistema immunitario dell'ospite, attraverso i fattori paracrini e interazioni dirette *cell-to-cell*: i principali attori di questo processo sono i macrofagi, come già precedentemente illustrato, e i granulociti neutrofilo polimorfonucleati, la cui capacità di fagocitosi viene migliorata attraverso la secrezione di IL-6 e IL-8 da parte delle MSCs [82].

4 IL PLASMA RICCO DI PIASTRINE (PRP)

Il plasma ricco di piastrine (PRP) rappresenta oggi uno degli agenti più promettenti nell'ambito della medicina rigenerativa e se ne vede un crescente utilizzo in diversi ambiti della medicina.

All'inizio del XX secolo si ricorreva alla trasfusione di piastrine nel trattamento di quadri patologici caratterizzati da trombocitopenia, ma è nel 1954 che è stato per la prima volta introdotto il termine di “plasma ricco di piastrine” in riferimento al concentrato piastrinico standard per la trasfusione. [83]

Il PRP è descritto come una sospensione di piastrine in plasma autologo, con una concentrazione piastrinica più elevata rispetto a quella originaria del sangue raccolto [84].

All'interno delle piastrine sono presenti numerosi α -granuli contenenti centinaia di sostanze bioattive, in particolare fattori di crescita (GF), tra cui i più importanti sono *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β 1), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *connective tissue growth factor* (CTGF) e *hepatocyte growth factor* (HGF) [85].

Numerosi studi hanno dimostrato che tali fattori di crescita sono dotati di un'influenza dose-risposta diretta sulla migrazione cellulare, sulla proliferazione cellulare e sulla sintesi della matrice: ciò permette di ipotizzare che la somministrazione locale di una maggior concentrazione di questi GF tramite il PRP possa ottimizzare il contenuto di molecole biologicamente attive del sito di guarigione e dunque incrementare la risposta riparativa in un tessuto patologicamente compromesso [86].

In medicina veterinaria il PRP è stato usato principalmente nel trattamento di:

- Ferite profonde, ferite croniche, ulcere della cute e fistole nel cane;
- Tendinopatie nei cavalli sportivi;
- Patologie articolari del cane e del cavallo;

- Mastiti nella specie bovina [87].

4.1 RUOLO TERAPEUTICO DEL PRP

Le piastrine sono importanti protagoniste nei processi di guarigione per molteplici motivi.

Prima di tutto, esse sono responsabili del processo di aggregazione che si esplica attraverso il rilascio di fattori che promuovono la coagulazione. Inoltre, esse contengono numerosi GF e citochine implicati nell'infiammazione, nell'angiogenesi, nella migrazione delle cellule staminali e nella proliferazione cellulare [88]. Le piastrine sono poi in grado di richiamare macrofagi, MSCs e osteoblasti tramite il rilascio di varie proteine bioattive quali vitronectina, trombospondina e fibronectina [89].

Il PRP, dunque, può essere considerato come una fonte naturale di molecole di segnale e, in seguito all'attivazione delle piastrine in esso contenute, si verifica la degranolazione dei granuli P e il rilascio di GF e citochine in grado di modificare il microambiente pericellulare [88].

4.1.1 Attività antimicrobica

Importanti sono anche le dimostrazioni dell'attività antimicrobica collegata all'utilizzo del PRP. Ci sono infatti diversi studi, sia *in vivo* che *in vitro*, che dimostrano come tale preparato sia in grado di inibire la crescita di diverse classi di batteri, con azione sostanzialmente batteriostatica più che battericida, in modo più marcato nel caso dei Gram negativi (Gram-), ma anche in alcuni Gram positivi (Gram+), tra cui *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* [90] [91] [92] [93].

Ciò si verifica per diversi motivi; in particolare le piastrine producono numerosi metaboliti dell'ossigeno, quali *perossido di idrogeno*, *superossido* e *radicali liberi idrossilici* [94], e rilasciano diversi peptidi ad effetto antibatterico quali *fibrinopeptide A*, *fibrinopeptide B*, *timosina β -4*, *proteina basica piastrinica*, *connective-tissue-activating peptide 3*, *RANTES (Regulated on Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted)* e *fattore piastrinico 4* [95].

4.2 PREPARAZIONE DEL PRP

Il PRP è prodotto, partendo da sangue intero, tramite un processo definito “centrifugazione differenziale” in cui, regolando la forza di accelerazione, si ottiene la sedimentazione dei diversi costituenti cellulari in base alla gravità [88] [96].

La preparazione di tale prodotto può avvenire con due metodi differenti:

1. *PRP method*;
2. *Buffy-coat method*.

4.2.1 Preparazione del PRP tramite *PRP method* [96]

Questo metodo prevede un doppio processo di centrifugazione. (**Figura 9**)

Il sangue intero viene raccolto in provette contenenti un anticoagulante (di solito citrato destrosio ACD) ed è sottoposto ad una prima centrifugazione che separa gli eritrociti dalla restante parte di volume di sangue intero, rendendo possibile l'individuazione di tre strati:

- Lo strato superiore di plasma che contiene principalmente piastrine e leucociti;
- Uno strato intermedio, conosciuto come *buffy-coat*, ricco in leucociti all'interfaccia tra il plasma e lo strato inferiore;
- Lo strato inferiore costituito principalmente da eritrociti.

A questo punto il plasma contenente le piastrine viene trasferito in una seconda provetta sterile e viene sottoposto ad una seconda centrifugazione a velocità più elevata per ottenere un pellet piastrinico sul fondo della provetta e plasma povero di piastrine (PPP).

I $\frac{2}{3}$ superiori del PPP vengono rimossi, mentre nella restante porzione viene risospeso il pellet piastrinico: si ottiene così il PRP.

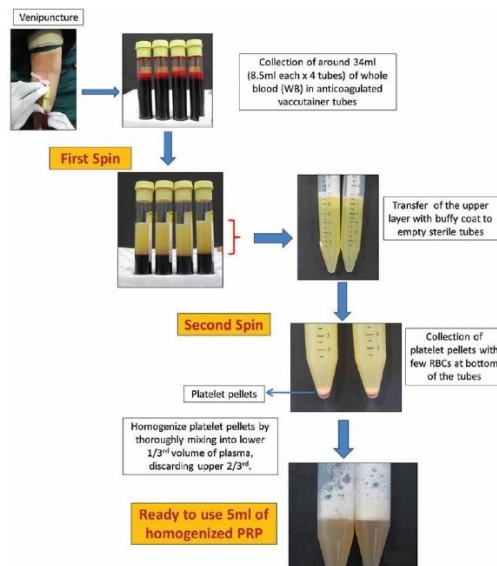


Figura 5 Preparazione del PRP tramite PRP method [96]

4.2.2 Preparazione del PRP tramite *buffy-coat method* [96]

Questo secondo metodo prevede che il sangue intero venga conservato ad una temperatura compresa tra i 20°C e i 24°C prima della centrifugazione.

Si esegue quindi una centrifugazione ad elevata velocità del sangue intero, che porta alla formazione di tre strati: quello inferiore costituito essenzialmente da eritrociti, quello intermedio contenente leucociti e piastrine, e quello superiore costituito da PPP.

Il PPP supernatante viene rimosso e lo strato di *buffy-coat* intermedio viene trasferito in un'altra provetta sterile.

Si può infine eseguire una centrifugazione a bassa velocità o utilizzare dei filtri specifici, in modo da separare i leucociti dalle piastrine, le quali verranno risospese in una porzione limitata di PPP. Mediante una centrifugazione a bassa velocità, infatti, è possibile sfruttare la differente densità di piastrine e globuli bianchi per ottenere la sedimentazione selettiva di quest'ultima popolazione cellulare.

4.3 CLASSIFICAZIONE DEPA DEL PRP

Come detto in precedenza, con il termine PRP ci si riferisce ad una sospensione di piastrine in plasma autologo ad una concentrazione più elevata rispetto a quella nel sangue originariamente prelevato [84]. Tale definizione tuttavia risulta piuttosto generica, in quanto si possono osservare delle differenze biologiche significative tra i diversi preparati, le quali possono spiegare la grande variabilità nei benefici clinici del PRP [97].

In letteratura scientifica e nei manuali dei produttori, si fa più frequentemente riferimento al solo parametro dell'incremento nella concentrazione di piastrine nel PRP rispetto che nel sangue, legato all'efficacia di tale trattamento: una concentrazione piastrinica nel PRP inferiore rispetto a quella nel sangue intero potrebbe non determinare una risposta cellulare sufficiente, mentre una concentrazione piastrinica superiore a sei volte quella ematica potrebbe avere un effetto inibitorio sulla guarigione [98] [99].

Questo ha portato a definire diversi metodi di classificazione del PRP, nessuno dei quali è stato tuttavia largamente adottato.

Più recente e puntuale risulta invece essere la classificazione DEPA [97], basata sui seguenti parametri:

- Dose di piastrine iniettate;
- Efficienza della produzione;
- Purezza del PRP;
- Attivazione del PRP.

Tale classificazione risulta possibile soltanto se viene effettuata una conta cellulare completa sia sul sangue intero che sul PRP, associata ai dati relativi al volume di sangue raccolto e a quello di PRP somministrato.

4.3.1 Dose di piastrine iniettate

La dose di piastrine iniettate può essere calcolata moltiplicando la concentrazione piastrinica del PRP per il volume di PRP ottenuto e iniettato.

In base al risultato, questo parametro può essere categorizzato in quattro diverse classi, illustrate in **Tabella 3** [97].

Tabella 3 Classificazione del PRP in base alla dose di piastrine iniettate [97]

A	Dose molto alta di piastrine iniettate	>5 miliardi
B	Dose alta di piastrine iniettate	3-5 miliardi
C	Dose media di piastrine iniettate	1-3 miliardi
D	Dose bassa di piastrine iniettate	<1 miliardo

4.3.2 Efficienza della produzione

Il secondo criterio di classificazione consiste nell'efficienza di produzione del PRP.

Il tasso di recupero delle piastrine o efficienza di cattura delle piastrine corrisponde alla percentuale di piastrine presenti nel PRP ottenuto, rispetto alle piastrine presenti nel prelievo di sangue iniziale. In base a questo parametro, si individuano quattro classi, illustrate in **Tabella 4** [97].

Tabella 4 Classificazione del PRP in base all'efficienza della produzione [97]

A	Alta efficienza	>90%
B	Media efficienza	70% - 90%
C	Bassa efficienza	30% - 70%
D	Scarsa efficienza	<30%

4.3.3 Purezza del PRP

Come terzo criterio di classificazione, si considera la composizione relativa in piastrine, leucociti ed eritrociti nel PRP prodotto.

In particolare, in base alla percentuale di piastrine rispetto ad eritrociti e leucociti, si individuano quattro classi, illustrate in **Tabella 5** [97].

Tabella 5 Classificazione del PRP in base alla sua purezza [97]

A	Very pure PRP	>90%
B	Pure PRP	70% - 90%
C	Heterogeneous PRP	30% - 70%
D	Whole blood PRP	<30%

4.3.4 Attivazione del PRP

Per concludere, si può decidere di attivare le piastrine contenute nel PRP mediante l'aggiunta di fattori della coagulazione esogeni: in questo caso, il prodotto sarà indicato come "x" secondo il sistema di classificazione PAW [97] [100].

Le piastrine possono essere attivate in modo endogeno o grazie all'aggiunta di fattori della coagulazione esogeni: questo determina degli effetti diversi ed influenza significativamente la cinetica dei fattori di crescita [100].

L'attivazione esogena comporta la rapida coagulazione delle piastrine con formazione di un coagulo, che sarà più facilmente applicato in modo manuale che non tramite iniezione. Ciò significa che al momento della applicazione del PRP occorre valutare attentamente il tipo di patologia a cui sarà applicato e la cinetica del processo di coagulazione. La formazione di un coagulo (gel piastrinico) permette di localizzare in modo più accurato il rilascio dei GF, il quale risulta anche più prolungato, perché si ritiene che i GF si liberino lentamente dal coagulo nell'arco di diversi giorni [100].

L'attivazione piastrinica può avvenire anche in modo endogeno, senza l'aggiunta di fattori della coagulazione esogeni, per diversi motivi: il contatto con il collagene del tessuto in cui il PRP viene iniettato, l'agitazione delle piastrine durante il processo di centrifugazione, il sanguinamento indotto dall'ago durante l'iniezione di PRP. Questo permette di avere una aggregazione piastrinica più lenta e un pattern naturale di rilascio dei GF ad opera del collagene, che agisce da attivatore. Infine, il fatto che il coagulo si formi dopo l'iniezione, permette la somministrazione tramite ago, che sarà quindi più precisa all'interno del tessuto target [100].

Le principali sostanze che determinano attivazione piastrinica, e le loro caratteristiche, sono riportate in **Tabella 6** [100].

Tabella 6 Principali attivatori piastrinici e loro caratteristiche [100].

Trombina	Causa una rapida aggregazione piastrinica. La rapida attivazione può causare eccessiva condensazione della matrice di fibrina con significativa retrazione del coagulo. Determina inoltre una diminuzione della quantità totale di GF disponibili nel tempo nel tessuto. Possibile instaurarsi di una coagulopatia immunomediata con formazione di anticorpi diretti contro la trombina esogena, di norma di origine bovina.
Cloruro di calcio	Determina la formazione di una matrice fibrinica meno condensata di quella indotta dalla trombina. Tale matrice di fibrina rappresenta un meccanismo di intrappolamento per le piastrine, con conseguente formazione endogena di una quantità minore di trombina e rilascio più lento dei GF in 7 giorni, con miglioramento della migrazione cellulare e della guarigione. Ha un pH basso che determina un significativo dolore e una sensazione di bruciore nel punto di inoculo.
Cloruro di calcio + trombina	Il cloruro di calcio determina coagulazione del plasma mentre la trombina causa la polimerizzazione della fibrina in un gel insolubile, dunque con la loro associazione si forma una matrice gelatinosa. Questo offre il vantaggio di avere un effetto più lento e modulato nel tempo del rilascio di GF.
Collagene di tipo I	Efficace come la trombina nell'attivare le piastrine e stimolare il rilascio di GF. Maggior rilascio di TGF- β rispetto alla attivazione con trombina. Minor retrazione del coagulo rispetto a quanto avviene con la trombina.

5 LA MEDICINA RIGENERATIVA NELLA BOVINA DA LATTE

La medicina rigenerativa ha trovato applicazione storicamente nel trattamento di stati patologici nella specie equina, con particolare riferimento alle tendinopatie del cavallo sportivo, tuttavia, negli ultimi anni, questi nuovi approcci terapeutici hanno cominciato ad essere applicati anche negli animali da affezione, maggiormente nel cane, ma anche nel gatto, per problematiche legate a diversi apparati.

Oggigiorno, però, l'interesse legato ai trattamenti alternativi alla medicina convenzionale, quali le MSCs e il PRP, si è destato anche nell'ambito della buiatria, ed in particolare per quanto riguarda la bovina da latte.

Al 31/12/2022 risultano iscritti nella Banca Dati Nazionale oltre 2.600.000 bovini allevati specificatamente per la produzione di latte, presenti in maggior densità in Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto e Piemonte, di cui più di 148.000 nel solo territorio della provincia di Parma [101].

La produzione di latte a livello nazionale si è attestata negli ultimi anni attorno a 12.000.000 di tonnellate, con un lieve calo nell'ultimo anno legato principalmente all'aumento dei costi dell'energia e delle materie prime conseguente allo scoppio della guerra tra Ucraina e Russia. In **Figura 10** vi è un riepilogo relativo alle quantità di prodotti lattiero-caseari prodotti in Italia nel 2022 secondo i dati ISTAT [102].

Territorio		Italia											
Tipo dato		quantità di prodotti lattiero caseari											
Selezione periodo		Gen-2022	Feb-2022	Mar-2022	Apr-2022	Mag-2022	Giu-2022	Lug-2022	Ago-2022	Set-2022	Ott-2022	Nov-2022	Dic-2022
Tipo di prodotto lattiero caseario													
latte di vacca proveniente dalle aziende agricole migliaia di tonnellate		1096,86	1029,21	1116,22	1145,23	1114,03	1079,31	1082,92	1045,76	1015,99	1025,14	1012,04	1045,45
materia grassa del latte di vacca proveniente dalle aziende agricole (tenore percentuale)		3,84	3,81	3,82	3,77	3,71	3,65	3,64	3,68	3,67	3,78	3,88	3,92
materia proteica del latte di vacca proveniente dalle aziende agricole (tenore percentuale)		3,46	3,44	3,44	3,41	3,45	3,44	3,44	3,41	3,42	3,47	3,5	3,48
latte alimentare migliaia di tonnellate		229,05	219,57	217,88	218,99	209,86	198,44	195,74	198,33	197,12	201,89	217,88	216,85
crema migliaia di tonnellate		13,19	11,61	12,31	11,87	11,69	11,23	11,41	12,87	12,48	12,91	13,01	13,99
latte fermentato migliaia di tonnellate		25,55	22,39	22,98	23,03	22,33	23,79	26,63	25,01	23,01	24,29	23,93	24
burro migliaia di tonnellate		8,78	8,07	8,64	8,8	8,02	8,11	8,09	7,99	8,04	8,61	8,35	9,01
formaggio di latte di vacca migliaia di tonnellate		99,34	98,03	99,01	100,02	102,99	101,45	96,04	98,67	101,82	102,11	100,46	101,22

Figura 10 Quantità di prodotti lattiero-caseari prodotti in Italia nel 2022 [102]

Da questi numeri emerge l'importanza anche economica di questo comparto. Si può dunque dedurre che la salute delle bovine da latte e le strategie terapeutiche adottate risultano di elevato interesse.

5.1 L'ANTIMICROBICO-RESISTENZA

Parlando delle caratteristiche terapeutiche sia delle MSCs che del PRP, si è fatto riferimento alla loro attività antimicrobica. Considerando il preoccupante e ingravescente fenomeno dell'antimicrobico-resistenza, la medicina rigenerativa potrebbe rappresentare una nuova importante frontiera nella lotta alle infezioni, che potrebbe permettere una riduzione dell'utilizzo di antibiotici su larga scala nell'allevamento bovino, con l'ulteriore vantaggio pratico dell'assenza di tempi di sospensione legati al trattamento effettuato.

La comparsa di microrganismi multi-resistenti è legata all'utilizzo spesso improprio, soprattutto negli anni passati, degli antibiotici, con una grande rilevanza sulla Sanità pubblica, considerando che nella Comunità Europea si stimano 25.000 decessi ogni anno per infezioni causate da batteri resistenti e un ingente aumento dei costi sanitari [103].

Anche la medicina veterinaria e le attività zootecniche sono coinvolte in questa problematica: esiste uno scambio continuo e reciproco di microrganismi tra animale, ambiente e uomo attraverso contatto diretto uomo-animale, tramite i reflui dispersi nell'ambiente e con il consumo di alimenti di origine animale, dunque le resistenze che emergono in un allevamento, possono diffondersi. Per questo motivo vi è la necessità di agire in un'ottica *One Health*.

5.2 CAMPI DI APPLICAZIONE

Sebbene sia noto che le terapie basate sulla somministrazione di MSCs o di PRP possano essere usate nei trattamenti di quadri patologici che insistono su diversi apparati e sistemi, nell'ambito della bovina da latte risulta di primaria importanza focalizzare l'attenzione sull'applicazione della medicina rigenerativa nelle principali problematiche riproduttive e produttive, le quali rivestono un ruolo rilevante sia dal punto di vista sanitario che economico.

Verranno, dunque, approfondite le seguenti patologie e le relative possibili terapie innovative:

- Disfunzioni ovariche;
- Metrite-endometrite;
- Mastite.

6 LA MEDICINA RIGENERATIVA NELLE DISFUNZIONI OVARICHE

Negli ultimi cinquant'anni si è registrata una forte spinta nella selezione per la produzione di latte, con un effettivo incremento nei quantitativi prodotti dai singoli animali, tuttavia questo ha portato, come effetto negativo, ad una diminuzione della fertilità che, pur essendo migliorata negli ultimi due decenni, risulta ancora non ottimale [104].

Le due principali disfunzioni ovariche causa di infertilità sono l'ipofunzionalità ovarica e le cisti ovariche, le quali possono avere risvolti economici importanti all'interno di una azienda e per cui le più comuni strategie terapeutiche adottate non sempre determinano una risposta soddisfacente, motivo per cui la medicina rigenerativa potrebbe trovare in questo campo una più larga applicazione.

6.1 L'IPOFUNZIONALITÀ OVARICA

Per ovaio inattivo si intende una condizione in cui vengono rilevate strutture follicolari con diametro inferiore ai 4 mm in assenza di tessuto luteinico in due visite successive distanziate di 7-10 giorni [105]. Questo si traduce nella mancanza di pulsatilità dell'LH, responsabile della crescita follicolare, con conseguente anaestro vero. Per la diagnosi di questa condizione si ricorre all'ultrasonografia con sonde lineari-settoriali da 7,5 MHz, con cui si può apprezzare uno stroma ovarico ipoecogeno, al cui interno sono presenti strutture anecogene di 3-4 mm, come è possibile osservare in **Figura 11** [106].

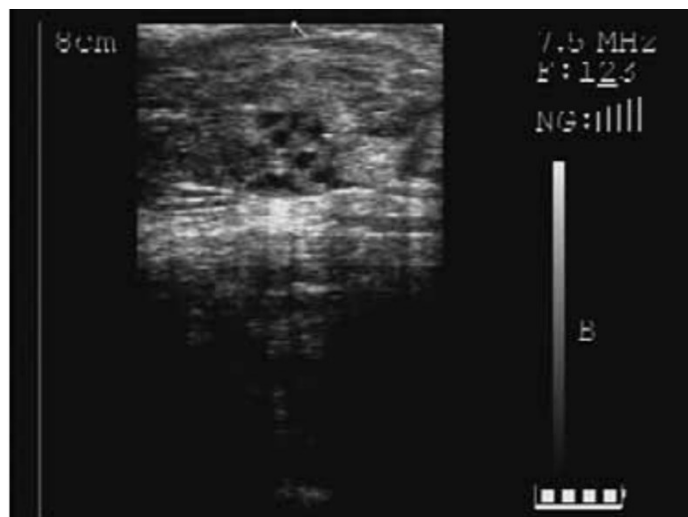


Figura 11 Ultrasonografia di ovaio inattivo. [106]

Più in generale si può parlare di ipofunzionalità ovarica, definita come la presenza di follicoli aventi diametro compreso tra 8 mm e 15 mm visibile in due visite consecutive distanziate di 7 giorni, in assenza di un corpo luteo o cisti e senza segni di estro nei giorni considerati [107]. Questo è associato ad una pulsatilità intermedia dell'LH, conseguenza di elevate concentrazioni di progesterone o dello stress da caldo [108].

Per fronteggiare la suddetta problematica, sono stati messi a punto diversi protocolli a cui si fa convenzionalmente ricorso, tra cui quello di *Ovsynch* e il ricorso a dispositivi intravaginali che rilasciano progesterone (PRID), tuttavia i risultati che si

ottengono sono comunque insoddisfacenti, registrando un tasso di estro negli animali colpiti generalmente inferiore al 30% [109] [110].

6.2 TRATTAMENTO DELL'IPOFUNZIONALITÀ OVARICA CON MSCs

Attualmente in letteratura non sono presenti studi relativi alla somministrazione di MSCs nel trattamento dell'ipofunzionalità ovarica condotti specificatamente sulla specie bovina, tuttavia, da studi effettuati su animali da laboratorio in cui è stata indotta una insufficienza ovarica mediante chemioterapia o radioterapia, è emerso che la somministrazione di MSCs derivate da diverse fonti per via endovenosa o, con ancora migliori risultati, tramite iniezione intraovarica e quindi intraperitoneale, determina un miglioramento di questa condizione, con un aumento nel numero di follicoli e promuovendo la loro maturazione, inibendo inoltre processi di apoptosi cellulare [111] [112].

Una pratica diffusa nell'allevamento della bovina da latte è il prelievo degli ovuli per la produzione *in vitro* di embrioni, che a lungo andare, a causa delle lesioni ovariche associate, può portare ad una riduzione della fertilità. A tal proposito, da uno studio pubblicato nel 2020 [113], è emerso che la somministrazione intraovarica di MSCs in bovine con problematica in forma acuta, determina un aumento nel numero di oociti totali e vitali, con conseguente incremento nel numero di embrioni prodotti. Non si sono registrate invece differenze significative con i gruppi di controllo nel caso di bovine sottoposte a molteplici sessioni di prelievo degli ovuli, dunque con un quadro di infertilità progressiva.

Dalle evidenze al momento disponibili, risulta ragionevole supporre che anche le bovine da latte possano rappresentare un modello utile per lo studio di disordini ovarici e di nuovi trattamenti basati sulle MSCs [112].

6.3 TRATTAMENTO DELL'IPOFUNZIONALITÀ OVARICA CON PRP

Per quel che concerne la somministrazione intraovarica di PRP, ci sono numerose evidenze relative alla sua efficacia nel trattamento dell'ipofunzionalità ovarica, sia in modelli murini, sia in medicina umana, sia specificatamente nella bovina da latte.

Nello studio di Cremonesi et al. [114], il principale relativamente a questo approccio terapeutico, sono state selezionate 12 bovine in cui è stata confermata l'insufficienza ovarica bilaterale tramite esame ultrasonografico. In modo randomizzato sono state divise nel gruppo delle trattate (che ha ricevuto poi somministrazione intraovarica di PRP) e nel gruppo di controllo (che ha ricevuto somministrazione intraovarica di placebo per escludere la possibilità che l'ago causasse un trauma all'ovaio), ognuno composto da 6 animali.

Nel gruppo delle trattate, un animale non ha ricevuto il trattamento a causa di una fistola retto-vaginale che impediva l'accesso alle ovaie.

Ognuno degli animali trattati ha ricevuto 5 mL di PRP alla concentrazione di 1×10^9 piastrine/mL in ogni ovaio. Negli animali controllo sono stati iniettati 5 mL di soluzione fisiologica 0,9% NaCl in ogni ovaio.

Nelle 4 settimane seguenti al trattamento, si è registrato un incremento da moderato a forte nella concentrazione del progesterone in quattro delle cinque bovine trattate, mentre non vi sono state variazioni nel gruppo di controllo. Negli animali in cui si è registrato l'aumento dei livelli di progesterone, si è instaurata gravidanza a seguito di inseminazione artificiale. Le informazioni relative ai singoli animali sono riportate in **Tabella 7** e **Tabella 8**.

Tabella 7 Animali trattati con PRP [114]

Cow ID	Age (years)	N° lactation	Progesterone concentration (ng/ml)			Pregnancy after PRP treatment
			week0	week+2	week+4	
70	3	2	0.89	1.57	4.27	Yes
175	2	1	0.32	0.31	3.54	Yes
424	4	3	0.45	2.63	0.58	No
438	3	2	1.87	1.14	6.23	Yes
779	5	4	Not treated because of rectovaginal fistula			
1,078	2	1	1.2	5.67	4.76	Yes

Tabella 8 Animali trattati con placebo [114]

Cow ID	Age (years)	N° lactation	Progesterone concentration (ng/ml)			Pregnancy
			week0	week+2	week+4	
321	2	1	0.47	0.65	0.82	No
267	2	1	0.45	0.75	0.69	No
643	3	2	0.37	0.66	0.84	No
185	4	3	0.77	1.03	0.82	No
482	3	2	0.86	0.66	0.49	No
947	3	2	0.49	0.79	0.85	No

Si presume che il PRP agisca nei confronti della disfunzione ovarica mediante la secrezione di fattori aventi effetti benefici sui follicoli: il meccanismo d'azione non è ancora chiaro, ma esistono due ipotesi principali al riguardo.

La prima ipotesi è quella secondo cui i fattori di crescita e le citochine apportati con il PRP ripristinano la fertilità rivitalizzando gli oociti dormienti, presenti fin dalla nascita nelle femmine di mammifero.

In alternativa, si ritiene che a livello ovarico possano esistere delle cellule staminali ovariche, le quali verrebbero proprio stimulate dalle molecole di segnale contenute nel PRP [115].

6.4 LE CISTI OVARICHE

Le cisti ovariche (**Figura 12**) rappresentano un altro dei più comuni disordini riproduttivi nella bovina da latte: si tratta di strutture follicolari di diametro maggiore di 20 mm rilevate su una o entrambe le ovaie in due esami ultrasonografici effettuati a distanza di 7 giorni l'uno dall'altro, in assenza di corpo luteo. L'ipotesi più accreditata relativamente alla loro formazione è legata a fattori che alterano la comunicazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, con in particolare assenza del picco di GnRH rilasciato dall'ipotalamo come *feedback* per l'aumento dei livelli di estradiolo: in conseguenza di ciò, viene a mancare il picco di LH pre-ovulatorio rilasciato dall'ipofisi anteriore e quindi il follicolo pre-ovulatorio non ovula e diventa cistico [116].

Tra i fattori predisponenti chiamati in causa si riscontrano: disordini metabolici, stress, infezioni uterine, zoppie e predisposizione genetica.

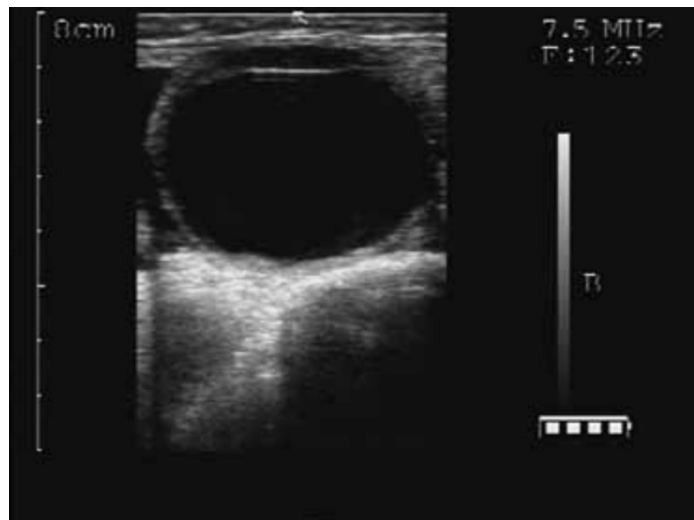


Figura 6 Cisti ovarica [106]

Nella maggior parte dei casi, le cisti ovariche regrediscono spontaneamente, mentre nei rimanenti inibiscono l'inizio del ciclo. Il trattamento di questa condizione è basato sulla somministrazione di GnRH esogeno, ma più in particolare dai primi anni 2000 si è iniziato a somministrare un agente luteolitico dopo la rottura manuale transrettale delle cisti stesse [110].

6.5 TRATTAMENTO DELLE CISTI OVARICHE CON MSCs

In riferimento all'utilizzo di MSCs nel trattamento delle cisti ovariche, vi sono evidenze della sua efficacia supportate sia da studi su modelli murini [117], sia da studi condotti specificatamente sulla bovina da latte [118] [119].

Nello studio di Chang et al. [118], sono state coltivate MSCs derivanti dal liquido amniotico. Sono stati inclusi 16 animali in cui è stata confermata per via ultrasonografica una condizione di distrofia ovarica bilaterale. Il gruppo delle bovine trattate ha ricevuto una iniezione intraovarica di una sospensione di 50 µL con una concentrazione di $5,8 \times 10^5$ cellule, mentre nel gruppo di controllo sono stati somministrati 50 µL di PBS contenenti l'1% di alcol polivinilico.

I livelli sierici di progesterone sono aumentati significativamente tra la decima e la quindicesima settimana nel 25% degli animali trattati; all'esame ultrasonografico del gruppo che ha ricevuto il trattamento, sono emersi follicoli maturi; si sono registrati un tasso di estro del 50% a fronte dello 0% negli animali controllo e un tasso di gravidanza del 25% nelle bovine trattate a fronte dello 0% del gruppo di controllo.

Questi risultati suggeriscono che la somministrazione intraovarica di MSC derivanti dal liquido amniotico può ristabilire la fertilità nella bovina affetta da distrofia ovarica.

Nello studio di Peng et al. [119] sono stati messi a confronto animali di controllo, animali trattati con terapia ormonale a base di GnRH-PG-GnRH e animali che hanno ricevuto somministrazione intraovarica di MSCs di origine placentare.

Nelle bovine trattate con MSCs, sono stati registrati dei tassi più elevati di recupero, di estro e di concepimento a seguito di inseminazione artificiale: tale approccio dimostra, quindi, un potenziale terapeutico nel trattamento delle cisti ovariche della bovina da latte.

6.6 TRATTAMENTO DELLE CISTI OVARICHE CON PRP

Attualmente in letteratura sono pochi gli studi disponibili che approfondiscano l'uso del PRP nel trattamento delle cisti ovariche, tuttavia, da una sperimentazione su modelli murini cui è stata indotta una sindrome dell'ovaio policistico tramite somministrazione sottocutanea di deidroepiandrosterone (DHEA), è emerso che, dopo somministrazione, a livello del mesovario circostante alle ovaie, di PRP, vi è formazione di corpo luteo e di un elevato numero di follicoli pre-antrali e antrali, con riduzione dei livelli sierici di FSH, LH, testosterone e androstenedione [120].

Ulteriori studi risultano necessari per capire la reale valenza terapeutica della somministrazione di PRP in presenza di cisti ovariche nella specie bovina.

7 LA MEDICINA RIGENERATIVA NELLA METRITE- ENDOMETRITE

Nell'allevamento bovino, le infezioni e le infiammazioni a carico dell'utero sono una delle problematiche più diffuse e con maggior impatto economico, infatti determinano un generale peggioramento delle performances riproduttive dal momento che comportano: aumento dell'intervallo parto-concepimento; aumento del numero di interventi fecondativi per gravidanza; incremento del tasso di riforma; aumento dei tassi di morte embrionale precoce e tardiva [121] [122].

In questo contesto si prendono in considerazione la metrite e l'endometrite, due quadri patologici che possono presentarsi associati tra loro nel complesso metrite-endometrite, oppure manifestarsi in modo indipendente l'uno dall'altro.

7.1 LA METRITE

La metrite è un processo infettivo-infiammatorio a carico del miometrio e dell'endometrio, che si manifesta entro il ventesimo giorno *post partum*, e colpisce normalmente circa il 20% delle bovine a causa della compromissione delle difese immunitarie e/o dell'aggressività dei batteri coinvolti [123].

7.1.1 Fattori predisponenti

Numerosi sono i fattori predisponenti individuati, tra cui si riconoscono: distocia; gravidanza gemellare; ritenzione di placenta; prolasso uterino; parto prematuro; nascita di vitello non vitale; patologie metaboliche; dislocazione dell'abomaso; ridotta ingestione nel peri-parto e bilancio energetico negativo con incremento degli acidi grassi non esterificati (NEFA) e del β -idrossibutirrato; aumento dell'aptoglobina sierica; incremento dei livelli di progesterone con conseguente inibizione della sintesi di prostaglandine [124].

7.1.2 Eziopatogenesi

Subito dopo il parto, si verifica la colonizzazione dell'utero da parte di *E. coli* come primo agente patogeno, ed in particolare di ceppi definiti *Endometrial Pathogenic E. coli* (EnPEC) che, aderendo e penetrando nelle cellule endometriali, stimolano una risposta antinfiammatoria. Questo apre le porte ad altri batteri patogeni anaerobi stretti, tra cui *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella melaninogenicus*, che determinano lesioni endometriali e inibiscono la fagocitosi [125].

Unico virus associato all'insorgenza di metrite è *Herpesvirus 4*, il quale replica nelle cellule endometriali, determinando la loro distruzione e quella dello stroma circostante [126].

Per far fronte a questi insulti, l'utero è dotato di diversi sistemi di difesa che comprendono:

- Produzione di *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) e *Microbial-Associated Molecular Patterns* (MAMPs);
- Produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie che richiamano nell'utero i granulociti neutrofilo;
- Secrezione di PGE stimolata dagli LPS della parete batterica;

- Azione di *Anti-Microbial Peptides* (AMPs);
- Secrezione di *Mucin-1* (MUC1) stimolata dagli LPS;
- Difesa immunitaria e regolazione dell'immunità mediate da proteine di fase acuta, *LPS binding proteins* e aptoglobina;
- Rimozione dei batteri dall'utero ad opera di neutrofili e monociti [125].

Nelle bovine affette da metrite, i PAMPs e altri mediatori flogistici in grado di bloccare la secrezione di GnRH e di LH, determinano un ritardo nella ripresa della ciclicità ovarica. Inoltre, le citochine prodotte dalle cellule dell'endometrio a seguito dell'infiammazione, stimolano la steroidogenesi nelle cellule della granulosa [125].

7.1.3 Classificazione clinica e sintomatologia

Dal punto di vista clinico, la metrite è classificata in tre diversi gradi con quadri diversi:

1. Metrite di grado I o metrite clinica: si manifesta tra il decimo e il ventesimo giorno post parto con perdite vaginali (**Figura 13**) dense, bianco-giallastre o rosate e inodori, in assenza di rialzo febbrile e di risentimento generale, e con ritardo involutivo dell'utero;
2. Metrite di grado II o metrite puerperale: si manifesta entro la prima settimana post parto con febbre ($>39,5^{\circ}\text{C}$), scarse perdite vaginali (**Figura 14**) rosso-brune acquose e con odore putrido, grandi funzioni organiche parzialmente conservate, ipotonia-atonìa e dilatazione dell'utero;
3. Metrite di grado III o metrite settica: rappresenta l'evoluzione della metrite di grado II ed è caratterizzata da temperatura sub-febbrile ($<38^{\circ}\text{C}$), depressione del sensorio, decubito permanente, blocco delle grandi funzioni organiche, setticemia, ipotonia-atonìa e dilatazione dell'utero [124].



Figura 13 Perdite vaginali in metrite di grado I Figura 14 Perdite vaginali in metrite di grado II [124]
[124]

7.1.4 Diagnosi

Per la diagnosi di metrite, si può fare riferimento a diverse metodiche [124].

Effettuando un massaggio dell'utero tramite esplorazione rettale si può indurre la fuoriuscita del liquido in esso contenuto, ma ciò non si verifica nel 40% dei casi.

Lo speculum risulta molto utile nella diagnosi, ma poco pratico in allevamento.

All'esame ecografico non si evidenziano differenze tra un utero sano e un utero con metrite puerperale, dunque l'ultrasonografia non rientra tra le metodiche diagnostiche valide.

La tecnica della mano in vagina rappresenta la metodica migliore per la diagnosi di metrite e consiste nell'introduzione, rispettando le norme di asepsi, di una mano nel vestibolo vaginale della bovina per raccogliere il materiale presente.

La misurazione della temperatura rettale non ha valenza diagnostica in quanto è possibile registrare un rialzo termico anche in assenza di patologia, ma risulta utile nel monitoraggio quotidiano dello stato di salute degli animali nei 10 giorni successivi al parto.

7.1.5 Terapia convenzionale

L'approccio terapeutico in corso di metrite è volto all'eliminazione dei batteri dal lume uterino, preservando i meccanismi difensivi propri dell'utero.

In caso di una metrite di grado I, si ricorre a terapia antibiotica solo in presenza di febbre e/o perdite vaginali maleodoranti, associata ad una terapia sintomatica con antinfiammatori non steroidei (FANS). Sconsigliato è il ricorso alla somministrazione

di prostaglandine, che possono rallentare il processo involutivo, e le lavande intrauterine, con o senza antibiotici, prima dei 40 giorni post parto [127].

Quando il quadro è quello di una metrite di grado II o di grado III, si ricorre a trattamento antibiotico/chemioterapico intrauterino principalmente con ossitetraciclina, terapia antibiotica sistemica con cefalosporine di terza generazione e ossitetraciclina per via sistemica, FANS per l'effetto analgesico, antipiretico, antinfiammatorio e antiendotossico. Non vi sono certezze sull'utilità della somministrazione di prostaglandine. Il massaggio uterino, inducendo liberazione di ossitocina, favorisce il drenaggio dell'utero [124].

7.2 L'ENDOMETRITE

L'endometrite è una infiammazione cronica a carico dell'endometrio, che insorge dopo i 20 giorni dal parto, spesso, ma non sempre, a seguito di una metrite, per cui i fattori predisponenti sono quelli già visti in precedenza [128].

7.2.1 Classificazione clinica e sintomatologia

Dal punto di vista clinico, l'endometrite viene classificata [128] [124] in:

- Endometrite clinica: sono presenti perdite vaginali purulente o mucopurulente; in alcuni casi è presente essudato nella porzione craniale della vagina, ma senza perdita vaginale o segni di malattia sistemica. In base alle caratteristiche del materiale presente, l'endometrite clinica può essere ulteriormente differenziata in:
 - Endometrite purulenta: compare 20-25 giorni dopo il parto e presenta un essudato purulento costituito per più del 50% da pus (**Figura 15**);
 - Endometrite mucopurulenta: compare 26-35 giorni post parto e presenta un essudato mucopurulento costituito fino a massimo il 50% da pus (**Figura 16**);
 - Piometra: raccolta purulenta nel lume uterino alla fine del tempo di attesa volontario, associata alla persistenza di corpi lutei;
 - Mucometra: raccolta di muco nel lume uterino. Nella mucometra vera vi è una iperproduzione di muco con dilatazione dell'organo e prognosi infausta, mentre nella mucometra falsa vi è un mancato drenaggio dall'utero del muco e prognosi generalmente positiva;
- Endometrite subclinica: assenza di essudato purulento/mucopurulento nella porzione craniale della vagina.



Figura 15 Endometrite purulenta [124]



Figura 16 Endometrite mucopurulenta [124]

7.2.2 Diagnosi

Per la diagnosi di endometrite clinica si può ricorrere a [124]:

- *Endometrial score*: si tratta di un sistema che valuta le caratteristiche delle perdite vaginali, assegnando loro un punteggio (**Tabella 9**) [129];

Tabella 9 Endometrial score [129]

Muco	Descrizione	Score
Caratteristiche	Chiaro e trasparente	0
	Chiaro con punti bianchi	1
	< 50 ml di essudato con \leq 50% di pus bianco e cremoso	2
	> 50 ml di essudato con \geq 50% di pus bianco e cremoso e con sangue	3
Odore	Assenza di odore	0
	Odore fetido	3

- Esplorazione rettale: non accurata;
- Mano in vagina: non accurata;
- Speculum: esame non accurato e poco pratico;
- Metricheck: metodo rapido, ma poco accurato in assenza di essudato nel vestibolo vaginale;
- Biopsia: si effettuano più prelievi a livello di terzo distale del corno uterino, con diagnosi precisa, ma possibile compromissione della fertilità dell'animale;
- Conta dei polimorfonucleati con *cyto brush* o con *cyto-flushing*: i dati al riguardo sono molto eterogenei;

- **Ultrasonografia:** fornisce una diagnosi molto accurata, differenziando anche le diverse forme di endometrite clinica. Si osserva un effetto “bufera di neve”, con puntini bianchi di diverse dimensioni su sfondo nero. (Figura 17)



Figura 17 Aspetto a bufera di neve [124]

Per la diagnosi di endometrite subclinica si può ricorrere a [124]:

- **Biopsia:** ottimo metodo con cui è possibile valutare la presenza di marker cellulari profondi;
- **Conta dei polimorfonucleati:** considerata la metodica *gold standard*, con diversi *cut off* in base ai giorni trascorsi dal parto;
- **Reagent test strips:** le strisce reattive normalmente utilizzate per la valutazione delle urine vengono impiegate per valutare i linfociti a livello di cervice, ma l’accuratezza è limitata;
- **Ultrasonografia:** bisogna considerare lo spessore dell’endometrio e il diametro del lume uterino, in relazione alla fase del ciclo estrale della bovina, valutando anche l’ecogenicità del liquido presente in utero e gli artefatti. Questa tecnica è dotata di elevata sensibilità e specificità.

7.2.3 Terapia convenzionale

Poiché la maggior parte delle endometriti cliniche e subcliniche vanno incontro a risoluzione spontanea entro due mesi dal parto, la semplice attesa può essere ritenuta una forma di terapia [130].

La terapia antibiotica o la chemioterapia, sia a livello sistemico che locale, non trovano indicazione in quanto il quadro patologico è quello di una infiammazione e non di un’infezione, tuttavia se ne fa largo uso in campo [131].

La somministrazione di prostaglandine è pratica comune, tuttavia essa dovrebbe avvenire solo in presenza di un corpo luteo [132].

L'applicazione di un protocollo di sincronizzazione *Presynch-Ovsynch* assicura dei buoni risultati in presenza di un corpo luteo: in questo modo la bovina avrà tre estri, con aumento degli estrogeni, i quali richiamano neutrofili e stimolano la produzione di PGF2 α a livello di endometrio, oltre che incrementare la produzione di anticorpi a livello uterino, nonché di lattoferrina e lisozima [133].

Nel caso in cui non sia presente alcun corpo luteo, si procede con un *flushing* di soluzione fisiologica ad una temperatura di 25-30°C se l'animale presenta BCS superiore a 2,5 e si attende la ripresa del ciclo; in alternativa si può posizionare un dispositivo intravaginale a lento rilascio di progesterone associato alla somministrazione di gonadotropina corionica equina (eCG) al momento della rimozione del dispositivo. Se l'animale presenta un BCS inferiore a 2,50, si attende soltanto [124].

In bovine con endometrite oltre la fine del tempo di attesa volontaria è possibile somministrare una soluzione iodo-iodurata di Lugol al 3-5%, ma con il rischio di indurre fibrosi a carico dell'endometrio, essendo comunque una sostanza irritante [124].

Nel caso di piometra o mucometra, le quali si manifestano superato il tempo di attesa volontario, se presente un corpo luteo, si applica un protocollo di *Presynch-Ovsynch* [133].

7.3 TRATTAMENTO DI METRITE ED ENDOMETRITE CON MSCs

Dal momento che in presenza del complesso metrite-endometrite gli approcci terapeutici tradizionali portano a risultati non completamente soddisfacenti e tenendo conto del fenomeno sempre più diffuso dell'antimicrobico resistenza, l'interesse verso terapie alternative in questo ambito è in continua crescita, in particolare per quanto riguarda il ricorso alla somministrazione di MSCs: queste cellule, infatti, non sono dotate soltanto della capacità di differenziarsi in molteplici tipi cellulari, ma sono in grado di modulare la risposta immunitaria e il microambiente tissutale, dunque potrebbero avere un ruolo importante nel quadro di patologie infettivo-infiammatorie come queste [134].

In un recente studio [135], sono state selezionate 40 bovine con diagnosi di metrite basata sulla presenza di scolo uterino mucopurulento torbido e sulla conta delle cellule polimorfonucleate. Queste sono state divise in quattro gruppi da 10 animali ciascuno:

- Gruppo di controllo trattato con antibiotici;
- Gruppo trattato con MSCs fresche;
- Gruppo trattato con MSCs crioconservate;
- Gruppo trattato con vescicole extracellulari (EV) di MSCs tramite iniezione endovenosa e somministrazione locale al giorno 0 e al giorno 7.

A 15 giorni dal trattamento si è osservata una significativa riduzione nel numero dei polimorfonucleati nelle bovine trattate, maggiore rispetto a quella registrata nel gruppo di controllo dopo terapia antibiotica; in tutti gli animali lo scolo è diventato mucoso trasparente; si è verificato un incremento significativo di citochine antinfiammatorie quali IL-10, catelicidina, cistatina, lipocalina-2 e angiopoietina, con concomitante riduzione della citochina pro-infiammatoria IL-6 negli animali trattati con MSCs ed EV. 19 bovine sono state inseminate dopo trattamento con MSCs e di queste, 7 sono risultate gravide, mentre nessuna del gruppo di controllo trattata con antibiotico ha portato avanti una gravidanza. Questi risultati suggeriscono l'effettivo potenziale terapeutico del trattamento con MSCs per questo quadro patologico.

Anche in un altro studio del 2021 [134], bovine affette da metrite sono state trattate con 1×10^6 AT-MSc con somministrazione locale, endovenosa e locale+endovenosa, confrontate con un gruppo di controllo trattato con antibiotico. I risultati registrati sono sovrapponibili a quelli dello studio precedentemente analizzato.

È stato anche condotto uno studio *in vitro* relativo alla somministrazione di AT-MSc in un modello di infiammazione delle cellule epiteliali endometriali bovine indotta dal lipopolisaccaride (LPS). I risultati ottenuti sono i seguenti:

- Significativa riduzione dell'apoptosi delle cellule epiteliali endometriali bovine indotta da LPS;
- Significativo decremento dei livelli di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 β , IL-6 e TNF- α ;
- Down-regolazione dell'espressione di geni alla base del processo infiammatorio quali p38, I κ B-a, fosforilazione di JAK1 e proteina Bax.

Queste evidenze dimostrano *in vitro* l'efficacia di un trattamento a base di MSCs in corso di una endometrite bovina indotta da LPS [136].

7.4 TRATTAMENTO DI METRITE ED ENDOMETRITE CON PRP

In letteratura non sono ad oggi presenti studi relativi alla somministrazione di PRP come agente terapeutico in corso di metrite, né nella specie bovina né in altre specie, diversamente dall'applicazione in un quadro di endometrite.

Marini et al. [137] hanno condotto tre esperimenti relativi all'utilizzo del PRP nella terapia dell'infiammazione dell'endometrio nella bovina da latte, in particolare:

1. Effetto *in vivo* della somministrazione intrauterina di PRP;
2. Effetto di diverse concentrazioni di PRP sulla proliferazione di cellule endometriali ed espressione genica *in vitro*;
3. Effetto del PRP dopo trattamento con LPS sull'espressione genica *in vitro*.

Relativamente al primo esperimento, sono state selezionate 14 bovine aventi corpo luteo ben sviluppato e sane, senza infezione endometriale, a cui è stata effettuata somministrazione intramuscolo di una dose luteolitica di PGF2 α in modo da sincronizzarle tutte, osservando segni dell'estro nelle successive 96 ore. Al giorno 4 post-estro, si è controllata la presenza di un nuovo corpo luteo e si sono formati due gruppi, ciascuno composto da 7 animali: nel gruppo delle trattate sono stati somministrati 10 mL di PRP (preparato a partire dal sangue di due bovine donatrici sane e a quaranta giorni di lattazione) a livello intrauterino, mentre nel gruppo di controllo sono stati iniettati 10 mL di soluzione fisiologica 0,9% NaCl.

Appena prima del trattamento e poi 7 giorni dopo, sono state effettuate delle biopsie endometriali da tutti gli animali presi in esame per valutare l'espressione di geni relativi ai recettori del progesterone.

I risultati hanno evidenziato un incremento statisticamente significativo dell'espressione dei recettori del progesterone negli animali trattati con PRP a livello di epitelio ghiandolare e cellule muscolari lisce, suggerendo dunque l'utilità del PRP nel conservare e/o aumentare il numero di questi recettori a livello uterino.

Nel secondo esperimento, sono stati prelevati frammenti endometriali da diversi uteri di bovine macellate sane, normo-ciclianti e con presenza di corpo luteo sull'ovaio.

Da questi prelievi si sono ottenute cellule stromali endometriali che sono state poste in coltura, aggiungendo due diverse concentrazioni di PRP, il 5% e il 10%.

Si è osservato che il PRP favorisce la replicazione delle cellule endometriali, soprattutto ad una concentrazione del 5%, mentre alla concentrazione del 10% si è rilevata inibizione del tasso di proliferazione, fatto probabilmente legato all'eccesso di fattori di crescita presenti.

Per queste colture cellulari con diverse concentrazioni di PRP, è stata valutata anche l'espressione di geni implicati nella regolazione del ciclo estrale e nell'interazione materno-fetale: si è evidenziata una sovra-regolazione nell'espressione di prostaglandina-endoperossido sintasi 2 (*COX2*), proteina tumorale p53 (*TP53*), recettori degli estrogeni α e β (*ER- α* ed *ER- β*) e recettori del progesterone (*PR*). Inoltre è emerso che la sintesi di PGE2 è modulata in parallelo con l'espressione di *COX2*. Per finire, è stata messa in luce una sovra-regolazione di *c-Myc*, implicata nella proliferazione e nella crescita cellulare, attivata dalla presenza di EGF nel PRP.

Nel terzo esperimento è stata valutata l'espressione di geni pro-infiammatori in cellule endometriali coltivate in presenza di LPS e PRP. L'aggiunta di LPS ha determinato un aumento nell'espressione di IL-1 β , *iNOS*, *COX2* e IL-8, mentre la successiva aggiunta di PRP ne ha determinato una significativa diminuzione. Inoltre, si è osservata una riduzione nel rilascio di PGE2, IL-1 β e IL-8 in presenza di PRP, risultato che conferma l'importante azione antinfiammatoria di questo preparato.

I risultati, ottenuti nei suddetti esperimenti inclusi in questo studio, suggeriscono la possibilità futura di ricorrere alla terapia con PRP in presenza di una endometrite nella bovina da latte.

Più numerosi sono gli studi relativi all'utilizzo del PRP in corso di endometrite nella specie equina, in cui si sono ottenuti risultati sovrapponibili a quelli precedentemente esposti in modo specifico per la specie bovina, confermando dunque l'efficacia di questo nuovo approccio terapeutico in un quadro di infiammazione endometriale [138] [139].

8 LA MEDICINA RIGENERATIVA NELLE MASTITI

La mastite rappresenta in assoluto la problematica più diffusa nell'allevamento delle bovine da latte, con risvolti molto importanti per quanto riguarda il benessere e la salute animale, i costi a carico dell'allevamento e i rischi sanitari legati al consumo di latte mastitico.

Innumerevoli sono gli studi presenti in letteratura relativamente a tale quadro patologico e molteplici sono gli approcci terapeutici che possono essere adottati, basati in modo preponderante sul ricorso a diverse modalità di terapia antibiotica, tuttavia, in considerazione della grande allerta nel mondo scientifico verso il tema dell'antimicrobico-resistenza, risulta necessario ripensare le scelte per fronteggiare questa problematica così diffusa, ed è per questo motivo che negli ultimi anni è cresciuta molto l'attenzione sulla possibilità di ricorrere a nuove strategie, tra cui quelle offerte nell'ambito della medicina rigenerativa, con il ricorso alla somministrazione di MSCs o di PRP [140].

8.1 LA MASTITE

La mastite bovina è una patologia a carico della ghiandola mammaria causata da un trauma fisico o più frequentemente da un'infezione, responsabile di importanti perdite economiche per la riduzione nella quantità del latte prodotto e per la sua bassa qualità [141]. Tale problematica può interessare un singolo quarto della mammella o, meno frequentemente, più quarti contemporaneamente.

8.1.1 Classificazione epidemiologica

Dal punto di vista epidemiologico, la mastite viene classificata come:

- Mastite contagiosa: causata da batteri contagiosi quali *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) e *Mycoplasma* spp.; la diffusione avviene da bovina infetta a bovina sana soprattutto durante la mungitura, attraverso le mani o la macchina mungitrice che possono fungere da *reservoirs*;
- Mastite ambientale: causata da batteri normalmente presenti nell'ambiente, dunque non legata ad un contagio animale-animale; è particolarmente influenzata dalle pratiche gestionali applicate [140].

8.1.2 Classificazione clinica

Dal punto di vista clinico, in base al grado di infiammazione a carico della ghiandola mammaria, la mastite può essere classificata come:

- Mastite clinica: si possono facilmente osservare delle anomalie, quali rossore e gonfiore della mammella, febbre, anoressia, latte acquoso e con presenza di flocculi e coaguli di fibrina. I casi più gravi possono determinare anche morte dell'animale. Questa forma è ulteriormente suddivisibile in:
 - Peracuta;
 - Acuta;
 - Subacuta;
- Mastite subclinica: non si osservano alterazioni a carico della mammella o del latte prodotto, tuttavia vi è una riduzione nella produzione di latte, il quale avrà anche un aumentato numero di cellule somatiche;

- Mastite cronica: processo infiammatorio di durata prolungata con riacutizzazioni a intervalli regolari [141].

8.1.3 Classificazione anatomo-patologica

Dal punto di vista anatomo-patologico, è possibile classificare la mastite come:

- Mastite acuta:
 - Semplice:
 - Sierosa;
 - Desquamativa;
 - Leucocitaria;
 - Grave:
 - Emorragica;
 - Necrotizzante;
 - Gangrenosa (umida/gassosa);
- Galattoforite-mastite purulenta:
 - Fibrino-purulenta;
 - Purulento-gangrenosa (putrida);
 - Apostematosa;
 - Cronica sclerosante (involutiva);
- Mastite interstiziale:
 - Fibrino-purulenta;
 - Non purulenta;
- Mastite granulomatosa [142].

8.1.4 Fattori di rischio

Nel determinismo di questa patologia, si riconoscono numerosi fattori di rischio, in particolare fattori legati al patogeno, all'ospite e all'ambiente [141].

Per quel che concerne il patogeno, la principale causa di mastite nella bovina da latte è un'infezione batterica intra-mammaria, legata a batteri che vivono sulla mammella e sulla cute del capezzolo e che colonizzano il canale del capezzolo nel caso di mastite contagiosa, mentre nella mastite ambientale i patogeni normalmente non vivono specificatamente a livello di mammella, ma nell'ambiente della stalla, e si

comportano da opportunisti. I batteri causa di mastite possono formare biofilm, che ne assicura la persistenza in allevamento.

Tra i fattori relativi all'ospite, è necessario prendere in considerazione la genetica, la struttura della mammella, l'età, il periodo di transizione, lo stress nutrizionale e il sistema immunitario.

1. Genetica: razze pure o incroci di razze ad elevata produzione di latte, come le Holstein-Friesian, presentano una maggior vulnerabilità alla mastite, diversamente da razze più rustiche, come la Rendena, o che producono quantità inferiori di latte, come la Jersey, che presentano invece maggior resistenza;
2. Struttura della mammella: bovine con capezzoli a imbuto di grandi dimensioni o con mammelle pendule, presentano un rischio più elevato di sviluppare mastite subclinica. Oltre alla dimensione dei capezzoli, anche la distanza tra questi e il pavimento può incidere nel determinismo di questa problematica;
3. Età: le pluripare risultano maggiormente suscettibili per la persistenza di una apertura parziale del canale capezzolare in seguito alle numerose mungiture e per l'aumento della permeabilità legato al danno irreversibile causato dalle infiammazioni precedenti;
4. Periodo di transizione: periodo che va dalle 3 settimane prima alle 3 settimane dopo il parto, in cui vi è maggior rischio di sviluppare mastite a causa dell'immunosoppressione, associata ad un aumentato stress ossidativo e riduzione di antiossidanti;
5. Stress nutrizionale e sistema immunitario: durante la lattazione può stabilirsi un equilibrio energetico negativo con carenza di oligoelementi, aminoacidi e vitamine, con conseguente immunosoppressione che può favorire l'instaurarsi di mastite.

Relativamente al fattore ambiente, la pulizia e il benessere della mandria possono ridurre i casi di mastite e la loro gravità, mentre tra i fattori negativi si annoverano elevata densità di animali, clima caldo-umido, ridotta ventilazione, lettiera bagnata e pavimenti contaminati.

8.1.5 Diagnosi

Per far fronte a questa patologia che, come detto, può avere ingenti ripercussioni, è importante giungere precocemente ad una diagnosi quanto più accurata possibile, e per fare ciò è possibile fare affidamento su numerose metodologie diagnostiche, ciascuna con caratteristiche specifiche.

Queste tecniche possono essere suddivise in due tipologie:

- Generali o fenotipiche: identificano alterazioni generali, ma non sono specifiche per alcun patogeno in particolare;
- Specifiche o genotipiche: sono, appunto, specifiche e confermate per la diagnosi di mastite [143].

Nella diagnostica fisicochimica sono compresi l'aspetto generale del latte, la conduttività elettrica, il pH e i livelli di lattosio, proteine, peptidi ed enzimi, rilevati in passato con la spettrofotometria convenzionale, oggi tramite saggi immunologici. Queste tecniche hanno elevata specificità e sensibilità, ma scarsa applicabilità in campo [143].

La conta delle cellule somatiche (SCC) rappresenta il metodo più utilizzato per la diagnosi di mastite, grazie alla semplicità, all'accuratezza e all'elevato numero di campioni che possono essere analizzati con gli innovativi sistemi automatici. In particolare a livello universale lo standard riconosce una forma clinica di mastite in presenza di più di 5 milioni di cellule somatiche, mentre si parla di forma subclinica quando queste sono superiori alle 200.000, tuttavia questi valori possono essere influenzati da numerosi fattori [143].

Il *California mastitis test* (CMT) è una tecnica di semplice e veloce applicazione, attraverso la quale è possibile stimare la SCC, ma presenta una sensibilità ed una specificità piuttosto limitate [143].

La diagnostica digitale automatica rappresenta una importante innovazione e permette di rilevare alterazioni fisico-chimico-biologiche nel latte e nella mammella e di stimare alcuni marcatori di mastite a livello di fluidi corporei. Tra questi sistemi, alcuni sono addirittura in grado di identificare i batteri presenti e le relative sensibilità agli antibiotici con una elevata accuratezza [143].

La termografia a infrarossi (IRT) rappresenta una tecnica diagnostica innovativa da poter utilizzare in campo, non invasiva e molto accurata, in grado di evidenziare la presenza di mastite, differenziando la forma clinica da quella subclinica, in base a differenze termiche rilevate a livello di superficie della mammella [143].

Altri approcci diagnostici comprendono sistemi di rilevazione delle mastiti basati su sensori, proteomica, colture specifiche, *polymerase chain reaction* (PCR), sequenziamento e tipizzazione molecolare, saggi immunologici specifici e marker specifici di mastite [143].

Le tecniche maggiormente utilizzate nella routine sono il CMT, la coltura batterica, la SCC e la PCR [143].

8.1.6 Terapia convenzionale

Negli anni '60, il *National Institute for Research in Dairying* (NIRD) ha proposto un piano in cinque punti, rivelatosi efficace, per il controllo delle mastiti contagiose:

1. Identificazione e trattamento dei casi clinici;
2. Disinfezione del capezzolo dopo la mungitura;
3. Terapia in asciutta;
4. Abbattimento dei casi cronici;
5. Manutenzione routinaria della macchina di mungitura.

Tale sistema non risulta, però, particolarmente efficace nel controllo delle mastiti ambientali [141].

L'approccio terapeutico principale nel trattamento delle mastiti risulta essere il ricorso agli antibiotici, in particolare penicillina, ampicillina, tetraciclina e gentamicina, somministrati attraverso infusione intra-mammaria, per via endovenosa o intramuscolare [141]. Ad oggi, ciò rappresenta un problema di primaria rilevanza in quanto l'imponente ricorso agli antimicrobici ha determinato una forte selezione di batteri resistenti, con il rischio di trasmissione di questi ai consumatori attraverso l'assunzione di latte [144]. Inoltre, per scongiurare il rischio della presenza di residui di antibiotici nel latte prodotto durante la terapia, risulta inevitabilmente necessario scartare tale latte per il periodo di sospensione specifico di ogni principio attivo, con importanti perdite economiche per l'azienda [141].

Il trattamento in asciutta rappresenta un cardine nella prevenzione e nella terapia della mastite nella bovina da latte: questo consiste nell'iniezione intramammaria di un antibiotico a lunga persistenza appena dopo l'ultima mungitura prima della messa in asciutta, e nella seguente applicazione di un sigillante del capezzolo che stimola il tappo di cheratina, che fungerà da barriera fisica all'ingresso per via ascendente dei batteri. Ciò permette di eliminare le eventuali infezioni intramammarie presenti e prevenire nuove infezioni durante questo periodo. L'asciutta rappresenta il momento ideale per la cura della mastite, in quanto, non essendoci produzione di latte, vengono minimizzati i rischi di incorporare residui di antibiotici nella catena alimentare [141].

Nell'ottica della prevenzione di questa patologia, sono stati messi a punto diversi vaccini aventi come target *S. aureus*, *S. agalactiae* ed *E.coli*, i quali, però, non assicurano ancora una reale protezione, ma riducono soltanto moderatamente le nuove infezioni e la loro durata, mentre risultati differenti si sono ottenuti relativamente alla riduzione della severità della malattia e nella produzione di latte. Tra le misure di controllo, alla vaccinazione bisogna affiancare anche l'igiene durante la mungitura, il trattamento antibiotico e l'abbattimento degli animali infetti, in modo tale da ridurre l'incidenza e la durata dei casi di mastite [141].

Potenziati trattamenti alternativi, di cui si sta valutando la possibilità di utilizzo su larga scala, comprendono composti con proprietà antimicrobiche derivati dalle piante oppure di origine animale, probiotici, batteriocine, batteriofagi, immunoterapia, nanoparticelle e fattori secretori nativi [141] [140].

8.2 TRATTAMENTO DELLA MASTITE CON MSCs

Le cellule staminali, presenti a livello epiteliale mammario, hanno un ruolo importante nella salute della mammella stessa: da questa caratteristica si è ipotizzata la possibilità di ricorrere alla somministrazione di MSCs come innovativo trattamento della mastite bovina [140].

L'interesse verso questo tipo di terapia non è dovuto soltanto alle capacità di rigenerazione proprie di queste cellule, ma anche alla loro attività anti-batterica, che le rende, quindi, una potenziale arma nel contrasto al fenomeno dell'antimicrobico-resistenza, ruolo confermato con uno studio su modello murino di infezione da *S. aureus* meticillino-resistente in cui la somministrazione di BM-MSCs ha determinato una riduzione nel numero di colonie batteriche e nell'espressione di numerose citochine e chemochine, tra cui IL-6, IL-10 e IL-1 β , con attenuazione del processo infiammatorio [145].

In uno studio di Peralta et al. [146] si è valutata la sicurezza di un trattamento intramammario a base di MSCs in bovine sane e la sua efficacia in bovine da latte in cui è stata indotta sperimentalmente una mastite clinica supportata da *S. aureus*.

Nello studio sulla sicurezza (**Figura 18**) di questo protocollo, sono state selezionate 8 giovenche di circa 15 mesi di età, a cui è stata somministrata, attraverso il canale del capezzolo di due quarti mammari selezionati in modo random, una sospensione di $2,5 \times 10^7$ AT-MSCs fetali bovine in 3 mL di ringer lattato al giorno 1 e al giorno 10, mentre negli altri due quarti si sono somministrati soltanto 3 mL di ringer lattato come controllo. Gli animali sono stati valutati clinicamente per 20 giorni su base quotidiana, con particolare attenzione nella valutazione clinica della mammella, in associazione ad esame emocromocitometrico e isolamento di leucociti dal sangue periferico ogni 5 giorni. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione intramammaria di AT-MSCs fetali bovine allogeniche in giovenche sane non induce effetti clinici, né reazione immunitaria di rigetto, né memoria immunitaria [146].

Safety study design

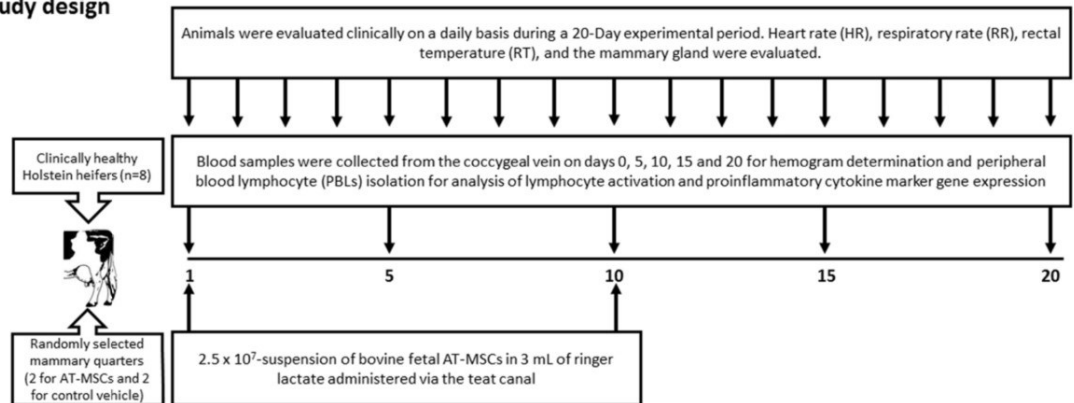


Figura 18 Studio relativo alla sicurezza della somministrazione intramammaria di AT-MSCs fetali bovine in giovenche sane. [146]

In riferimento allo studio di efficacia (**Figura 19**), sono state selezionate 15 bovine alla prima lattazione risultate negative a tre controlli batterici del latte consecutivi, a cui è stata inoculata una sospensione di *S. aureus* nei due quarti di sinistra. Le bovine sono state successivamente divise in modo casuale in tre gruppi da cinque animali ciascuno: il *NEG group* non ha ricevuto terapia, ma ha ricevuto somministrazione intramammaria nei quarti infetti di 5 mL di ringer lattato al giorno 4 e al giorno 10; l'*ATB group* è stato trattato per via intramammaria con la somministrazione di una sospensione commerciale contenente 50 mg di antibiotico pirlimicina ai giorni 4 e 5; l'*MSCs group* ha ricevuto una sospensione di $2,5 \times 10^7$ AT-MSCs in 3 mL di ringer lattato per via intramammaria nei quarti infetti al giorno 4 e al giorno 10. Nei quarti di destra è stato iniettato 1 mL di PBS al giorno 1 come controllo. Per 15 giorni le bovine sono state sottoposte quotidianamente a visita clinica, con particolare attenzione alla ghiandola mammaria, ed inoltre si è svolta valutazione della presenza di anomalie dell'aspetto del latte a inizio mungitura, con classificazione del secreto come normale, acquoso, viscoso, con presenza di flocculi o grumi, sangue o pus. Sono stati prelevati anche campioni di latte in modo asettico per effettuare la SCC e valutare il numero di unità formanti colonia (CFU). Si sono valutati anche i livelli sierici di aptoglobina e amiloide A. I risultati di questo esperimento hanno evidenziato che la somministrazione intramammaria di AT-MSCs fetali bovine in bovine, in cui è stata sperimentalmente indotta mastite da *S. aureus*, non determina variazioni nei parametri clinici o nelle concentrazioni sieriche di

aptoglobina e amiloide A, mentre è stata registrata una conta batterica nel latte inferiore nel gruppo MSC rispetto al gruppo NEG, ma superiore rispetto al gruppo ATB. In conclusione, è possibile ipotizzare un futuro sviluppo nella terapia basata su MSCs per il trattamento della mastite bovina, ma ulteriori studi si rendono necessari per ottimizzare gli effetti benefici e determinare i meccanismi sottostanti [146].

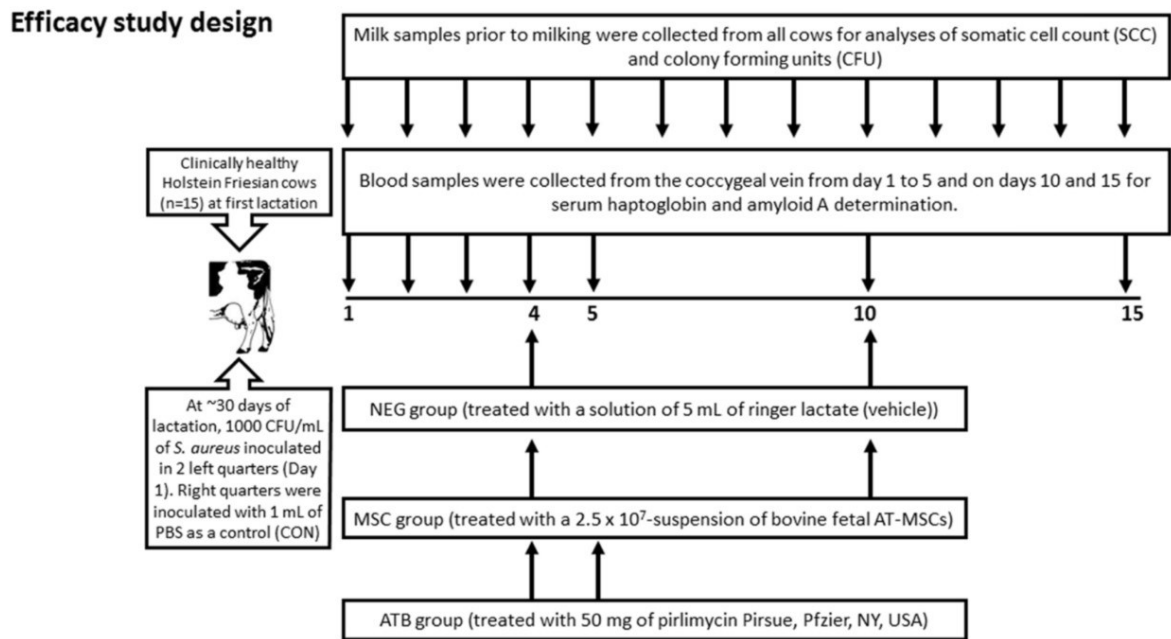


Figura 19 Studio relativo all'efficacia della somministrazione intramammaria di AT-MSCs fetali bovine in bovinae sane in cui è stata indotta mastite con inoculazione intramammaria di *S. aureus*. [146]

Uno studio del 2022 [147] ha, invece, messo in evidenza come la terapia con UCB-MSCs allogeniche abbia una efficacia superiore rispetto al trattamento con antibiotici in corso di mastiti subcliniche in bovine da latte. In questo caso sono state valutate sia la sicurezza che l'efficacia della somministrazione di due dosi a 7 giorni di distanza di 5×10^7 MSCs in 2 mL di PBS, per via endovenosa a livello di vena giugulare e localmente con somministrazione intramammaria. In questo caso, il trattamento con MSCs ha determinato una SCC inferiore rispetto a quella rilevata negli animali trattati con antibiotici, suggerendo, in conclusione, la potenziale applicazione di questo protocollo nella prevenzione delle mastiti subcliniche nelle bovine da latte, che assicurerebbe, inoltre, una riduzione delle perdite in azienda legate a tale quadro patologico e l'assenza sicura di residui di antibiotici nel latte che giunge sulla tavola del consumatore.

8.3 TRATTAMENTO DELLA MASTITE CON PRP

Altro ambito di attuale interesse è quello che vede nel ricorso al PRP la possibilità per un nuovo approccio terapeutico nei confronti delle mastiti nelle bovine da latte, tenendo in considerazione le proprietà di tale preparato, in particolare l'attività antimicrobica, che lo rende un valido alleato nella lotta al fenomeno dell'antibiotico-resistenza, e l'attività antinfiammatoria, oltre alla capacità di stimolare la rigenerazione a livello di tessuto ghiandolare grazie ad un apporto sopra-fisiologico di fattori di crescita, chemochine e metaboliti attivi [148].

Quella di Lange-Consiglio et al. [149] del 2014 è la prima applicazione clinica di un approccio terapeutico non convenzionale alla mastite bovina, basato sulla somministrazione intramammaria di un concentrato piastrinico (PC). All'interno di tre diversi allevamenti, sono state selezionate bovine per un totale di 229 quarti di mammella affetti da mastite, in particolare 144 con mastite acuta e 85 con mastite cronica, diagnosticate prendendo in considerazione cambiamenti nel latte, cambiamenti nelle condizioni del quarto affetto e condizioni generali degli animali. I quarti sono stati suddivisi in tre diversi gruppi: il primo, costituito da 66 quarti, trattato con antibiotico; il secondo, costituito da 80 quarti, trattato associando antibiotico e PC; l'ultimo, costituito da 83 quarti, trattato esclusivamente con PC.

Il PC è stato preparato a partire dal sangue prelevato in animali sani, non sottoposti a terapia antibiotica nei due mesi precedenti, ed è stato diluito fino ad avere una concentrazione di 1×10^9 piastrine/mL, dopodiché è stato congelato a -80°C e scongelato a 37°C per tre volte, in modo da favorire il rilascio di fattori derivati dalle piastrine [149].

5 mL di tale preparato sono stati somministrati per via intramammaria per 3 giorni consecutivi. Nel gruppo trattato con l'associazione antibiotico+PC, è stato somministrato prima il PC e a seguire l'antibiotico. Dopo il trattamento si è proceduto con il *dipping* del capezzolo [149].

È stata valutata la SCC con misurazione fluorometrica ai giorni 0 – 7 – 14 – 30 dal trattamento, espressa con Linear Score (LS), dove: $LS = \log_2(n. cell : 100) + 3$, considerando come “buon miglioramento” una riduzione della SCC di almeno 3 punti

LS rispetto al tempo 0, con ritorno del quarto e della secrezione di latte alla normalità [149].

È stato valutato anche il tasso di ricaduta, ossia il numero di casi in cui la mastite clinica si è ripresentata in un quarto già coinvolto, nel periodo compreso tra l'ultimo esame svolto 30 giorni dopo il trattamento e la fine della stessa lattazione [149].

I risultati ottenuti sono riassunti in **Tabella 10**.

Tabella 10 Dati relativi al miglioramento della SCC e al tasso di ricaduta per ogni trattamento e distinzione clinica tra mastite acuta e cronica. [149]

Mastitis	Treatment ¹	No. of treated quarters	Quarters with improvement of at least 3 LS points ² [no. (%)]	Quarters with improvement <3 LS points [no. (%)]	Relapse on quarters with improvement of at least 3 LS points [no. (%)]	Quarters with improvement of at least 3 LS points without relapse [no. (%)]
Acute	Antibiotic	40	21 (52.50) ^a	19 (47.50) ^a	9 (42.86) ^a	12 (57.14) ^a
	PC	51	34 (66.67) ^a	17 (33.33) ^a	10 (29.41) ^a	24 (70.59) ^a
	Antibiotic + PC	53	48 (90.57) ^b	5 (9.43) ^b	4 (8.33) ^b	44 (91.67) ^b
Chronic	Antibiotic	26	4 (15.38) ^A	22 (84.62) ^A	4 (100) ^A	0 (0) ^A
	PC	32	17 (53.13) ^C	15 (46.87) ^C	5 (29.41) ^B	12 (70.59) ^B
	Antibiotic + PC	27	18 (66.67) ^B	9 (33.33) ^B	2 (11.11) ^B	16 (88.89) ^B

^{a,b}Different superscript lowercase letters within a column indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments in acute mastitis comparisons.

^{A-C}Different superscript capital letters within a column indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments in chronic mastitis comparisons.

¹PC = platelet concentrate.

²LS = linear score.

Dai dati registrati emerge che l'associazione di antibiotico e PC determina dei risultati significativamente superiori in entrambe le forme cliniche di mastite, mentre la sola somministrazione intramammaria di PC restituisce risultati significativamente migliori rispetto al solo antibiotico nelle mastiti croniche, grazie ai fattori di crescita che determinano protezione tissutale, processi riparativi ed effetto antibatterico [149].

In uno studio del 2019 dell'Università di Istanbul [150] è stata valutata l'efficacia della somministrazione intramammaria di un PC come trattamento in corso di mastiti subcliniche in bovine da latte: sono stati, in questo caso, selezionati 120 quarti con mastite subclinica, suddivisi poi casualmente in tre gruppi: il primo trattato solo con antibiotico, il secondo trattato solo con PC, il terzo trattato con associazione antibiotico+PC, ciascuno comprendente 40 quarti con crescita batterica. Il trattamento è avvenuto a fine mungitura e continuato per 12 giorni ad intervalli di 3

giorni. Anche in questo caso il PC aveva una concentrazione di 1×10^9 piastrine/mL ed è stato congelato a -80°C e scongelato a 37°C per tre volte per favorire il rilascio di fattori derivati dalle piastrine.

La valutazione ha riguardato la SCC e i livelli di amiloide A nel latte ai giorni 0 – 7 – 14 – 21 del trattamento. In **Tabella 11** sono riassunti i risultati ottenuti alla SCC, mentre in **Tabella 12** sono riportate le concentrazioni rilevate di amiloide A nel latte [150].

Tabella 11 SCC ($\times 10^3$ cellule/mL). [150]

Groups	Days				Significance
	D0 Mean±SE	D7 Mean±SE	D14 Mean±SE	D21 Mean±SE	
ABG	748.48±37.27 ^{Ab}	402.98±22.66 ^{Ba}	265.23±14.84 ^C	223.38±12.89 ^C	***
PCG	623.83±32.14 ^{ab}	350.45±19.33 ^{Bab}	256.05±13.19 ^C	213.68±8.68 ^C	***
CG	667.77±33.27 ^{ab}	318.75±19.69 ^{Bb}	228.08±9.23 ^C	206.70±7.45 ^C	***
Significance	*	*	NS	NS	

SE: Standard Error; NS: Not Significant ($P>0.05$); * $P<0.05$; *** $P<0.001$
^{a,b} Indicates the significance controls in the same column; ^{A,B,C} Indicates the significance controls in the same row

ABG: gruppo trattato con solo antibiotico;

PCG: gruppo trattato con PC;

CG: gruppo trattato con associazione antibiotico+PC.

Tabella 12 Concentrazione di Amiloide A nel latte. [150]

Groups	Days				Significance
	D0 Mean±SE (ng/mL)	D7 Mean±SE (ng/mL)	D14 Mean±SE (ng/mL)	D21 MEan±SE (ng/mL)	
ABG	6198.38±228.49 ^{Ab}	2851.28±238.70 ^B	1530.00±150.60 ^C	1113.85±109.88 ^C	***
PCG	4762.78±358.85 ^{Ab}	2935.13±292.56 ^B	1826.08±215.40 ^C	1344.68±160.68 ^C	***
CG	4999.83±309.64 ^{Ab}	2828.35±262.57 ^B	1497.75±134.88 ^C	1137.38±93.64 ^C	***
Significance	***	NS	NS	NS	

SE: Standard Error; NS: Not Significant ($P>0.05$); * $P<0.001$
^{a,b} Indicates the significance controls in the same column; ^{A,B,C} Indicates the significance controls in the same row

I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono la possibilità di ricorrere alla somministrazione intramammaria di PC come alternativa all'uso di antibiotico in corso di mastiti subcliniche, contrastando lo sviluppo di antimicrobico-resistenza e limitando il rischio di residui nel latte [150].

Nettamente diversi sono invece i risultati di uno studio del 2021 [151] in cui vi è stata somministrazione intramammaria di *pure PRP* allogenico in bovine con mastite subclinica indotta da batteri Gram+: in questo caso infatti il trattamento con PRP ha mostrato dei risultati inferiori nella cura batteriologica in confronto agli animali trattati con antibiotico.

I dati raccolti in questo studio, però, sono difficilmente confrontabili con lo studio di Lange-Consiglio et al. del 2014 [149] in quanto si è fatto ricorso a preparati piastrinici diversi, aventi diversa concentrazione piastrinica, e in cui l'attivazione delle piastrine è stata ottenuta con due modalità diverse, ossia tre congelamenti e scongelamenti nello studio del 2014, e aggiunta di calcio gluconato appena prima della somministrazione in questo [151].

Ulteriori studi si rendono dunque necessari per verificare l'effettiva efficacia della somministrazione intramammaria di PRP nel trattamento della mastite nella bovina da latte, anche se è ipotizzabile un ruolo effettivamente positivo di questo preparato come trattamento alternativo, o quantomeno associato, alla somministrazione di antimicrobici.

9 CONCLUSIONI

La Medicina Rigenerativa, negli ultimi decenni, ha destato notevole interesse per le potenziali prospettive che offre nella gestione di quadri patologici variegati e di diversa complessità.

Nell'ambito della specie equina, questi nuovi approcci sono stati largamente studiati e applicati, soprattutto nel trattamento di problematiche muscolo-scheletriche del cavallo sportivo, come le tendinopatie, ma, più recentemente, tale branca medica ha preso piede anche in relazione a differenti affezioni negli animali da compagnia.

Meno indagate sono invece le potenzialità del ricorso alla terapia cellulare nell'ambito degli animali da reddito, con principale riferimento all'allevamento della bovina da latte.

In questo specifico campo, alcune delle problematiche di maggior interesse, sia da un punto di vista sanitario, sia da un punto di vista economico per l'azienda, sono quelle legate alla sfera riproduttiva e produttiva, quali le disfunzioni ovariche, come l'ipofunzionalità ovarica e le cisti ovariche, i processi di natura infettivo-infiammatoria a carico dell'utero, come la metrite e l'endometrite, ed infine la mastite.

Dopo una generale trattazione sulle caratteristiche principali delle Cellule Mesenchimali Stromali (MSCs) e del Plasma Ricco di Piastrine (PRP) e sulle loro potenzialità terapeutiche, sono stati analizzati i quadri patologici di maggior interesse nell'allevamento della bovina da latte, confrontando i risultati ottenuti ricorrendo alle terapie convenzionalmente in uso, con quelli ottenuti attraverso questi approcci terapeutici innovativi.

Sebbene le evidenze scientifiche al riguardo non abbiano preso ancora in esame il ricorso a queste metodiche per il trattamento su larga scala, e dunque si rendano necessari ulteriori studi al riguardo per meglio stabilire la sicurezza, l'efficacia e i meccanismi d'azione legati all'utilizzo di MSCs e PRP, sono disponibili dati che permettono di ipotizzare un futuro ampliamento del campo di applicazione di queste

terapie, il cui ruolo diventa ancora più importante se si considera che esse possono rappresentare un'utile arma nei confronti del fenomeno dell'antimicrobico-resistenza, in quanto è emerso che, sia le MSCs che il PRP, sono dotati di una attività antimicrobica intrinseca che potrebbe potenzialmente essere sfruttata per limitare la somministrazione di antibiotici e dunque preservare l'efficacia degli antimicrobici di importanza critica (CIA), anche in un'ottica di *One Health*.

10 BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Violini e P. Mariani, «Cellule staminali e medicina rigenerativa in ambito veterinario,» *Large Animal Review*, n. 14, pp. 203-209, 2008.
- [2] M. S. Steinberg, «Mechanism of tissue recontruction by dissociated cells.,» *Science*, pp. 762-763, 1962.
- [3] I. V. Yannas, J. F. Burke, P. L. Gordon, C. Huang e R. H. Rubenstein, «Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 14, n. 2, pp. 107-132, 1980.
- [4] E. Bell, B. Ivarsson e C. Merrill, «Production of tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro.,» *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, pp. 1274-1278, 1979.
- [5] S. J. Morrison e J. Kimble, «Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer,» *Nature*, vol. 441, pp. 1068-1074, 2006.
- [6] R. Schofield, «The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell,» *Blood Cells*, vol. 4, pp. 7-25, 1978.
- [7] G. de Haan e G. Van Zant, «Intrinsic and extrinsic control of hemopoietic stem cell numbers: mapping of a stem cell gene,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 186, pp. 529-536, 1997.
- [8] H. Lin, «The stem-cell niche theory: lessons from flies,» *Nature Reviews Genetics*, vol. 3, 2002.
- [9] S. He, D. Nakada e S. J. Morrison, «Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal,» *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 25, pp. 377-406, 2009.
- [10] T. H. Cheung e T. A. Rando, «Molecular regulation of stem cell quiescence,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, pp. 329-340, 2013.

- [11] Z. Malam e R. D. Cohn, «Stem Cells on Alert: Priming Quiescent Stem Cells after Remote Injury,» *Cell Stem Cell*, vol. 15, 2014.
- [12] P. Rojas-Ríos e A. González-Reyes, «Concise review: The plasticity of stem cell niches: a general property behind tissue homeostasis and repair,» *Stem Cells*, pp. 852-859, 2014.
- [13] M. F. Pittenger e C. Kerr, «Stem Cells,» in *Tissue Engineering (Second Edition)*, Academic Press, 2014, pp. 23-65.
- [14] C. A. Chacón-Martínez, J. Koester e S. A. Wickström, «Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity,» *Development*, vol. 145, 2018.
- [15] K. C. Clause, L. J. Liu e K. Tobita, «Directed stem cell differentiation: the role of physical forces,» *Cell Communication & Adhesion*, vol. 17, pp. 48-54, 2010.
- [16] Z. G. Venkei e Y. M. Yamashita, «Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division,» *Journal of Cell Biology*, vol. 217, n. 11, pp. 3785-3795, 2018.
- [17] S. Yadlapalli e Y. M. Yamashita, «Spindle positioning in the stem cell niche,» *Wires Developmental Biology*, vol. 1, pp. 215-230, 2012.
- [18] J. Hao, A. Ma, L. Wang, J. Cao, S. Chen, L. Wang, B. Fu, J. Zhou, X. Pei, Y. Zhang, P. Xiang, S. Hu, Q. Li, Y. Zhang, Y. Xia, H. Zhu, G. Stacey, Q. Zhou e T. Zhao, «General requirements for stem cells,» *Cell Proliferation*, vol. 53, 2020.
- [19] A. R. Barky, E. M. M. Ali e T. M. Mohamed, «Stem Cells, Classifications and their Clinical Applications,» *American Journal of Pharmacology Therapeutics*, vol. 1, n. 1, pp. 1-7, 2017.
- [20] N. Rajabzadeh, E. Fathi e R. Farahzadi, «Stem cell-based regenerative medicine,» *Stem Cell Investigation*, vol. 6, n. 18, 2019.
- [21] K. Kalra e P. Tomar, «Stem Cell: Basics, Classification and Applications,» *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, vol. 27, pp. 919-930, 2015.

- [22] A. De Los Angeles, F. Ferrari, R. Xi, Y. Fujiwara, N. Benvenisty, H. Deng, K. Hochedlinger, R. Jaenisch, S. Lee, H. G. Leitch, M. W. Lensch, E. Lujan, D. Pei, J. Rossant, M. Wernig, P. J. Park e G. Q. Daley, «Hallmarks of pluripotency,» *Nature*, vol. 525, 2015.
- [23] G. Huang, A. Ye, X. Zhou, D. Liu e Q. Ying, «Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network,» *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, pp. 1741-1757, 2015.
- [24] M. J. Shambloott, J. Axelman, J. W. Littlefield, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins, Y. Cui e et al., «Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro,» *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, vol. 98, pp. 113-118, 2001.
- [25] E. Tiblad e M. Westgren, «Fetal stem-cell transplantation,» *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, vol. 22, n. 1, pp. 189-201, 2008.
- [26] K. E. Mitchell, M. L. Weiss, B. M. Mitchell, P. Martin, D. Davis, L. Morales e et al., «Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia,» *Stem Cells*, vol. 21, pp. 50-60, 2003.
- [27] I. Rogers e R. F. Casper, «Umbilical cord blood stem cells,» *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, vol. 18, n. 6, pp. 893-908, 2004.
- [28] G. J. Jimenez-Puerta, J. A. Marchal, E. López-Ruiz e P. Gálvez-Martín, «Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use,» *Journal of Clinical Medicine*, 2020.
- [29] J. A. Guadix, J. L. Zugaza e P. Gálvez-Martín, «CHaracteristics, applications and prosects of mesenchymal stem cells in cell therapy,» *Medicina Clinica*, pp. 408-414, 2017.
- [30] S. Viswanathan, Y. Shi, J. Galipeau, M. Krampera, K. Leblanc, I. Martin, J. Nolte, D. G. Phinney e L. Sensebe, «Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®)

Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature.» *Cytotherapy*, pp. 1019-1024, 2019.

- [31] A. Uccelli, L. Moretta e V. Pistoia, «Mesenchymal stem cells in health and disease,» *Nature Reviews Immunology*, pp. 726-736, 2008.
- [32] X. Wei, X. Yang, Z. Han, F. Qu, L. Shao e Y. Shi, «Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy,» *Acta Pharmacologica Sinica*, pp. 747-754, 2013.
- [33] T. Squillaro, G. Peluso e U. Galderisi, «Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update,» *Cell Transplantation*, vol. 25, pp. 829-848, 2016.
- [34] R&D Systems Inc., «Mesenchymal Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers,» 2014. [Online]. Available: <https://www.rndsystems.com/pathways/mesenchymal-stem-cell-differentiation-pathways-lineage-specific-markers>. [Consultato il giorno 15 Marzo 2023].
- [35] A. J. Friedenstein, I. I. Piatetzky-Shapiro e K. V. Petrakova, «Osteogenesis in transplants of bone marrow cells,» *Journal of Embriology and Experimental Morphology*, pp. 381-390, 1966.
- [36] A. I. Caplan, «Mesenchymal Stem Cells,» *Journal of Orthopaedic Research*, pp. 641-650, 1991.
- [37] S. Viswanathan, Y. Shi, J. Galipeau, M. Krampera, K. Leblanc, I. Martin, J. Nolte, D. G. Phinney e L. Sensebe, «Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature,» *Cytotherapy*, vol. 21, pp. 1019-1024, 2019.
- [38] A. B. T. Hill, F. Fernandes Bressan, B. D. Murphy e J. Mansano Garcia, «Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species,» *Stem Cell Research & Therapy*, 2019.
- [39] M. Natsumeda, V. Florea, A. C. Rieger, B. A. Tompkins, M. N. Banerjee, S. Golpanian, J. Fritsch, A. M. Landin, N. D. Kashikar, V. Karantalis e et al., «A Combination of Allogeneic Stem Cells Promotes Cardiac Regeneration.,»

Journal of the American College of Cardiology, vol. 70, n. 20, pp. 2504-2515, 2017.

- [40] F. Han, C. Wang, L. Yang, S. Zhan, M. Zhang e K. Tian, «Contribution of murine bone marrow mesenchymal stem cells to pancreas regeneration after partial pancreatectomy in mice.,» *Cell Biology International* , pp. 823-831, 2012.
- [41] H. Qian, H. Yang, W. Xu, Y. Yan, Q. Chen, W. Zhu, H. Cao, Q. Yin, H. Zhou, F. Mao e et al., «Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells.,» *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 22, pp. 325-332, 2008.
- [42] K. A. Cho, S. Y. Ju, S. J. Cho, Y. J. Jung, S. Y. Woo, J. Y. Seoh , H. S. Han e K. H. Ryu, «Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow.,» *Cell Biology International*, vol. 33, pp. 772-777, 2009.
- [43] A. Andrzejewska, B. Lukomska e M. Janowski, «Mesenchymal stem cells: from roots to boost,» *Stem Cells*, vol. 37, n. 7, pp. 855-864, 2019.
- [44] A. I. Caplan, «Mesenchymal Stem Cells: Time to CHange the Name!.,» *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 6, pp. 1445-1451, 2017.
- [45] L. R. Devireddy, L. Boxer, M. J. Myers, M. Skasko e R. Screven, «Questions and Challenges in the Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Based Therapies in Veterinary Medicine,» *Tissue Engineering: Part B*, vol. 23, n. 5, 2017.
- [46] M. Mocchi, S. Dotti, M. Del Bue, R. Villa, E. Bari, S. Perteghella , M. L. Torre e S. Grolli, «Veterinary Regenerative Medicine for Musculoskeletal Disorders: Can Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Be the New Frontier?,» *Cells*, vol. 9, n. 1453, 2020.
- [47] H. G. Jung, E. K. Ahn, J. H. Lee, Y. H. Kim, S. H. Leem, J. Heo e et al., «Effect of harvesting sites and ages on adipose tissue-derived stem cells in rat,» *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 11, pp. 137-142, 2014.

- [48] S. M. Mueller e J. Glowacki, «Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges,» *Journal of Cell Biochemistry*, vol. 82, pp. 583-590, 2001.
- [49] Y. Nie, C. Lau, A. Lie, G. Chan e M. Mok, «Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus,» *Lupus*, vol. 19, pp. 850-859, 2010.
- [50] F. Cianfarani, G. Toietta, G. Di Rocco, E. Cesareo, G. Zambruno e T. Odorisio, «Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing,» *Wound Repair and Regeneration*, vol. 21, pp. 545-553, 2013.
- [51] Y. Sun, W. Deng, L. Geng, L. Zhang, R. Liu, W. Chen e et al., «Mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis display impaired function in inhibiting Th17 cells,» *Journal of Immunology Research*, 2015.
- [52] J. Zhang, X. Huang, H. Wang, X. Liu, T. Zhang, Y. Wang e D. Hu, «The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy,» *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 6, n. 234, 2015.
- [53] P. Lohan, C. M. Coleman, J. M. Murphy, M. D. Griffin, T. Ritter e A. E. Ryan, «CHanges in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: should we be concerned?,» *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 5, n. 99, 2014.
- [54] C. Lin, G. Lin e T. F. Lue, «Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells in Immunocompetent Recipients Without Immunosuppressants,» *Stem Cells and Development*, vol. 21, n. 15, 2012.
- [55] A. Naji, M. Eitoku, B. Favier, F. Deschaseaux, N. Rouas-Freiss e N. Suganuma, «Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications,» *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, pp. 3323-3348, 2019.

- [56] J. A. Ankrum, J. F. Ong e J. M. Karp, «Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged,» *Nature Biotechnology*, vol. 32, pp. 252-260, 2014.
- [57] S. Schu, M. Nosov, L. O'Flynn, G. Shaw, O. Treacy e et al., «Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells,» *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 16, pp. 2094-2103, 2012.
- [58] D. M. Camp, D. A. Loeffler, D. M. Farrah, J. N. Borneman e P. A. LeWitt, «Cellular immune response to intrastratally implanted allogeneic bone marrow stromal cells in a rat model of Parkinson's disease,» *Journal of Neuroinflammation*, vol. 6, n. 17, 2009.
- [59] X. Wei, X. Yang, Z.-p. Han, F.-f. Qu, L. Shao e Y.-f. Shi, «Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy,» *Acta Pharmacologica Sinica*, pp. 747-754, 2013.
- [60] M. Purwaningrum, N. S. Jamilah, S. D. Purbantoro, C. Sawangmake e S. Nantavisai, «Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells,» *Journal of Veterinary Science*, vol. 22, n. 6, 2021.
- [61] R. Barone, *Anatomia comparata dei Mammiferi domestici*, vol. 1, R. Bortolami e E. Callegari, A cura di, Edagricole, p. 28.
- [62] M. A. Vidal, G. E. Kilroy, M. J. Lopez, J. R. Johnson, R. M. Moore e J. M. Gimble, «Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells,» *Veterinary Surgery*, vol. 36, pp. 613-622, 2007.
- [63] S. Giovannini, W. Brehm, P. Mainil-Varlet e D. Nestic, «Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells,» *Differentiation*, vol. 76, pp. 118-129, 2008.
- [64] T. Martinello, I. Bronzini, L. Maccatrozzo, A. Mollo, M. Sampaolesi, F. Mascarello, M. Decaminada e M. Patruno, «Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation,» *Research Veterinary Sciences*, vol. 91, pp. 18-24, 2011.

- [65] S. Nava, V. Sordi, L. Pascucci, C. Tremolada, E. Ciusani, O. Zeira, M. Cadei, G. Soldati, A. Pessina, E. Parati e et al., «Long-Lasting Anti-Inflammatory Activity of Human Microfragmented Adipose Tissue,» *Stem Cells International*, 2019.
- [66] R. Vishnubalaji, M. Al-Nbaheen, B. Kadalmani, A. Aldamash e T. Ramesh, «Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis,» *Cell and Tissue Research*, vol. 347, pp. 419-427, 2012.
- [67] L. Barrachina, A. Romero, A. Zaragoza, C. Rodellar e F. J. Vázquez, «Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse,» *The Veterinary Journal*, vol. 238, pp. 49-57, 2018.
- [68] A. C. Colbath, D. D. Frisbie, S. W. Dow, J. D. Kisiday, C. W. McIlweath e L. R. Goodrich, «Equine models for the investigation of mesenchymal stem cell therapies in orthopedic disease,» *Operative Techniques in Sports Medicine*, vol. 25, pp. 41-49, 2017.
- [69] M. A. Vidal, N. J. Walker, E. Napoli e D. L. Borjesson, «Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue,» *Stem Cell and Development*, vol. 21, pp. 273-283, 2012.
- [70] K. Nemeth, «Mesenchymal stem cell therapy for immune-modulation: the donor, the recipient, and the drugs in-between,» *Experimental Dermatology*, vol. 23, pp. 625-628, 2014.
- [71] I. Kim, S. I. Bang, S. K. Lee, S. Y. Park, M. Kim e H. Ha, «Clinical implication of allogenic implantation of adipogenic differentiated adipose-derived stem cells,» *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 3, pp. 1312-1321, 2014.
- [72] L. Beer, M. Mildner e H. J. Ankersmith, «Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science,» *Annals of Translational Medicine*, vol. 5, n. 7, p. 170, 2017.

- [73] Y. Wang, X. Chen, W. Cao e Y. Shi, «Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications,» *Nature Immunology*, vol. 15, pp. 1009-1016, 2014.
- [74] M. V. Jackson, T. J. Morrison, D. F. Doherty, D. F. McAuley, M. A. Matthay, A. Kissenpfennig, C. M. O'Kane e A. D. Krasnodembskaya, «Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS,» *Stem Cells*, vol. 34, pp. 2210-2223, 2016.
- [75] R. S. Waterman, S. L. Tomchuck, S. L. Henkle e A. M. Betancourt, «A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype,» *PLoS ONE*, vol. 5, n. 4, 2010.
- [76] H. Li, P. Rong, X. Ma, W. Nie, C. Chen, C. Yang, J. Zhang, Q. Dong e W. Wang, «Paracrine effect of mesenchymal stem cell as a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy,» *Life Science*, vol. 215, pp. 113-118, 2018.
- [77] K. Akiyama, C. Chen, D. Wang, X. Xu, C. Qu, T. Yamaza, T. Cai, W. Chen, L. Sun e S. Shi, «Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis,» *Cell Stem Cell*, vol. 10, 2012.
- [78] H. Wang, F. Qi, X. Dai, W. Tian, T. Liu, H. Han, B. Zhang, H. Li, Z. Zhang e C. Du, «Requirement of B7-H1 in mesenchymal stem cells for immune tolerance to cardiac allografts in combination therapy with rapamycin.,» *Transplant Immunology*, vol. 31, n. 2, pp. 65-74, 2014.
- [79] G. M. Spaggiari e L. Moretta, «Interactions Between Mesenchymal Stem Cells and Dendritic Cells,» in *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*, Berlin/Heidelberg, Springer, 2013, pp. 199-208.
- [80] B. Amorin, A. P. Alegretti, V. Valim, A. Pezzi, A. M. Laurean, M. A. L. da Silva, A. Wieck e L. Silla, «Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: A review,» *Human Cell*, vol. 4, pp. 137-150, 2014.

- [81] M. H. Abumaree, M. A. Al Jumah, B. Kalionis, D. Jawdat, A. Al Khaldi, F. M. Abomaray, A. S. Fatani, L. W. Chamley e B. A. Knawy, «Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages,» *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 9, pp. 620-641, 2013.
- [82] K. A. Russell, L. C. Garbin, J. M. Wong e T. G. Koch, «Mesenchymal Stromal Cells as Potential Antimicrobial for Veterinary Use - A Comprehensive Review,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 2020.
- [83] C. S. Kingsley, «Blood Coagulation: Evidence of an Antagonist to Factor VI in Platelet-Rich Human Plasma,» *Nature*, vol. 173, pp. 723-724, 1954.
- [84] R. E. Marx, «Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP,» *Implant Dentistry*, vol. 10, n. 4, pp. 225-228, 2001.
- [85] J. Neumüller, A. Ellinger e T. Wagner, «Transmission Electron Microscopy of Platelets FROM Apheresis and Buffy-Coat-Derived Platelet Concentrates,» in *The Transmission Electron Microscope - Theory and Applications*, London, Khan, M., 2015, pp. 255-284.
- [86] R. E. Marx, «Platelet-rich plasma: evidence to support its use,» *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 62, n. 4, pp. 489-496, 2004.
- [87] A. Lange-Consiglio, R. Garlappi, C. Spelta, A. Idda, S. Comazzi, R. Rizzi e F. Cremonesi, «Physiological Parameters to Identify Suitable Blood Donor Cows for Preparation of Platelet Rich Plasma,» *Animals*, vol. 11, n. 2296, 2021.
- [88] R. Alves e R. Grimalt, «A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification,» *Skin Appendage Disorders*, vol. 4, pp. 18-24, 2018.
- [89] O. Maghsoudi, R. Ranjbar, S. H. Mirjalili e M. Fasihi-Ramandi, «Inhibitory Activities of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on the Growth of Pathogenic Bacteria,» *Iranian Journal of Pathology*, vol. 12, n. 1, pp. 79-87, 2017.

- [90] A. Cieřlik-Bielecka, T. Bold, G. Ziólkowski, M. Pierchała, A. Królikowska e P. Reichert, «Antibacterial Activity of Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma: An In Vitro Study,» *BioMed Research International*, 2018.
- [91] S. Varshney, A. Dwivedi e V. Pandey, «Antimicrobial effects of various platelet rich concentrates-vibes from in-vitro studies-a systematic review,» *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 9, pp. 299-305, 2019.
- [92] O. J. Smith, A. Wicaksana, D. Davidson, D. Spratt e A. Mosahebi, «An evaluation o the bacteriostatic effet of platelet-rich plasma,» *International Wound Journal*, vol. 18, n. 4, pp. 448-456, 2021.
- [93] A. R. Attili, C. Iacoucci, E. Serri, V. Cuteri, A. Cantalamessa, M. Linardi, C. Rifici, G. Mazzullo, G. Rossi, L. Galosi e A. M. Tambella, «Antibacterial Properties of Canine Platelet-Rich Plasma and Other Non-Transfusional Hemo-Components: An in vitro Study,» *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 8, 2021.
- [94] X. Xie, C. Zhang e R. S. Tuan, «Biology of platelet-rich plasma and its cliical application in cartilage repair,» *Arthritis Research & Therapy*, vol. 16, n. 1, 2014.
- [95] Y. Q. Tang, M. R. Yeaman e M. E. Selsted, «Antimicrobial peptides from human platelets,» *Infection and Immunity*, vol. 70, n. 12, pp. 6524-6533, 2002.
- [96] R. Dhurat e M. S. Sukesh, «Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective,» *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, vol. 7, n. 4, pp. 189-197, 2014.
- [97] J. Magalon, A. L. Chateau, B. Bertrand e et al., «DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available device,» *BMJ Open Sport & Exercise Medicine*, vol. 2, n. 1, 2016.
- [98] S. Haynesworth, S. Kadiyala e L. Liang, «Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet release suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates.,» in *48th Meeting of the Orthopedic Research Society*, Boston, MA, 2002.

- [99] G. Weibrich, T. Hansen, W. Kleis e et al., «Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration,» *Bone*, vol. 34, pp. 665-671, 2004.
- [100] J. M. DeLong, R. P. Russell e A. D. Mazzocca, «Platelet-rich plasma: the PAW classification system,» *Arthroscopy*, vol. 28, pp. 998-1009, 2012.
- [101] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale», «Sistema Informativo Veterinario - Statistiche,» 31 12 2022. [Online]. Available: https://www.vetinfo.it/j6_statistiche/#/report-pbi/11. [Consultato il giorno 10 02 2023].
- [102] ISTAT, «Latte e prodotti lattiero caseari,» [Online]. Available: http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCSP_LATTE. [Consultato il giorno 10 02 2023].
- [103] N. Arrigoni , G. Diegoli, G. Lanza, G. Lazzaretti , V. Miraglia e G. Trambajolo, «LINEE GUIDA - Uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento bovino da latte,» Regione Emilia Romagna, 2022.
- [104] L. F. Brito, N. Bedere, F. Douhard, H. R. Oliveira, M. Arnal, F. Peñagaricano, A. P. Schinckel, C. F. Baes e F. Miglior, «Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world,» *Animal. The international journal of animal biosciences*, vol. 15, 2021.
- [105] L. DesCôteaux, J. Colloton e G. Gnemmi, *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography.*, Wiley-BlackWell, 2010.
- [106] G. Gnemmi e C. Marabolt, «Anaestro nella bovina da latte ad alta produzione: approccio diagnostico e teapeutico,» *SUMMA. Animali da reddito.*, Gennaio/Febbraio 2010.
- [107] F. Lopez-Gatius, P. Santolaria, J. Yani, J. Rutllant e M. Lopez-Bejar, «Persistent ovarian follicles in dairy cows: A therapeutic approach,» *Theriogenology*, vol. 56, pp. 649-659, 2001.

- [108] H. Dobson e R. F. Smith, «What is stress, and how it affects reproduction,» *Animal Reproduction Science*, pp. 743-752, 2000.
- [109] F. Lopez-Gatius, K. Murugavel, P. Santolaria, M. Lopez-Bejar e J. Yaniz, «Pregnancy rate after timed artificial insemination in early post-partum dairy cows after Ovsynch or specific synchronization protocols,» *Journal of Veterinary Medicine. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, vol. 51, pp. 33-38, 2004.
- [110] J. L. Yaniz, F. Lopez-Gatius, G. Bech-Sabat, I. Garcia-Ispuerto, B. Serrano e P. Santolaria, «Relationship between milk production, ovarian function and fertility in high-producing dairy herds in North-Eastern Spain,» *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 43, pp. 38-43, 2008.
- [111] L. Wang, Q. Mei, Q. Xie, H. Li, P. Su, L. Zhang, K. Li, D. Ma, G. Chen, J. Li e W. Xiang, «A comparative study of Mesenchymal Stem Cells transplantation approach to antagonize age-associated ovarian hypofunction with consideration of safety and efficiency,» *Journal of Advanced Research*, vol. 38, pp. 245-259, 2022.
- [112] A. Lange Consiglio, E. Capra, V. Herrera, I. Lang-Olip, P. Ponsaerts e F. Cremonesi, «Application of Perinatal Derivatives in Ovarian Disease,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, 2022.
- [113] P. F. Malard, M. A. S. Peixer, J. G. Grazia, H. dos Santos Sena Brunel, L. F. Feres, C. L. Villarroel, L. G. B. Siqueira, M. A. N. Dode, R. Pogue, J. H. M. Viana e J. L. Carvalho, «Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss,» *Scientific Reports*, vol. 10, 2020.
- [114] F. Cremonesi, S. Bonfanti, A. Idda e A. Lange-Consiglio, «Platelet Rich Plasma for Regenerative Medicine Treatment of Bovine Ovarian Hypofunction,» *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7, 2020.
- [115] E. S. Sills, N. S. Rickers, X. Li e G. Palermo, «First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium

gluconate-activated autologous platelet-rich plasma,» *Gynecological Endocrinology*, vol. 34, pp. 756-760, 2018.

- [116] W. J. Silvia, T. B. Hatler, A. M. Nugent e L. F. Laranja da Fonseca, «Ovarian follicular systs in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis,» *Domesti Animal Endocrinology*, vol. 23, pp. 167-177, 2002.
- [117] M. Cao, Y. Zhao, T. Chen, Z. Zhao, B. Zhang, C. Yuan, X. Wang, L. Chen, N. Wang, C. Li e X. Zhou, «Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs ameliorate polycystic ovary syndrome by protecting against metabolic disturbance,» *Biomaterials*, vol. 288, 2022.
- [118] L. B. Chang, S. Y. Peng, C. J. Chou e et al., «Therapeutic potential of amniotic fluid stem cells to treat bilateral ovarian dystrophy in dairy cows in a subtropical region,» *Reproduction in Domestic Animals*, pp. 433-441, 2018.
- [119] S. Y. Peng, T. H. Wu, T. Y. Lin, L. Y. Hii, K. S. Chan, T. Y. Fu, S. C. Chang, P. C. Shen, K. Y. Liu e S. W. Shaw, «Application of cattle placental stem cells for trating ovarian follicular cyst,» *World Journal of Stem Cells*, vol. 12, n. 11, pp. 1366-1376, 2020.
- [120] S. S. Anvari, G. Dehgan e M. Razi, «Preliminary Findings of Platelet-Rich Plasma Induced Ameliorative Effect on Polycystic Ovarian Syndrome,» *Cell Journal*, vol. 21, n. 3, pp. 243-253, 2019.
- [121] C. Fourichon, H. Seegers e X. Malher, «Effect of disease on reproduction in the diary cow: a meta-analysis,» *Theriogenology*, vol. 53, n. 9, pp. 1729-1759, 2000.
- [122] R. O. Gilbert, S. T. Shin, C. L. Guard, H. N. Erb e M. Frajblat, «Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows,» *Theriogenology*, vol. 64, n. 9, pp. 1879-1888, 2005.
- [123] I. M. Sheldon, D. E. Noakes, A. N. Rycroft, D. U. Pfeifer e H. Dobson, «Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle,» *Reproduction*, vol. 123, pp. 837-845, 2002.

- [124] G. Gemmi, E. Ferrari e C. Maraboli, «Complesso metrite-endometrite,» *SUMMA - Animali da reddito*, Gennaio/Febbraio 2014.
- [125] I. M. Sheldon, «Mechanisms of infection and immunity in the bovine female genital tract post partum,» in *Dairy Symposium proceedings*, Milwaukee, Wisconsin, 2011.
- [126] G. Donofrio, V. Franceschi, A. Capocefalo, S. Cavirani e I. M. Sheldon, «Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome,» *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 7, n. 83, 2009.
- [127] S. J. LeBlanc, T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton e W. H. Johnson, «The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows,» *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 2237-2249, 2002.
- [128] I. M. Sheldon, G. S. Lewis, S. LeBlanc e R. O. Gilbert, «Defining postpartum uterine disease in cattle,» *Theriogenology*, vol. 65, n. 8, pp. 1516-1530, 2006.
- [129] I. M. Sheldon, «The postpartum uterus,» *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 20, pp. 569-591, 2004.
- [130] G. Gautam, T. Nakao, K. Koike, S. T. Long, M. Yusuf, R. M. S. B. K. Ranasinghe e A. Hayashi, «Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows,» *Theriogenology*, vol. 75, pp. 168-179, 2010.
- [131] J. Dubuc, T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. Walton e S. LeBlanc, «Risk factors, impact and treatment of post partum uterine diseases in dairy cattle,» in *XXVI WBC*, Santiago del Cile, 2010.
- [132] P. Haimer, S. Arlt e W. Heuwieser, «Evidence-based medicine: quality and comparability of clinical trials investigating the efficacy of prostaglandin F2a for the treatment of bovine endometritis,» *Journal of Dairy Science*, vol. 79, n. 3, pp. 287-296, 2012.

- [133] R. Kasimanickam, J. M. Cornwell e R. L. Nebel, «Effect of presence of clinical and subclinical endometritis at the initiation of Presynch-Ovsynch program on the first service pregnancy in dairy cows.» *Theriogenology*, vol. 95, pp. 214-223, 2006.
- [134] R. Singh, V. Bhaskar, S. Saini, A. Kumar, A. Thakur, S. Kumar e D. Malakar, «143 Therapeutic efficacy and safety of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in treating mastitis and metritis in dairy cattle.» *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 33, 2021.
- [135] V. N. Verma, S. Ghai, S. Ansari, S. Saini, A. Thakur, A. Kumar, S. Kumar e D. Malakar, «158 Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (UCB-MSC) used for the prevention of metritis in cattle.» *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 34, n. 2, 2021.
- [136] W. Lu, Z. M. Xu, Q. Liu, N. N. Yu, J. B. Yu, W. L. Li, Y. Y. Mao, Z. Du, L. Si, S. Yuan, J. Jin, S. Fu, D. Sun e Y. H. Han, «Inhibitory Effect of Bovine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Lipopolysaccharide Induced Inflammation of Endometrial Epithelial Cells in Dairy Cows.» *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 8, 2021.
- [137] M. G. Marini, C. Perrini, P. Esposti, B. Corradetti, D. Bizzaro, P. Riccaboni, E. Fantinato, G. Urbani, G. Gelati, F. Cremonesi e A. Lange-Consiglio, «Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro.» *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 14, n. 58, 2016.
- [138] M. F. S. Reghini, C. R. Neto, L. G. Segabinazzi, M. M. B. Castro Chaves, C. P. F. Dell'Acqua, M. C. C. Bussiere, J. A. J. Dell'Acqua, F. O. Papa e M. A. Alvarenga, «Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma.» *Theriogenology*, vol. 86, n. 2, pp. 516-522, 2016.
- [139] L. G. T. M. Segabinazzi, I. F. Canisso, G. Podico, L. L. Cunha, G. Novello, M. F. Rosser, S. C. Loux, F. S. Lima e M. A. Alvarenga, «Intrauterine Blood Plasma Platelet-Therapy Mitigates Persistent Breeding-Induced

Endometritis, Reduces Uterine Infections, and Improves Embryo Recovery in Mares,» *Antibiotics*, vol. 10, n. 5, 2021.

- [140] K. Sharun, K. Dhama, R. Tiwari, M. B. Gugjoo, M. I. Yatoo, S. K. Patel, M. Pathak, K. Karthik, S. K. Khurana, R. Singh, B. Puvvala, A. R. Singh, K. P. Singh e W. Chaicumpa, «Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review,» *Veterinary Quarterly*, vol. 41, n. 1, pp. 107-136, 2021.
- [141] W. N. Cheng e S. G. Han, «Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review,» *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol. 33, n. 11, 2020.
- [142] P. S. Marcato, *Patologia Sistemática Veterinária*, Edagricole, 2015.
- [143] S. Chakraborty, K. Dhama, R. Tiwari, M. I. Yatoo, S. K. Khurana, R. Khandia, A. Munjal, P. Munuswamy, M. A. Kumar, M. Singh, R. Singh, V. K. Gupta e W. Chaicumpa, «Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population - a review,» *Veterinary Quarterly*, vol. 39, n. 1, pp. 76-94, 2019.
- [144] Y. Suzuki, H. Hiroki, H. Xie, M. Nishiyama, S. H. Sakamoto, R. Uemura, K. Nukazawa, Y. Ogura, T. Watabe e I. Kobayashi, «Antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from dairy cows and their surrounding environment on a livestock farm practicing prudent antimicrobial use,» *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 240, 2022.
- [145] Y. Yuan, S. Lin, N. Guo, C. Zhao, C. Shen, S. Shen, X. Bu e H. Ye, «Marrow mesenchymal stromal cells reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in rat models,» *Cytotherapy*, vol. 16, n. 1, pp. 56-63, 2014.
- [146] O. A. Peralta, C. Carrasco, C. Vieytes, M. J. Tamayo, I. Munoz, S. Sepulveda, T. Tadich, M. Duchens, P. Melendez, A. Mella e C. G. Torres, «Safety and efficacy of a mesenchymal stem cel intramammary therapy in dairy cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* clinical mastitis,» *Scientific Reports*, vol. 10, n. 1, 2020.

- [147] S. Ghai, S. Saini, S. Ansari, V. Verma, S. Chopra, V. Sharma, P. Devi e D. Malakar, «Allogenic umbilical cord blood-mesenchymal stem cells are more effective than antibiotics in alleviating subclinical mastitis in dairy cows,» *Theriogenology*, vol. 187, pp. 141-151, 2022.
- [148] S. I. Borş, I. Ibănescu, A. Borş e A. S. Abdoon, «Platelet-rich plasma in animal reproductive medicine: Prospective and applications,» *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 57, n. 11, pp. 1287-1294, 2022.
- [149] A. Lange-Consiglio, C. Spelta, R. Garlappi, M. Luini e F. Cremonesi, «Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: First clinical application,» *Journal of Dairy Science*, vol. 97, pp. 6223-6230, 2014.
- [150] G. EVKURAN DAL, A. SABUNCU , D. AKTARAN BALA, S. Ö. ENGİNLER, A. C. ÇETİN , B. ÇELİK e Ö. KOÇAK, «Evaluation of Intramammary Platelet Concentrate Efficacy as a Subclinical Mastitis Treatment in Dairy Cows Based on Somatic Cell Count and Milk Amyloid A Levels,» *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, vol. 25, n. 3, pp. 357-363, 2019.
- [151] P. C. Duque-Madrid, J. Velasco-Bolaños, A. Ceballos-Márquez, C. López e J. U. Carmona , «Intramammary treatment using allogeneic pure platelet-rich plasma in cows with subclinical mastitis caused by Gram-positive bacteria,» *Scientific Reports*, vol. 11, 2021.
- [152] D. Ding, W. Shyu e S. Lin, «Mesenchymal Stem Cells,» *Cell Transplantation*, vol. 20, pp. 5-14, 2011.
- [153] I. Narang, N. Mittal e N. Mishra, «A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: A clinical study,» *Contemporary Clinical Dentistry*, vol. 6, n. 1, pp. 63-68, 2015.